

Title	歯肉線維芽細胞の機能発現に及ぼすアデノシンの影響の解析
Author(s)	橋川, 智子
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3143891">https://doi.org/10.11501/3143891</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名	橋 川 智 子
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 13777 号
学位授与年月日	平成10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専攻
学位論文名	「歯肉線維芽細胞の機能発現に及ぼすアデノシンの影響の解析」
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 宏  (副査) 教授 米田 俊之    講師 岩本 容泰    講師 前田 定秋

#### 論文内容の要旨

炎症反応はサイトカインをはじめとする種々の炎症メディエーターや細胞間の相互作用による制御を受けると考えられている。我々の研究室では歯肉線維芽細胞（以下 HGF と略す）が炎症歯周組織においてリンパ球との相互作用や炎症性サイトカイン・細胞外基質の産生調節を介して同部の炎症反応に積極的に関わっている可能性をこれまでに明らかにしている。近年、プリン代謝産物のひとつであるアデノシンが抗炎症的なメディエーターの1つとして重要な役割を果たしていることが *in vivo*, *in vitro* の実験を通じて報告されている。しかしながら、歯周病炎症局所においてアデノシンが如何なる機能を担っているかはいまだ検討されてはいない。上述した HGF の細胞機能に対してアデノシンが如何なる影響をおよぼすかを解明することは歯周病の病態を明らかにする上で有益な情報を提供するものと考えられる。そこで本研究では HGF による炎症性サイトカイン、各種細胞外基質およびヒアルロン酸 (HA) 合成酵素 mRNA の発現および細胞接着分子発現にアデノシンがいかなる影響を及ぼすかについて検討した。さらに、HGF によるアデノシンレセプターの発現をサブタイプ別に mRNA レベルで検討した。

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康人ボランティアより健康辺縁歯肉を採取し、これより増殖してきた細胞を継代培養し HGF として実験に供した。培養は 10% FCS 加  $\alpha$  MEM を用い 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で行い、実験には 3-9 代までの継代細胞を用いた。T 細胞の調製は健康人末梢血より比重遠心法により分離した単核球をノイラミニダーゼ処理したヒツジ赤血球とのロゼット形成法にて分画、回収しこれを T 細胞とした。HGF の刺激には *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) 由来 LPS およびヒトリコンビナント IL-1 $\beta$  を用いた。また、アデノシン、アデノシンレセプターアゴニストとして 2-CHLOROADENOSINE (2-CADO), アデノシンレセプターアンタゴニストとして XANTHINE AMINE CONGENER (XAC) を用いた。単クローン抗体として 84H10 (抗-ICAM-1), 4-145 (抗-インテグリン $\beta$ 1), OS/37 (抗-CD44) を実験に供した。HGF 上に発現する細胞接着分子は HGF を種々の細胞接着分子に対する単クローン抗体、続いて FITC 化したヤギ抗マウス IgG 抗体と反応させ、フローサイトメーターを用いてそれら細胞表面抗原の発現状況を解析した。T リンパ球と HGF との接着は、24 穴プレート内でコンフルエントにした HGF 上に <sup>51</sup>Cr 標識した T リンパ球 (1 X 10<sup>5</sup>) を添加し、30 分間培養を行い HGF に接着した T リンパ球の放射活性を測定することにより評価した。サイトカイン、各種細胞外基質、HA 合成酵素ならびにアデノシンレセプターの検出は Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により検出した。すなわち、各種細胞より全 RNA を精製し M-MuLV reverse transcriptase による逆転写反応

の後、Taq polymerase 及び IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , HA 合成酵素, A1, A2a, A2b, A3 タイプ アデノシンレセプター特異的プライマーを用いて PCR を行い、エチジウムブロマイド染色により PCR 産物を検出した。

