

Title	顎骨腫瘍・嚢胞が産生するTGF- $\beta$ およびIL-1 $\alpha$ は間質線維芽細胞の破骨細胞誘導因子発現を促進する
Author(s)	山田, 智明
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58436">https://hdl.handle.net/11094/58436</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	やま だ ち あき 明 山 田 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 6 5 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 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	顎骨腫瘍・嚢胞が産生する TGF- $\beta$ および IL-1 $\alpha$ は間質線維芽細胞の破骨細胞誘導因子発現を促進する
論文審査委員	(主査) 教授 古郷 幹彦 (副査) 教授 古川 惣平 准教授 西村 理行 講師 中澤 光博

## 論文内容の要旨

### 【研究目的】

近年の研究から、炎症性・腫瘍性を問わず全ての骨吸収性疾患に破骨細胞誘導因子、receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) の関与が示唆されている。歯胚発達に関わる研究結果からは、歯原性上皮が産生するサイトカインが歯胚周囲に存在する骨芽細胞での RANKL を誘導し破骨細胞形成を促進することが報告されている。顎骨に発生する腫瘍性・嚢胞性疾患としてエナメル上皮腫、角化嚢胞性歯原性腫瘍 (Keratocystic Odontogenic Tumor; KCOT)、濾胞性歯嚢胞が代表的な疾患であり、これらは歯胚上皮細胞を発生母地とし周囲の顎骨を吸収し増大する。しかし、その骨吸収メカニズムは古くから提唱されている嚢胞裏装上皮細胞の増殖と嚢胞内容液による圧迫性吸収が広く受け入れられているに過ぎない。そこで、歯胚歯原性上皮細胞に由来する歯原性腫瘍・嚢胞上皮細胞が産生するサイトカインも発達過程の歯胚と同様に RANKL を介した破骨細胞形成を促進することで骨吸収、骨破壊をきたし、腫瘍や嚢胞の増大のメカニズムの一つとなると考え、歯原性腫瘍・嚢胞上皮が産生するサイトカインが破骨細胞形成を促進するか、そしてその分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、間質線維芽細胞での RANKL 発現機序を解析した。

### 【材料及び方法】

1) 検体、試料の研究使用への供託につき、同意の得られた患者の歯原性腫瘍・嚢胞 (KCOT、エナメル上皮腫及び濾胞性歯嚢胞) より内容液を穿刺吸引し、遠心分離の後、フィルター滅菌処理し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。以下、内容液とする。間質線維芽細胞は抽出した歯原性腫瘍・嚢胞より分離、培養し 2～9 継代のものを使用した。

2) 間質線維芽細胞の RANKL、OPG 発現に対する内容液の影響を検討した。間質線維芽細胞に内容液、酸処理した内容液、transforming growth factor-beta1 (TGF- $\beta$ 1) 及び interleukin-1 alpha (IL-1 $\alpha$ ) を加え培養し、全 RNA を抽出し RANKL、OPG 発現を RT-PCR 法で検討した。一部の実験では TGF- $\beta$  中和抗体、TGF- $\beta$  受容体阻害剤 (SB-505124)、IL-1 受容体拮抗剤 (IL-1Ra)、選択的シクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) 阻害剤 (CAY10404) で前処理し、RANKL、OPG 発現を検討した。内容液の酸処理は 12M HCl で 30 分  $4^{\circ}\text{C}$  の酸処理の後、10M NaOH で中和し用いた。

3) 歯原性腫瘍・嚢胞内容液中の TGF- $\beta$ 、IL-1 $\alpha$  濃度は ELISA 法にて測定した。

4) TGF- $\beta$  および IL-1 $\alpha$  による間質線維芽細胞での RANKL 誘導機序の解析を行った。間質線維芽細胞に内容液、TGF- $\beta$ 、IL-1 $\alpha$  を添加し、リン酸化 Smad3、および COX-2 タンパクを全細胞タンパクのウエスタンブロット法にて検討した。また、その培養上清中の prostaglandin E2 (PGE2) 濃度を ELISA 法にて検討した。

