



|              |  |
|--------------|--|
| Title        | 歯周組織における炎症制御および再生過程にアディポネクチンが与える影響   |
| Author(s)    | 岩山, 智明   |
| Citation     | 大阪大学, 2011, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/58428">https://hdl.handle.net/11094/58428</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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">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

【42】

|              |  |
|--------------|--|
| 氏 名          | 岩 山 智 明  |
| 博士の専攻分野の名称   | 博 士 (歯 学)  |
| 学 位 記 番 号    | 第 2 4 4 9 9 号  |
| 学位 授 与 年 月 日 | 平成 23 年 3 月 25 日   |
| 学位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当<br>歯学研究科分子病態口腔科学専攻                          |
| 学 位 論 文 名    | 歯周組織における炎症制御および再生過程にアディポネクチンが与える<br>影響                   |
| 論 文 審 査 委 員  | (主査)<br>教 授 村上 伸也<br>(副査)<br>教 授 脇坂 聰 講 師 佐藤 淳 講 師 相川 友直 |

## 論文内容の要旨

### 【研究目的】

近年、脂肪組織の蓄積を基盤とするメタボリックシンドロームと歯周病の関連性が報告されている。しかしながら、その細胞生物学的および分子生物学的メカニズムについてはほとんど解明されていない。一方、脂肪細胞由来の生理活性物質であるアディポネクチン (ApN) は、体重増加に伴い、その血中濃度が減少することが知られ、糖尿病や動脈硬化に関連しているのみならず、炎症や酸化ストレスの抑制、さらには骨芽細胞分化に関与していることが報告されている。しかしながら、歯周病病巣局所において、ApN がいかなる影響を及ぼすかについて未だ詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、歯周組織における炎症制御および再生過程に ApN が及ぼす影響を解明することを目的として、歯周局所における炎症反応や免疫応答に積極的に関与することが知られている歯肉線維芽細胞に着目し、*in vitro* にて歯肉線維芽細胞の各種炎症性サイトカイン発現が、ApN によりどのように制御されるのか検討し、さらにその作用機序について詳細に解析した。次いで、歯周組織再生過程において重要な役割を果たすことが示されている歯根膜細胞を *in vitro* にて硬組織形成細胞への分化誘導を行い、その分化過程における ApN の作用について検討を行った。

### 【材料および方法】

#### 1) 細胞 :

①インフォームドコンセントを得られた患者からヒト歯肉組織、歯根膜組織を採取し、初代培養を行い、得られた細胞をそれぞれ、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF)、ヒト歯根膜細胞 (HPDL) とした。同様にヒト歯肉上皮組織を採取し、初代培養を行い、得られた細胞を遺伝子導入により不死化して得られた細胞をヒト歯肉上皮細胞 (HGE) とした。②BALB/c マウスから歯肉組織、歯根膜組織を採取し、初代培養を行い、得られた細胞を限界希釈法にてクローニングすることで樹立した細胞株をそれぞれ、マウス歯肉線維芽細胞株 (MGF)、マウス歯根膜細胞株 (MPDL) とした。

#### 2) 歯周組織構成細胞における ApN および ApN 受容体 1, 2 (AdipoR1, 2) の発現解析 :

HGF, HPDL, HGE, MGF, MPDL 中の *ApN* および *AdipoR1*, *AdipoR2* mRNA を RT-PCR 法にて検討し、さらに同タンパク発現をウェスタンブロッティング法にて検討した。

#### 3) HGF における ApN の抗炎症作用の解析 :

HGF を ApN (0.05~10 µg/ml) 存在あるいは非存在下にて 18 時間培養後、IL-1β (0.001~1 ng/ml) にて 2.5 時間刺激し、HGF 中の *IL-1β*, *IL-6*, *IL-8*, *MCP-1*, *TNFα* の mRNA 発現を Real-Time PCR 法にて検討し、さらに培養上清中の IL-6, IL-8 タンパク量を ELISA 法にて検討した。

#### 4) ApN の炎症性サイトカイン産生抑制作用発現における AdipoR の関与の解析 :

MGF を ApN (1~20 µg/ml) 存在あるいは非存在下にて 18 時間培養後、IL-1β (0.1 ng/ml) にて刺激し、MGF 中の *IL-1β*, *IL-6* の mRNA 発現を Real-Time PCR 法にて検討した。さらに MGF に si AdipoR1 もしくは si AdipoR2 を用いて、その mRNA 発現を knock down したのち、ApN (20 µg/ml) 存在あるいは非存在下にて 18 時間培養後、IL-1β (0.1 ng/ml) を用いて 2 時間刺激し、MGF 中の *IL-6* mRNA 発現を Real-Time PCR 法にて検討した。