まずはじめに、HGF による炎症性サイトカイン mRNA 発現に及ぼすアデノシンの影響を RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、P.g. 由来 LPS の刺激により、HGF 中の TNF $\alpha$  および IL-1 $\beta$  mRNA の発現量が著明に増加することが確認され、その発現量の増加はアデノシンレセプターアゴニストである 2-CADO およびアデノシンによる刺激により抑制された。さらに 2-CADO およびアデノシンによる TNF $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  mRNA の発現抑制効果はアデノシンレセプターアンタゴニストである XAC により競合的に抑制されることが確認された。一方、P.g. 由来 LPS 刺激により HGF 中の IL-1 $\alpha$ , IL-6 mRNA の発現量も著明に増加したが、その発現量は 2-CADO 刺激によりほとんど影響を受けなかった。また、LPS の刺激だけでなく、IL-1 $\beta$  刺激により HGF 中の TNF $\alpha$  および IL-1 $\beta$  mRNA の発現量が著明に増加することが確認され、その発現量の増加もまた 2-CADO により抑制された。次に HGF の細胞外基質産生におよぼすアデノシンの影響を検討する目的で、HGF 中のコラーゲンタイプ I・タイプ III, ラミニン, フィブロネクチンの恒常的な mRNA 発現に対するアデノシン刺激の影響を検討した。その結果、上記細胞外基質の HGF における mRNA 発現はアデノシン刺激によりほとんど影響を受けなかった。一方、HA 産生に関与する HA 合成酵素 mRNA は 2-CADO およびアデノシンの添加により、無刺激の場合に比較して著明にその発現が増強され、その発現増強は XAC の添加により抑制された。さらにリンパ球の炎症歯周組織への定着・集積に関与する HGF 上の細胞接着分子の発現に対して、アデノシンが如何なる影響を及ぼすかについてフローサイトメーターを用いて検討を加えた結果、IL-1 $\beta$  刺激により誘導される HGF 上の ICAM-1 分子の発現増加がアデノシンを同時添加することによりほぼ完全に抑制されることが明らかにされた。そこで、IL-1 $\beta$  刺激 HGF と phorbol 12-myristate 13-acetate 刺激された T リンパ球との異種細胞間接着にアデノシンが如何なる影響を及ぼし得るのかを検討するために、HGF をアデノシンで前処理した後、細胞接着実験を行った結果、IL-1 $\beta$  刺激する際に同時にアデノシンを添加した場合、IL-1 $\beta$  刺激された HGF と活性化 T リンパ球との接着は抑制される傾向を示すことが確認された。HGF 上に発現するアデノシンレセプターサブタイプを検討する目的で、HGF 中のアデノシンレセプター A1, A2a, A2b, A3 mRNA の発現を RT-PCR 法により検討した結果、HGF 中には A1, A2a, A2b タイプのアデノシンレセプター mRNA の発現が認められた。しかしながら、A3 タイプのアデノシンレセプター mRNA は検出されなかった。以上の結果からアデノシンはアデノシン A1, A2a, A2b レセプターを介して、歯周病原性細菌による刺激で HGF 中に誘導される炎症性サイトカイン産生を抑制するのみならず、創傷治癒の初期過程に産生が亢進することが報告されているヒアルロン酸の産生制御にも関与していることが示唆された。またアデノシンは HGF 上の ICAM-1 分子の発現を調節し、さらにその結果、炎症歯周組織へのリンパ球の定着・集積を制御し得ることが示唆された。これらの結果から、炎症歯周組織における炎症反応の制御にアデノシンが関与し得る可能性が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究はアデノシンの抗炎症作用のメカニズムを歯周炎で想定される慢性炎症メカニズムを対象として検討したものである。その結果、*Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS および IL-1 $\beta$  刺激により誘導される歯肉線維芽細胞 (HGF) 中の TNF $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の mRNA 発現がアデノシンの添加により抑制されること、HGF 中のヒアルロン酸合成酵素の恒常的な mRNA 発現がアデノシン添加により増強されることが明らかにされた。また、IL-1 $\beta$  刺激により誘導される HGF 上の ICAM-1 分子の発現増加がアデノシンを同時添加することにより阻害され、その結果、同 HGF と活性化 T リンパ球との接着性細胞間相互作用が抑制されることが示された。さらに、A1, A2a, A2b サブタイプのアデノシンレセプター mRNA の発現が HGF 中に確認された。これらの知見は HGF の機能制御を介することによりアデノシンが抗炎症作用を炎症歯周組織において発揮し得る可能性を示唆するものであり、今後、歯周炎病巣局所での炎症反応の制御機構を明らかにする上で極めて有益な情報を提供するものと期待され、本研究は博士 (歯学) の学位請求に十分値するものと認める。