

論 文 要 旨

Runx2 is involved in the inhibition of MMP-13 expression by roxithromycin in human gingival epithelial cell cultures

〔ヒト歯肉上皮細胞株においてロキシスロマイシンによる
MMP-13 の発現抑制には転写因子 Runx2 が関与する〕

田 淵 聖 子

【序論および目的】

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は、線維芽細胞、上皮細胞、骨細胞や白血球などから分泌され、細胞外マトリックスを分解する主要な酵素である。MMP の基質は各種コラーゲン、プロテオグリカン、ゼラチン、フィブロネクチン、ラミニン、エラスチンなどを含んでいる。正常状態でのマトリックスの合成と分解は、サイトカイン、増殖因子、Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) の相互作用によってバランスが保たれているが、腫瘍細胞の浸潤や炎症の状態では、細胞外マトリックスの分解が亢進し、MMP の過剰な産生が認められるという数多くの報告がある。

その中でも、MMP-13 は別名コラゲナーゼ 3 と呼ばれ、他の MMP に比べ広い基質特異性を有する。歯周病患者由来の歯周組織においても発現が高いことが報告されていることから MMP-13 は、歯周組織の破壊や歯槽骨吸収に重要な役割を果たすことが考えられている。

私が所属する講座では、これまでにマクロライド系抗生剤であるロキシスロマイシン (RXM) がヒト歯根膜細胞において腫瘍壊死因子 (TNF)- α が誘導した VEGF の発現を抑制することを報告した (Journal Periodontal Reserch 2000;71:1546-1553)。

そこで本研究では、ヒト歯肉上皮細胞株における MMP-13 の発現に対する RXM の影響および MMP-13 の遺伝子発現に関与する Runx2 に対する RXM の影響について調べることを目的とした。

【材料および方法】

1. ヒト上皮系細胞の培養：

ヒト上皮系細胞 Ca9-22(ヒト下顎歯肉癌原発巣由来), TU4(ヒト上顎歯肉癌原発巣由来), SCCTF(ヒト舌癌原発巣由来), HSC-3(ヒト舌癌リンパ節転移巣由来)を用い, 5%FBS を含む D-MEM で培養した.

2. ヒト歯肉上皮系細胞 (Ca9-22) に対する RXM の細胞障害性：

RXM の細胞障害性を MTT 法により検討した.

3. ヒト上皮系細胞における MMP-13 および Runx2 発現 に対する RXM の影響：

MMP-13 および Runx2 発現に対する RXM の影響を RT-PCR と real-time RT-PCR により検討した.

4. Ca9-22 における MMP-13 産生に対する RXM の影響：

MMP-13 産生に対する RXM の影響を ELISA 法で検討した.

5. Ca9-22 での MMP-13 発現における転写因子 Runx2 の関与：

培養細胞に Runx2 あるいは scramble siRNA をトランスフェクションし, MMP-13 の発現を RT-PCR, real-time RT-PCR と ELISA 法により検討した.

【結果】

1. ヒト歯肉上皮系細胞 (Ca9-22) において, RXM は 細胞の増殖を抑制しなかった.

2. Ca9-22 において, RXM は MMP-13 mRNA の発現と MMP-13 タンパクの産生を抑制した.

3. 種々のヒト上皮系細胞において RXM は MMP-13 mRNA の発現を抑制した.

4. Ca9-22 において, RXM は Runx2 mRNA の発現を抑制した.

5. Ca9-22 において, Runx2 に対する siRNA は, MMP-13 mRNA の発現と MMP-13 タンパクの産生を抑制した.

【結論及び考察】

ヒト上皮系細胞において, RXM は, MMP-13 の発現を転写因子 Runx2 を介して抑制することが示唆された.