#### 5) IL-1β 刺激により誘導される遺伝子発現に対して ApN が及ぼす影響の網羅的解析 :

HGF を ApN (5 µg/ml) 存在あるいは非存在下にて 18 時間培養後、IL-1β (0.1 ng/ml) にて 2.5 時間刺激し、HGF 中の遺伝子発現を Agilent Technologies 社の Whole Human Genome Array (4x44K) ver.2.0 を用いて、網羅的に解析した。得られたシグナル値について 2 群間の有意差検定を行い、IL-1β 刺激により誘導される遺伝子群のうち、ApN 前処理により抑制される遺伝子群を抽出した。さらにこの

抽出した遺伝子群を Ingenuity Pathway Analysis ソフトウェアを用いて機能分類を行った。

#### 6) HPDL の硬組織形成細胞への分化能に対する ApN の影響

HPDL を ApN (10 µg/ml) 含有もしくは非含有の石灰化誘導培地 (10 mM β-グリセロリン酸、50 µg/ml アスコルビン酸含有 10 %ウシ胎仔血清添加α-MEM) にて長期培養を行い、そのアルカリフォスファーゼ (ALP) 活性と石灰化関連遺伝子である *ALP*, *RUNX2* mRNA の発現変動について経時的に解析を行った。さらに培養 18 日目において HPDL による石灰化ノジュール形成をアリザリンレッド S 染色にて検討した。

### 【結果】

- 1) HGF, HPDL, HGE, MGF, MPDL 中に *AdipoR1*, *AdipoR2* mRNA および同タンパク発現を認めた。
- 2) IL-1β 刺激による HGF 中の *IL-6*, *TNFα*, *IL-1β*, *IL-8* mRNA 発現上昇は、ApN により抑制を認めた。*MCP-1* mRNA 発現上昇には影響を認めなかった。その抑制効果は ApN 濃度依存的であることが明らかとなった。さらに IL-1β 刺激による HGF の培養上清中の IL-6, IL-8 タンパク量の増加は、ApN により抑制を認めた。
- 3) IL-1β 刺激による MGF 中の *IL-6* mRNA 発現上昇は、ApN により抑制を認めた。その抑制効果は si *AdipoR1* により減弱を認めたが、si *AdipoR2* においては影響を認めなかった。
- 4) IL-1β 刺激により誘導される遺伝子群のうち、ApN 前処理により抑制される遺伝子が 112 個同定され、この 112 個の遺伝子の詳細な解析の結果、炎症性サイトカイン発現が抑制されるばかりでなく、細胞増殖・細胞周期や細胞接着に関する遺伝子群が変動することが明らかとなった。
- 5) HPDL を ApN 含有石灰化誘導培地にて培養した場合、ApN 非含有石灰化誘導培地にて培養した場合に比べ、ALP 活性の有意な増加を認め、*ALP*, *RUNX2* mRNA の有意な発現上昇を認めた。さらに石灰化ノジュール形成の有意な亢進を認めた。

### 【結論および考察】

本研究により、ApN は歯肉線維芽細胞において抗炎症作用を有することが示され、その作用の一部は、*AdipoR1* を介することが示唆された。さらに、ApN は歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促進していることが示された。健常者では脂肪細胞から ApN が産生され、血中や歯周組織局所においても正常濃度での ApN が存在することで、外来刺激に対する *AdipoR1* を介した炎症抑制効果を有しているが、メタボリックシンドロームに陥り、歯周組織局所においても ApN 濃度が減少すると、外来刺激に対する歯肉線維芽細胞の炎症性サイトカイン発現が増加し、歯周組織の破壊が進行しやすくなると考えられる。また、破壊された歯周組織の治癒・再生過程において、ApN が正常濃度で存在する場合は歯周組織の再生効果が期待されるが、ApN が歯周組織局所において減少すると、歯根膜細胞による歯周組織の治癒・再生が起こりにくくなると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、歯肉線維芽細胞の炎症制御機構および歯根膜細胞の分化能に及ぼすアディポネクチンの影響について検討を行ったものである。その結果、アディポネクチンはアディポネクチン受容体1を介して歯肉線維芽細胞の炎症性サイトカイン発現を制御することが