



Title	ヒト歯肉線維芽細胞の in vitro 培養系における胸腺細胞刺激因子の誘導と同因子の同定
Author(s)	三原, 丞二
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36891
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 ・ (本 籍)	み	は	じ	じ
	三	原	丞	二
学 位 の 種 類	歯	学	博	士
学 位 記 番 号	第	9 0 1 2	号	
学位授与の日付	平 成	2 年	3 月	9 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
学位論文題目	ヒト歯肉線維芽細胞の <i>in vitro</i> 培養系における胸腺細胞刺激因子の誘導と同因子の同定			
論文審査委員	(主査)			
	教 授 祖父江鎮雄			
	(副査)			
	教 授	作 田 正義	講 師 高田春比古	講 師 三木 靖夫

論 文 内 容 の 要 旨

歯肉の主要構成細胞の一つである線維芽細胞は、種々のサイトカインによりその機能が制御されるとともに、自らも複数のサイトカインを産生する。したがって、歯周病をはじめとする局所性炎症あるいは免疫反応の成立には線維芽細胞が重要な役割を担う。本研究は、歯周病原菌として注目される *Bacteroides* 属のリポ多糖 (LPS) や種々のサイトカインの刺激によるヒト歯肉線維芽細胞のサイトカインの産生を胸腺細胞刺激因子 (TAF) 産生を指標として検討し、さらにその本体についても明らかにしようとしたものである。

線維芽細胞は、9～11才の小児の歯肉開窓時に得られた正常歯肉組織より patch 法により分離・継代した GF-1～GF-4 細胞とヒト皮膚線維芽細胞 SF-TY の継代数 5～10 のものを供試した。線維芽細胞の刺激因子として用いた LPS は、*Actinobacillus actinomycetemcomitans* NCTC9710, *Bacteroides corporis* ATCC 33547, *B. gingivalis* 381, *B. intermedius* ATCC25611, *B. loeschei* ATCC15930, *B. oralis* ATCC 33269, *Fusobacterium nucleatum* ATCC10953 (以上口腔内由来), *Escherichia coli* 055; B5, *Salmonella abortus-equi* および *S. minnesota* S519 の計 10 菌より熱フェノール・水法に従って抽出・分離した。サイトカインと抗血清は、リコンビナントヒトインターロイキン-1 α (rHuIL-1 α), リコンビナントヒト腫瘍壊死因子 (rHuTNF; 以上大日本製薬), rHuIL-1 β , rHuIL-2 (以上大塚製薬), rHuIL-6 (阪大細胞工学センター岸本・平野両博士より恵与), 天然型ヒトインターフェロン α (nHuIFN α), nHuIFN γ (以上林原生物化学研究所), nHuIFN β (東レ) ならびにそれぞれのウサギ抗血清 (抗HuIL-6 血清はヤギ由来) を供試した。

TAF活性の測定は、以下に示す方法に基づいて行った。即ち、線維芽細胞 ($1 \times 10^4 / 100 \mu\text{l} / \text{well}$) を10%のウシ胎仔血清 (FCS) を含む α MEM培地で96時間前培養後、各種LPSあるいはサイトカインを刺激標品として添加し、FCS無添加の α MEM培地で24時間培養した。培養後の上清を回収し、これを上清兩分 (CF) 標品とし、また残った付着細胞に100 μl の培地を添加後、凍結融解を3回繰り返したものを細胞画分 (CA) 標品とした。さらに、一部実験では、線維芽細胞前培養の最終24時間に rHuTNFあるいはnHuIFNでプライミングを行い、以後前述と同様の操作で標品を回収した。

このようにして得られた標品を適宜希釈し、フィットヘムアグルチニン ($1 \mu\text{g} / \text{ml}$) の存在下で、C3H/HeJマウス胸腺細胞 ($1.5 \times 10^6 / 200 \mu\text{l} / \text{well}$) に対する増殖刺激作用を ^3H -チミジンの取り込みを指標にTAF活性を測定した。