論文審査の要旨

報告番号	総研第 29 号	学位申請者	田淵 聖子
審査委員	主査	於保 孝彦	学位 博士 (医学 歯学 學術)
	副査	佐藤 友昭	副査 中村 典史
	副査	仙波 伊知郎	副査 野口 和行

**Runx2 involved in the inhibition of MMP-13 expression by roxithromycin
in human gingival epithelial cell cultures**

(ヒト歯肉上皮細胞株においてロキシシロマイシンによる MMP-13 の発現抑制には
転写因子 Runx2 が関与する)

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-13 は、正常組織におけるリモデリングの他、炎症時の組織破壊や癌細胞の浸潤などに関与していると考えられている。歯周病患者の歯肉溝浸出液や歯肉組織中には多量の MMP-13 が見られ、その MMP-13 量と歯槽骨吸収の程度には関連があると報告されている。現在、歯科領域においては、テトラサイクリン系抗生剤であるミノサイクリン (MINO) が歯周炎局所治療薬として用いられているが、学位申請者は、マクロライド系抗生剤であるロキシシロマイシン (RXM) に着目し、ヒト歯肉上皮系細胞株における MMP-13 の発現に対する RXM の影響と MMP-13 の遺伝子発現に関与する転写因子 Runx2 に対する RXM の影響について調べた。

種々のヒト上皮系細胞株 (Ca9-22, TU4, SCCTF, HSC-3) を用い、MMP-13 および Runx2 mRNA の発現に対する RXM の影響を RT-PCR と real-time RT-PCR により検討し、Ca9-22 株に対する RXM の細胞障害性を MTT 法で調べた。また、Ca9-22 株における MMP-13 タンパク産生に対する RXM の影響を調べ、MINO と比較し検討を加えた。さらに、Ca9-22 株の MMP-13 mRNA における転写因子 Runx2 の関与を調べるために、Runx2 siRNA をトランスフェクションし、解析を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) 供試したすべてのヒト上皮系細胞株において RXM は MMP-13 mRNA の発現を抑制した。
- 2) RXM は、Ca9-22 株に対して細胞障害性を示さなかったが、MMP-13 mRNA の発現と MMP-13 タンパクの産生を抑制した。
- 3) Ca9-22 株において、MINO による MMP-13 産生の抑制作用は、RXM との同時処理によって増強する傾向を示した。
- 4) Ca9-22 株において、RXM は Runx2 mRNA の発現を抑制した。
- 5) Ca9-22 株において、Runx2 siRNA は MMP-13 mRNA の発現と MMP-13 タンパクの産生を抑制した。

本研究では、ヒト上皮系細胞株においては、転写因子 Runx2 の発現から MMP-13 タンパクの産生に至る過程の中で、RXM は少なくとも一部では Runx2 mRNA の発現を阻害し、MMP-13 遺伝子の発現を抑制していることを明らかにしている。RXM は抗菌作用に加えて MMP-13 を抑制する抗炎症作用を持つことから、臨床的に歯周病治療薬としての可能性が示された。

以上より本研究は、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 29 号		学位申請者	田淵 聖子
審査委員	主査	於保 孝彦	学位	博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	佐藤 友昭	副査	中村 典史
	副査	仙波 伊知郎	副査	野口 和行

主査および副査の5名は、平成19年12月6日、学位申請者 田淵 聖子 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされた。

質問1) ロキシスロマイシンを選択した理由は？

(回答) 私が所属する講座では、これまでに、ロキシスロマイシンがヒト歯根膜細胞において腫瘍壊死因子 (TNF- α) が誘導したマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-1 や血管内皮増殖因子(VEGF)の発現を抑制することを報告している。本研究もそれらの研究の一翼を担うものであったのでロキシスロマイシンを用いた。

質問2) 本文中にロキシスロマイシンの全身投与での血中濃度は 9.6 μM とあるが、本研究は臨床応用を目的としたものか？

(回答) 今回の実験では約 6 μM の濃度からロキシスロマイシンによる抑制効果が認められたが、25あるいは50 μM の濃度で著明な抑制効果が見られることから、局所的な使用に限定される可能性もある。現在のところ培養細胞を用いた基礎的な研究内容であるが、将来的には臨床応用を目指している。

