

メカニカルストレスによる
ラット歯肉における EMMPRIN の遺伝子発現

大久保 裕一郎

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座
(主指導教員：平岡 行博 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士（歯学）学位申請論文

Gene expression of EMMPRIN in rat gingival tissue
after the application of mechanical force

YUICHIRO OKUBO

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine
Matsumoto Dental University*

(Chief Academic Advisor : Professor B Yukihiko Hiraoka)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

要 旨

歯が機械的刺激を受けると、歯根膜だけでなく歯肉もさまざまな生化学的反応を引き起こす。その反応の主体は、細胞外マトリックス (extracellular matrix : ECM) の合成と分解であり、プロテアーゼとそれを制御する遺伝子の発現およびその変化としてとらえることができる筈である。特にマトリックス金属プロテアーゼ (matrix metalloproteinases : MMPs) の誘導は、ECM の構造に退行性変化をもたらす。私は炎症性サイトカインであるインターロイキン (interleukin : IL) -1 β と MMPs の関係を調べている過程で、エラスチックバンド挿入後のラット歯肉に、正常歯肉では認められなかった EMMPRIN (extracellu-

lar MMP inducer) が発現していることを見いだした。EMMPRIN は、癌細胞やそれに接する間質細胞に高発現し、MMPs の発現を亢進させて癌の浸潤や転移に関与すると考えられている膜結合性タンパク質である。しかし、EMMPRIN の非腫瘍組織における役割については不明の点が多い。そこで、メカニカルストレスによる歯肉における EMMPRIN 遺伝子発現の動態を *in vivo* で検討した。

本実験ではエラスチックバンド直下の歯間乳頭部の頬側歯肉を経時的に採取し、総 RNA を抽出して EMMPRIN, MMP-2, MMP-13 および IL-1 β の発現を RT-PCR 法と定量的リアルタイム PCR 法により分析した。

MMP-2 と MMP-13 は正常歯肉においても発

現が認められた。一方、EMMPRIN と IL-1 β は正常歯肉においては発現が認められなかったが、両者ともエラスチックバンド挿入後30分で発現した。定量的リアルタイム PCR 法による分析結果より、EMMPRIN は、早期応答型サイトカインである IL-1 β と同じく、急速に発現することがわかった。また、エラスチックバンド挿入後に IL-1 β と MMP-2 が著しく発現抑制を受けたが、EMMPRIN と MMP-2 の発現に相関性は認められなかった。

以上の結果から、歯肉のメカニカルストレス負荷初期において、EMMPRIN は MMPs の発現制御には関わっていないことが示唆された。また EMMPRIN は早期応答型サイトカインである可能性も示唆された。

緒 言

歯肉は歯頸部と歯槽骨の一部を被覆している軟組織で、異物や細菌などが組織内に侵入するのを防ぐとともに、歯を支持する役目を担っている。歯肉の細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) は主として I 型コラーゲンから成るが、他にマトリックス構造糖タンパク質とプロテオグリカンや脂質も存在する¹⁾。

歯肉結合組織中の主要な細胞は、線維芽細胞であり、ECM 成分を生産する一方でマトリックス金属プロテアーゼ (matrix metalloproteinases; MMPs) を生産することによって ECM を分解している。歯列矯正や補綴治療において、歯にメカニカルストレスが加わると歯肉組織もそれに伴う刺激を受け、細胞にさまざまな生化学的変化を引き起こす。これら細胞間応答反応は、ECM の損傷とその後の再生へのプロセスという2つの事象の生体反応であり²⁾、この反応の中心的役割を果たすのが MMPs である。MMPs は ECM のほとんどすべての成分を分解する能力を持っているが、MMP ファミリーの酵素による選択的な ECM 分解は、ECM に生理的あるいは病的変化を引き起こす^{2,3)}。

間質コラーゲナーゼ (ヒトでは MMP-1, ラットでは MMP-13, 本研究はラットを使用したため以下の記述では MMP-13 で表記する) は、細胞外の線維性コラーゲンを分解する重要なタンパク質分解酵素である。正常体温における I, II およ

び III 型コラーゲンの分解は、MMP-13 がコラーゲン分子を N 末端 3/4 と C 末端 1/4 に切断することによって開始される。この MMP-13 によるコラーゲン分子の切断は、ゼラチナーゼなどの MMPs によってさらにコラーゲンを分解するために必要不可欠な過程である⁴⁻⁶⁾。恒常性が維持されている間、コラーゲンの合成と分解は、コラーゲンと MMP 遺伝子の制御下にある。しかし、炎症や機械的刺激を受けた場合、インターロイキン (interleukin; IL)-1 をはじめとする様々なサイトカインが種々の細胞に作用し、MMPs の発現を調節していることが明らかにされつつある。例えば、Uematsu ら^{7,8)} は、矯正治療を受けた直後から、患者の歯肉溝浸出液中の IL-1 β 、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α ; TNF- α)、上皮成長因子 (epidermal growth factor)、トランスフォーミング成長因子 (transforming growth factor- β_1 ; TGF- β_1) の量が上昇し、治療期間を通じてこれが維持されることを先駆的に明らかにした。また、炎症性サイトカインと MMPs の関係については、口腔疾患におけるその重要性が指摘されている^{3,9)}。

