



Title	リンパ球との細胞間相互作用により誘導されるヒト歯肉線維芽細胞のサイトカイン mRNAの発現増強についての解析
Author(s)	日野, 栄二
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39816">https://hdl.handle.net/11094/39816</a>
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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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	ひのえいじ 野栄二
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第12433号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	リンパ球との細胞間相互作用により誘導されるヒト歯肉線維芽細胞の サイトカイン mRNA の発現増強についての解析
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 宏
	(副査) 教授 雉石 聰 助教授 小川 知彦 講師 藤原 卓

## 論文内容の要旨

辺縁性歯周炎はデンタルプラークにより惹起され歯周組織の破壊を来す慢性炎症性疾患であり、その炎症局所では病理組織学的にリンパ球を中心とした多数の炎症性細胞浸潤が認められる。これらの浸潤リンパ球は歯周組織を構成する細胞群とさまざまな細胞間相互作用を繰り広げ、歯周炎の病態形成に大きく関与しているものと考えられる。これまでの研究より、活性化したリンパ球は複数の接着分子を介してヒト歯肉線維芽細胞(HGF)に対する接着能を獲得することが明らかにされている。しかし、リンパ球とHGFとの細胞接着による細胞間相互作用が、互いの細胞機能にどのような影響を及ぼすのかは未だ明らかではない。HGFは単に歯周結合組織を構成するのみならず、種々のサイトカインを産生し、局所免疫応答、炎症反応の成立に大きな役割を果たしていると考えられる。そこで本研究では、サイトカインおよび、そのメッセンジャー RNA(mRNA)の発現誘導を指標にHGFとリンパ球との細胞接着に伴うHGF活性化の可能性を検討した。

HGFは実験目的を理解し実験に参加することを応諾した健常人ボランティアからの健康歯肉組織の細切片よりoutgrowthしてきた細胞を、10%ウシ胎仔血清(FCS)加 $\alpha$ -MEM培地で継代培養した細胞をHGFとして実験に供した。リンパ球系の腫瘍細胞であるK562、Molt-4、Nalm-6、及びU937は10%FCS加RPMI1640培地で培養したものを実験に供した。HGFはコンフルエントにしたHGF単層上にリンパ球系細胞を添加し共培養することにより、あるいは濾過膜を介して隔離培養することにより、またリンパ球系細胞とHGFとの共培養後に回収した培養上清を無処理のHGFに添加することにより刺激した。HGFから抽出された全RNA中のサイトカイン mRNA発現量はReverse Transcription-Polymerase Chain Reaction法( RT-PCR 法)により半定量的に検出された。HGFおよびその培養上清中に含まれるサイトカインの定性および定量はサイトカイン特異的な免疫組織化学染色法およびELISA法により行った。

その結果、HGFは種々のリンパ球系細胞と共に培養される事によりIL-1 $\beta$ mRNAの発現を増強した。しかしHGFをK562と濾過膜を介して隔離培養したり、共培養時の培養上清をHGFに添加して培養しても、HGF中にIL-1 $\beta$ mRNAの発現増強は認められなかった。HGFとK562との共培養時にIL-1 $\beta$ を外来性に同時添加すると、それぞれ単独に刺激した場合に比べてIL-1 $\beta$ mRNA発現は著しく増強された。同様にしてHGFとK562と共に培養することにより、IL-1 $\alpha$ 、およびIL-6mRNAの発現増強がHGF中に認められた。またこの発現増強はHGFとK562との共培養上清添加では誘導されなかった。さらにK562と共に培養されたHGFは免疫組織化学染色法

により抗-ヒト IL-1  $\beta$  抗体にて染色された。また K562 と共に培養された HGF の培養上清には、HGF 単独の培養上清と比較し、IL-6 産生が増大していることが ELISA 法により認められた。

炎症歯周組織では、血管外へ遊走してきた各種炎症性細胞が歯周結合組織構成細胞との間でサイトカイン等の液性因子や細胞間接着を介して相互作用している事が想定される。本研究では接着性相互作用による細胞活性化の機構に着目し、リンパ球系細胞を HGF と共に培養することにより HGF が活性化されるかどうかをサイトカイン mRNA の発現を指標に検討した。異種細胞を共培養するという実験系でサイトカインの産生細胞を明確にするために RT-PCR 法による mRNA レベルでの検出を試みたところ、リンパ球系細胞との共培養により HGF 中に IL-1  $\alpha$ 、 $\beta$ 、および IL-6 mRNA の発現量の増加が誘導された。また共培養時に採取した培養上清による刺激では HGF 中に IL-1  $\alpha$ 、 $\beta$ 、および IL-6 mRNA の発現増強は認められなかった。これらの事から両細胞間の接着が HGF の活性化に重要な役割を果たしている事が強く示唆された。この共培養系に IL-1  $\beta$  を添加するとさらに強い IL-1  $\beta$  mRNA 発現が HGF 中に検出された事から今回明らかにされた接着性相互作用による HGF の活性化機構が *in vivo* においてはサイトカインの作用により増強される形で働いている可能性が考えられる。今回の実験結果より、炎症歯周組織において近接して位置するリンパ球と HGF が細胞間接着を介しても相互作用し、その結果引き起こされる HGF の活性化が歯周病の病態の形成に関与している可能性が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

本論文は、炎症部位における細胞間相互作用を *in vitro* のモデル系を用いて検討したものである。その結果、リンパ球系細胞との接着性細胞間相互作用により歯肉線維芽細胞が活性化され、IL-1  $\beta$ 、IL-6 の発現がメッセンジャー RNA レベルならびに蛋白レベルで増強されることを明らかにした。さらにこの接着性相互作用が外因性 IL-1  $\beta$  刺激により誘導される歯肉線維芽細胞の IL-1  $\beta$  発現を相乗的に高めることも示した。

これらの知見は歯周炎の病態を理解する上で有益な手がかりとなるものであり、本業績は博士（歯学）の学位請求に値するものと認められる。