質問3) 本文において、マクロライド系抗生剤がバイオフィルムの形成を阻害するとあるが、その機序は？

(回答) 詳細なメカニズムについてはまだ明らかでない点も多い。緑膿菌において、バイオフィルムの成分である多糖体の産生を抑制するという報告がなされているが、口腔内細菌のバイオフィルム形成に対する作用についての報告は乏しい。

質問4) 4種類の細胞株を用いた理由は？

(回答) 正常ヒト歯肉上皮細胞では、構成的なレベルでの MMP-13 の発現が小さかったため細胞株を用いた。また細胞株では、培養や形質導入が比較的しやすいという利点もある。今後は正常細胞を用いて、炎症性サイトカインなどで誘導した系を用いてロキシスロマイシンの効果を検討したい。

質問5) 歯肉由来の上皮細胞株を主に用いた理由は？

(回答) 先に歯根膜線維芽細胞を用いた研究がされており、次のターゲットとして歯肉上皮細胞を選択した。

質問6) 今回、歯周病に対する治療を視野に入れた研究として上皮細胞を用いたのはユニークだと思われるが、MMP-13に着目した理由は何か？

(回答) 歯周病患者の歯肉溝滲出液において高い MMP-13 の産生がみられ、上皮細胞においても高い発現が見られるという報告がある。MMP-13 は歯周病に関与していると言われる他の MMP (MMP-2 や MMP-9) の活性化を引き起こすことから、歯周組織破壊において主要な因子の一つと考えた。

最終試験の結果の要旨

質問7) 本文において、MMP はその活性化に亜鉛を必要とするとされているが、その活性化機序は？

(回答) 亜鉛が MMP に結合すると、触媒ドメインを覆っていた調節ドメインがコンフォメーションナルチェンジによりはずれ、触媒ドメインが基質と結合できるようになり、その酵素作用を発揮することとなる。

質問8) MTT アッセイの機序について説明してください。

(回答) テトラゾリウム塩の一種である MTT は黄色の溶液であるが、生細胞内に取り込まれると細胞内のミトコンドリアにある酵素によってフォルマザンに変化する。このフォルマザンを DMSO で溶解すると紫色を呈するため吸光度を測定することにより、フォルマザン量からミトコンドリア活性すなわち生細胞活性を測ることができ、同時に細胞障害性の程度を知ることが可能となる。

質問9) PCR 産物をアガロースゲルに電気泳動した際、プライマーによるダイマーは形成されたか？

(回答) いいえ。プライマー・ダイマーは認められなかった。

質問10) siRNA の形質導入の効率を測定したか？

(回答) 本来であれば、トランスフェクション効率を測定するべきであるが、今回は、市販の Runx2 siRNA を購入し、メーカー指示の方法で形質導入を行った。

質問11) MMP-8 や MMP-9 に対する影響は調べたか？

(回答) mRNA 発現を調べたが、顕著な抑制作用はみられなかった。

質問12) Tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP) についてなにか知見はあるか？

(回答) ヒト歯根膜線維芽細胞においてロキシスロマイシンは TIMP の発現に影響を与えないことが報告されているが、今回、用いた細胞においては確認していない。

質問13) MMP-13 の遺伝子発現において Runx2 の他にどのような転写因子が重要と思われるか？

(回答) AP-1 の他に Ets-1 などが重要であると考えられる。

質問14) 骨代謝において Runx2 は重要な役割を演じているが、他の組織において Runx2 はどのような機能を持っているか？

(回答) 皮膚の線維芽細胞においては、Runx2 のノックアウトにより遊走能が阻害されると報告されている。

質問15) ロキシスロマイシンが Runx2 を抑制することにより、例えば、Runx2 の遺伝子欠損がもたらす鎖骨頭蓋異形成症のような病的な状態に陥らないか？

(回答) 完全に抑制してしまうとなんらかの骨代謝異常をもたらす危険性も予想されるが、基礎的なベースラインを維持できるようにロキシスロマイシンの投与量や投与時期を調節することにより解決できると考えている。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。