



Title	ヒト歯根膜線維芽細胞におけるIL-17, IL-1 β およびIL-6刺激によるMMP-1発現の動態
Author(s)	柴田, 美佳
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59266
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 >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

【42】

氏 名	柴 田 美 佳 ^{しば た み か}
博士の専攻分野の名称	博 士（歯学）
学 位 記 番 号	第 2 5 0 5 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 24 年 3 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学 位 論 文 名	ヒト歯根膜線維芽細胞における IL-17, IL-1 β および IL-6 刺激による MMP-1 発現の動態
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 高 田 健 治 (副査) 教 授 天 野 敦 雄 准教授 林 美加子 講 師 山 田 聡

論 文 内 容 の 要 旨

[研究目的]

歯の矯正移動では、歯根膜内に急性の炎症反応が生じ、炎症性細胞のみならず線維芽細胞や骨芽細胞から産生された Interleukin (以下 IL) -1 β , IL-6 などの炎症性サイトカイ

ンが、歯周組織リモデリングの調節機構の一端を担っている。歯根膜線維芽細胞（以下 PDLF）において、IL-1 β は matrix metalloproteinase（以下 MMP）-1 の mRNA 発現を増加させることから、IL-1 β は歯根膜組織の主な構成成分であるコラーゲンの分解にも関与していると考えられる。

一方、圧縮刺激下の MC3T3-E1 細胞において *IL-17* mRNA 発現が増加することから、歯根膜内でも機械的応力により *IL-17* mRNA 発現が増加すると推測される。IL-17 は、関節リウマチや歯周炎などの炎症部位で発現が増加し、滑膜線維芽細胞ならびに歯肉線維芽細胞の IL-6、IL-8 の発現を促進する。また、若年性特発性関節炎患者では滑液中の IL-17 量の増加がみられ、滑膜線維芽細胞において IL-17 添加による MMP-1 量ならびに MMP-3 量の増加が報告されている。歯根膜は硬組織間に存在し細胞外基質が豊富であるという組織学的特徴とメカニカルストレスを緩衝するという機能的特徴が関節と類似していることから、歯根膜においても、メカニカルストレスとそれに伴う炎症反応によって産生された IL-17 が、炎症性サイトカインの発現や細胞外基質の分解に作用する可能性が考えられる。

本研究では、歯根膜におけるコラーゲン分解の分子機構の解明を目的とし、PDLF における IL-17 による IL-1 β 、IL-6 ならびに MMP-1 の発現動態と、IL-1 β および IL-6 の MMP-1 発現に及ぼす相互作用について検討した。

[材料と方法]

1. 細胞

ヒト歯根膜線維芽細胞 (CellResearch Corporation Pte Ltd, Singapore) を用いた。

2. IL-17 刺激下での IL-6、IL-1 β ならびに MMP-1 の発現解析

PDLF に recombinant human（以下 rh）IL-17 (10ng/ml) を添加後、経時的に細胞および培養上清を回収した。

① *IL-6*、*IL-1 β* 、*MMP-1* mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて検討した。

② 培養上清中の IL-6、IL-1 β 、MMP-1 タンパク量を ELISA 法にて測定した。

3. IL-1 β および IL-6/sIL-6R 刺激下での MMP-1 の発現解析

rhIL-1 β (0.25ng, 2.5ng, 25ng/ml), rhIL-6 (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml) /sIL-6R (100ng/ml), rhIL-1 β (0.25ng, 2.5ng, 25ng/ml) +rhIL-6 (10ng/ml) /sIL-6R (100ng/ml) を添加し、24 時間後に細胞および培養上清を回収した。

① *MMP-1* mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて比較検討した。

② 培養上清中の MMP-1 タンパク量を ELISA 法にて測定した。

4. 統計解析

マン・ホイットニーの U 検定を用い、有意水準 5%にて検定した。

[研究成績]

1. IL-17 添加後 1, 4, 24, 48 および 72 時間後の *IL-6* mRNA 発現量は有意に増加した。24 時間後に発現量の減少傾向が認められたが、48 および 72 時間後に再び発現量の増加が認められた (n=4)。IL-6 タンパク量は IL-17 添加後 0.5 および 1 時間後は変化が認められなかったが、4, 24, 48 および 72 時間後に有意に増加し、4 時間後以降は時間の経過とともに増加する傾向が認められた (n=4)。
2. IL-17 添加後 1, 4 および 24 時間後の *IL-1 β* mRNA 発現量は有意に増加したが、48, 72 時間後の *IL-1 β* mRNA 発現量は control と比較して変化が認められなかった (n=4)。
3. *MMP-1* mRNA 発現量は IL-17 添加後 4 時間までは変化が認められなかったが、24 時間後以降は時間の経過とともに増加する傾向が認められ、48 および 72 時間後に有意な増加が認められた (n=4)。MMP-1 タンパク量は、24 時間後以降で時間の経過とともに増加する傾向が認められ、IL-17 添加後 72 時間後に有意に増加した (n=4)。
4. IL-1 β および IL-1 β +IL-6 の添加によって、*MMP-1* mRNA 発現量および MMP-1 タンパク量が有意に増加した (n=4)。
5. 低濃度 (0.25ng/ml) の IL-1 β 刺激下では、IL-6 の添加により *MMP-1* mRNA の発現が有意に増加した (n=4)。
6. IL-6 の添加によって、*MMP-1* mRNA 発現量に有意な変化は認められなかった (n=4)。

[考察と結論]

PDLF において IL-17 が IL-6 ならびに MMP-1 の発現を経時的に促進することが明らかとなった。また、IL-6 は単独では MMP-1 の発現を促進させないものの、IL-1 β による MMP-1 発現について相乗的かつ IL-1 β の濃度依存的に関与していることが示唆された。

以上の結果より、IL-17 は、直接的に MMP-1 の発現を増加させるとともに、IL-6 発現を促進することで間接的に MMP-1 の発現に作用し、歯根膜におけるコラーゲン分解を促進することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

歯根膜線維芽細胞において IL-17 が IL-6 ならびに MMP-1 の発現を経時的に促進することが明らかとなった。また、IL-6 は単独では MMP-1 の発現を促進させないものの、IL-1 β による MMP-1 発現について相乗的かつ IL-1 β の濃度依存的に関与していることが示唆された。以上の結果より、IL-17 は、直接的に MMP-1 の発現を増加させるとともに、IL-6 発現を促進することで間接的に MMP-1 の発現に作用し、歯根膜におけるコラーゲン分解を促進することが示唆された。

本研究は、歯根膜におけるコラーゲン分解の分子機構を解明する上で重要な知見を与え

るものである。よって、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。