



Title	頸骨腫瘍・囊胞が産生する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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 【8】

氏名	山田智明
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第24465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	頸骨腫瘍・囊胞が產生する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 準教授 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、歯原性上皮が產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。頸骨に產生する腫瘍性・囊胞性疾患としてエナメル上皮腫、角化囊胞性歯原性腫瘍 (Keratocystic Odontogenic Tumor; KCOT)、濾胞性歯囊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頸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囊胞裏装上皮細胞の増殖と囊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・囊胞上皮細胞が產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、腫瘍や囊胞の増大のメカニズムの一つとなると考え、歯原性腫瘍・囊胞上皮が產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・囊胞 (KCOT、エナメル上皮腫及び濾胞性歯囊胞) 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°Cで保存した。以下、内容液とする。間質線維芽細胞は摘出した歯原性腫瘍・囊胞より分離、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°Cの酸処理の後、10M NaOHで中和し用いた。

3) 歯原性腫瘍・囊胞内容液中の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プ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・囊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つた。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つた。しかし同時にRANKL発現を誘導しう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つた。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つたが、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瀘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。