さて、MMPs を誘導する分子としては EMMPRIN (extracellular MMP inducer) も知られている。発見当初 EMMPRIN は、MMP-1 産生を指標としていたことから tumor-derived collagenase stimulatory factor (TCSF) と呼ばれたが、精製されたこの因子は MMP-2, 3 産生も刺激すること、また正常ケラチノサイトもこの因子を発現していることから、EMMPRIN と改名された¹⁰⁻¹⁴⁾。表 1 に、生理的あるいは病理的組織再生の下で発現した EMMPRIN によって誘導される MMPs をまとめた。cDNA 配列の検索から、この分子は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通ドメインをもつ糖タンパク質であることが明らかになった (図 1)。同一と認められた分子種は、現在、CD 147 とまとめられ

表 1: EMMPRIN が発現を誘導すると報告されている MMPs

MMP-1 (間質コラーゲナーゼ)
MMP-2 (ゼラチナーゼ A, 72 kDa IV 型コラーゲナーゼ)
MMP-3 (ストロムライシン)
MMP-9 (ゼラチナーゼ B, 92 kDa IV 型コラーゲナーゼ)
MMP-14 (膜型 1-MMP; MT 1-MMP)
MMP-15 (膜型 2-MMP; MT 2-MMP)

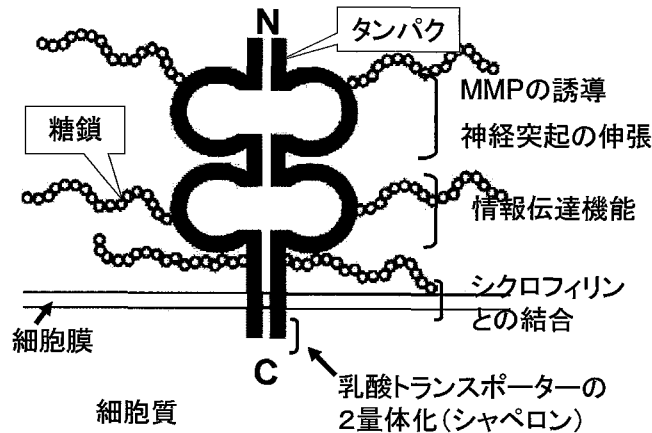


図1：EMMPRIN分子の模式図

EMMPRINは1回膜貫通ドメインをもった免疫グロブリンスーパーファミリーに属する糖タンパク質である。ヒト(アミノ酸270残基)の場合、細胞外に185残基、膜貫通ドメインが24残基および細胞内に39残基を配した27 kDaの膜結合型タンパク質である。糖鎖の修飾によって45~65 kDaの成熟タンパク質となり、二量体で存在する。ラット(アミノ酸273残基)とは、アミノ酸レベルで58.1%のホモロジーがある。

N末端部のドメインは、MMPsの誘導、神経突起の伸長を誘導、およびインテグリンとの結合などの生理作用に関わると考えられている。中間のドメインは、カベオリン(形質膜上の機能ドメインを形成する膜タンパク質)を介して脂質輸送や様々なシグナル伝達関連分子の機能制御にかかわると指摘されている。また細胞内のドメインでは、乳酸トランスポーターのシャペロン分子として作用する。また、糖鎖の量によって活性機能の差が認められる。このように、EMMPRINは多様な機能をもっているが、生理作用を含めて未解明の点が多い。

表2：ヒトEMMPRINと同一と認められた分子、および異種動物のホモログ*

ヒト	
EMMPRIN	(旧称 TCSF; tumor-derived collagenase stimulatory factor)
Basigin	網膜、精子の形成に関わる分子
M 6 抗原	白血球活性化抗原
Neurothelin	血液脳関門形成に関わる血管内皮細胞のマーカー
ラット	
OX-47	Tリンパ球に発現する抗原
CE 9	精子形成に関わる膜内在性糖タンパク質
マウス	
gp 42 (basigin)	胎生期脳で発現する糖タンパク質
トリ	
HT 7 (neurothelin)	血液脳関門特異的抗原

*文献12, 13を中心に作成

たが、この分子はMMPの発現誘導よりもむしろ生理的および病的過程で様々な機能を持つことが指摘されている(表2)^{12,13}。

EMMPRINは肺癌や乳癌において高発現するが、正常組織や良性腫瘍においては低発現であると報告されている¹⁵。また、腫瘍細胞はEMMPRINを発現するが、隣接する形質細胞はそれを発現しない一方、MMPsは腫瘍周囲の形質細胞に発現していることも報告された¹⁶。EMMPRINが関与するMMPs発現の制御に腫瘍細胞と形質細胞の接触が必須であるが、その作用