5) 歯原性腫瘍・嚢胞組織のパラフィン切片で TGF- $\beta$ 、リン酸化 Smad3、COX-2、RANKL の局在を免疫組織化学染色法にて検討した。

### 【結果及び考察】

KCOT 内容液は間質線維芽細胞での RANKL 発現を著明に誘導し、OPG 発現を変化させなかった。複数の内容液でも同様の結果を認めた。また内容液の酸処理により RANKL 発現は増強されたことから、TGF- $\beta$  が内容液中に含まれている可能性が示唆された。そこで TGF- $\beta$  1 の間質線維芽細胞での RANKL 発現に対する効果を検討すると、濃度依存性に RANKL 発現を誘導した。KCOT 内容液による RANKL 発現誘導は TGF- $\beta$  中和抗体あるいは TGF- $\beta$  受容体阻害剤にて部分的に抑制され、さらに KCOT 内容液は間質線維芽細胞の Smad3 をリン酸化した。つまり KCOT 内容液中の TGF- $\beta$  が間質線維芽細胞での RANKL 発現を誘導する因子であることが明らかとなった。しかし同時に RANKL 発現を誘導する他因子の存在も示唆されたため、内容液に含まれていると既に報告のある IL-1 $\alpha$  に着目した。IL-1 $\alpha$  も同様に濃度依存性に RANKL 発現を誘導した。KCOT 内容液の RANKL 発現は TGF- $\beta$  受容体阻害剤及び IL-1 受容体拮抗剤の併用で完全に抑制された。このことから、内容液中の TGF- $\beta$  と IL-1 $\alpha$  の 2 因子が間質線維芽細胞の RANKL 発現を誘導する因子であることが明らかとなった。実際に内容液中の TGF- $\beta$  及び IL-1 $\alpha$  の濃度は著しく高濃度であった。

次に RANKL 発現を促進する経路として COX-2・PGE2 経路を検討した。TGF- $\beta$  は線維芽細胞の COX-2 タンパクを変化させなかったが、IL-1 $\alpha$  は上昇させた。また、TGF- $\beta$  と IL-1 $\alpha$  の併用で COX-2 タンパクは相乗的に上昇した。KCOT 内容液も COX-2 タンパクを強く上昇させ、その効果は TGF- $\beta$  受容体阻害剤では抑制されず、IL-1 受容体拮抗剤では完全に抑制された。この COX-2 タンパク量と一致して PGE2 合成も TGF- $\beta$  では増加せず、IL-1 $\alpha$  で増加し、両者の併用で PGE2 合成は相乗的に増加した。KCOT 内容液もしくは TGF- $\beta$  で誘導される RANKL 発現は、選択的 COX-2 阻害剤で完全に抑制されず、IL-1 $\alpha$  で誘導される RANKL 発現は COX-2 阻害剤で完全に抑制された。つまり、KCOT 内容液は少なくとも二つの経路で RANKL 発現を誘導することが示唆された。一つは IL-1 受容体を介した COX-2・PGE2 経路、もう一つは TGF- $\beta$  受容体を介し、COX-2 を介さない経路であった。そして、IL-1 受容体を介した経路は TGF- $\beta$  受容体を介した経路により増強されることが示された。

KCOT およびエナメル上皮腫の組織で TGF- $\beta$  は、上皮細胞と浸潤リンパ球に強陽性、間質に弱陽性、リン酸化 Smad3 は上皮細胞、間質線維芽細胞、浸潤リンパ球の核に陽性、また、RANKL

タンパクは浸潤リンパ球に強陽性、上皮細胞、間質に弱陽性であった。このことから歯原性上皮細胞が TGF- $\beta$  を産生し周囲組織でシグナル伝達が引き起こされ、RANKL タンパクも歯原性腫瘍・嚢胞組織内で発現していることが示された。

以上の実験結果より、歯原性腫瘍および嚢胞上皮細胞が産生するサイトカイン、TGF- $\beta$  および IL-1 $\alpha$  は、間質線維芽細胞の RANKL 発現を誘導し破骨細胞形成を促進することで、顎骨吸収に関与する可能性が示された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は破骨細胞形成促進に関わる歯原性腫瘍・嚢胞上皮産生サイトカインの関与と、その分子メカニズムを明らかにする目的で、角化嚢胞性歯原性腫瘍、エナメル上皮腫および濾胞性歯嚢胞の間質線維芽細胞での RANKL 発現機序を解析した。

その結果、TGF- $\beta$  と IL-1 $\alpha$  の 2 因子が間質線維芽細胞の RANKL 発現を誘導する因子であることを明らかにした。更に IL-1 受容体を介した COX-2 - PGE2 経路と TGF- $\beta$  受容体を介する経路の 2 つが存在し、IL-1 受容体を介した経路は TGF- $\beta$  受容体を介した経路により増強されることを示した。

本研究は、今後の歯原性腫瘍・嚢胞の骨吸収メカニズムに関する研究に対し有用な基礎的情報を提供するものであり、博士（歯学）の学位申請に値するものである。