以上のような諸実験の結果、次のような成果が得られた。*Bacteroides* 属由来のLPSは、線維芽細胞に胸腺細胞刺激因子 (CF-TAFおよびCA-TAF) を誘導した。LPSにより誘導されたTAF活性について、抗IL-1 α 、IL-1 β 、およびIL-6抗血清を用いて活性中和試験を行ったところ、CF-TAFは抗IL-1 β および抗IL-6抗血清により部分的な活性抑制を受けたが、これら両者を同時に添加しても、完全な抑制には至らなかった。対照標品として用いたrHuIL-6は、単独では高濃度でも弱いTAF活性しか示さないものの、rHuIL-1 β とrHuIL-6の混液で発現したTAF活性は、抗HuIL-1 β 抗血清の添加では完全に抑制を受けるが、抗HuIL-6抗血清の添加では増強分のみ抑制された。これらの結果から、CF-TAFは、IL-1 β が主体で、IL-6はあくまで補助的に作用し、さらに、その他の未知の物質が関与していることが示唆された。一方、CA-TAFは、抗IL-1 α 抗血清の添加で完全に抑制を受けた。なお、これらCFならびにCA標品にはIL-2活性は認められなかった。次に、サイトカインによる線維芽細胞のTAF産生調節について検討したところ、rHuTNFは、単独で線維芽細胞のCA標品に強いTAF活性を誘導し、さらに、*B. intermedius* (Bi) LPSで誘導されたCA-TAF活性を増強する相乗作用を示した。また、rTNFは、線維芽細胞のBiLPSに対する感受性を高めるプライミング作用も有していた。一方、nHuIFNは、単独で線維芽細胞にTAF活性を誘導しないが、nHuIFN β および γ は、BiLPSのCA-TAF活性誘導能を著しく増強するプライミング作用を有することが明らかとなった。さらに、抗IFN β 抗血清の存在下で線維芽細胞をBiLPSで刺激してもCA-TAFは誘導されなかったことより、BiLPSのCA-TAF誘導活性は線維芽細胞の産生するIFN β に依存していることが示唆された。一方、rHuTNFによるCA-TAF誘導は影響を受けなかった。なお、これらサイトカインを介して誘導されるCA-TAF活性も抗IL-1 α 抗血清により完全に抑制を受け、CA-TAFの本体が、刺激の方法、標品に関わらず、IL-1 α であることが証明された。

以上、本研究から、局所炎症病巣における線維芽細胞を巡るサイトカインネットワークの一端が解明され、線維芽細胞も、マクロファージ等と同様に炎症・免疫反応の場では、エフェクター細胞として重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

論文の審査結果の要旨

本研究は、ヒト歯肉線維芽細胞培養系に、黒色色素産生性 *Bacteroides* 属菌体より抽出したりボ多糖 (LPS) や種々のサイトカインを作用させ、胸腺細胞刺激因子 (TAF) の誘導の条件と同因子の本体について検討したものである。

その結果、上記LPSは、大腸菌等の腸内細菌LPSと異なり、ヒト歯肉線維芽細胞の培養上清と細胞画分にTAFを誘導し、それらのTAF活性は上清画分ではIL-1 β とIL-6、細胞画分ではIL-1 α によってそれぞれ担われていることを初めて明らかにした。加えて、LPSの細胞画分TAFの誘導能に対する感受性は、ヒト腫瘍壊死因子やヒトインターフェロンの前処理によって著しく上昇することを見いだした。

以上のように、線維芽細胞が結合組織構成細胞としての機能に加えて、種々の刺激に応じてサイトカインを産生し、複雑な免疫機能調節系にも参画している可能性を示唆した三原丞二君の研究は、局所炎症の研究に新たな局面を開くものであり、歯学博士の学位請求に十分値するものと認める。