機序はまだ明らかになっていない。また、EMMPRINの非腫瘍組織における役割についても不明の点が多い。

私は炎症性サイトカインであるIL-1 β とMMPsの発現関係を調べている過程で、興味深いことにエラスチックバンド挿入後のラット歯肉に正常歯肉では認められなかったEMMPRINが高発現していることを見いだした。歯肉コラーゲンは皮膚コラーゲンに比べ代謝回転が3倍速いため¹⁷、歯肉は*in vivo*におけるECMリモデリングの研究に好材料である。そこで本研究は、歯肉

組織において EMMPRIN が MMPs の発現を亢進させているか、IL-1 β のそれと比較検討し、歯肉組織のリモデリングのメカニズムを解明することを目的とした。そのため本研究では、EMMPRIN とその制御下にある MMP-2、および IL-1 β とその制御下にある MMP-2 と MMP-13 の 4 つの遺伝子の発現関係を定性及びリアルタイム PCR による定量的分析によって比較検討した。

材料および方法

1. メカニカルストレス

12週齢(体重360~380 g)の Wistar 系雄性ラット (Nippon Bio-Supp. Cent., Tokyo, Japan) を実験に用いた。ペントバルビタール麻酔下 (0.5 ml/kg) で、短く切った矯正用エラスチックバンド (Chipmunk color pak; 径 1/8 インチ, 3・1/2 オンス, Ormco, Mexico) を Waldo 法¹⁸⁾ に準じて両側の上顎第二, 第三臼歯間に挿入した (図 2)。0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 48 および 72 時間後に、エラスチックバンド直下の歯間乳頭部頰側歯肉組織を採取し、液体チッ素で直ちに凍結させ -80℃ で保存した。対象の歯肉は同一ラットの下顎より採取した。各時間帯で 5 頭ずつ使用した。

2. 定性的 PCR (reverse transcription-polym- erase chain reaction ; RT-PCR)

歯肉組織からの総 RNA 抽出は、RNeasy Mini

Kit (QIAGEN Inc., CA, U.S.A.) を用いてマニュアルに従って行った。cDNA は、1 μ g の総 RNA を RTG You-Prime RXN beads (GE Healthcare UK Ltd., England) と poly-T (20mer) プライマーを使って合成した。PCR 用プライマーは、米国立医学図書館 (NLM) の生物工学情報センター (NCBI)・DNA データバンクから目的遺伝子の塩基配列を引用し、web サイトプログラム Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html) を用いて設計した (表 3)。DNA データバンクのアクセッション・ナンバーは以下の通りである。EMMPRIN (*EMMPRIN*; 斜体で遺伝子のシンボルを表す。以下略), NM_012783; MMP-2 (*MMP 2*), NM_031054; MMP-13 (*MMP 13*), M 60616; IL-1 β (*IL 1B*), M 98820; CD 14 (*CD 14*), NM_021744; β -actin,

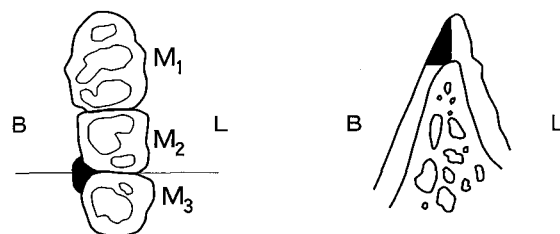


図 2 : エラスチック挿入の模式図

全身麻酔下において、ラットの両側の上顎第二, 第三臼歯間にエラスチックバンドを挿入し、その直下の歯間乳頭部頰側歯肉組織を経時的に採取した。左図は咬合面から見た組織採取部位を示した。右図は左図の実線での矢状断面図で、組織採取部位をそれぞれ黒塗りで示した。(B: 頰側, L: 舌側, M₁: 第 1 臼歯, M₂: 第 2 臼歯, M₃: 第 3 臼歯)

表 3 : プライマーの配列

遺伝子の名称 およびシンボル	該当部位	塩基配列	アニーリング 温度 (°C)	増幅サイズ (bp)
EMMPRIN	288-307	5'-GGCACCATCGTAACCTCTGT-3' (sense)	60.0	235
<i>EMMPRIN</i>	522-503	5'-CCACATTGATGTTGCCTCTG-3' (antisense)		
MMP-2	596-615	5'-CGCCCCTAAAACAGACAAAG-3' (sense)	51.5	273
<i>MMP 2</i>	868-847	5'-GTGTAACCAATGATCCTGTATG-3' (antisense)		
MMP-13	784-803	5'-TGGTCCAGGAGATGAAGACC-3' (sense)	60.0	204
<i>MMP 13</i>	987-968	5'-ACATGGTTGGGAAGTTCTGG-3' (antisense)		
IL-1 β	256-275	5'-CAGGAAGGCAGTGTCACTCA-3' (sense)	62.0	250
<i>IL 1B</i>	505-486	5'-TTTCAGCTCACATGGGTCAG-3' (antisense)		
CD 14	84-103	5'-TTGTTGCTGTTGCCTTTGAC-3' (sense)	60.0	213
<i>CD 14</i>	296-277	5'-CGTGTCCACACGCTTTAGAA-3' (antisense)		
β -actin	471-490	5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' (sense)	60.0	227
	697-678	5'-TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG-3' (antisense)		

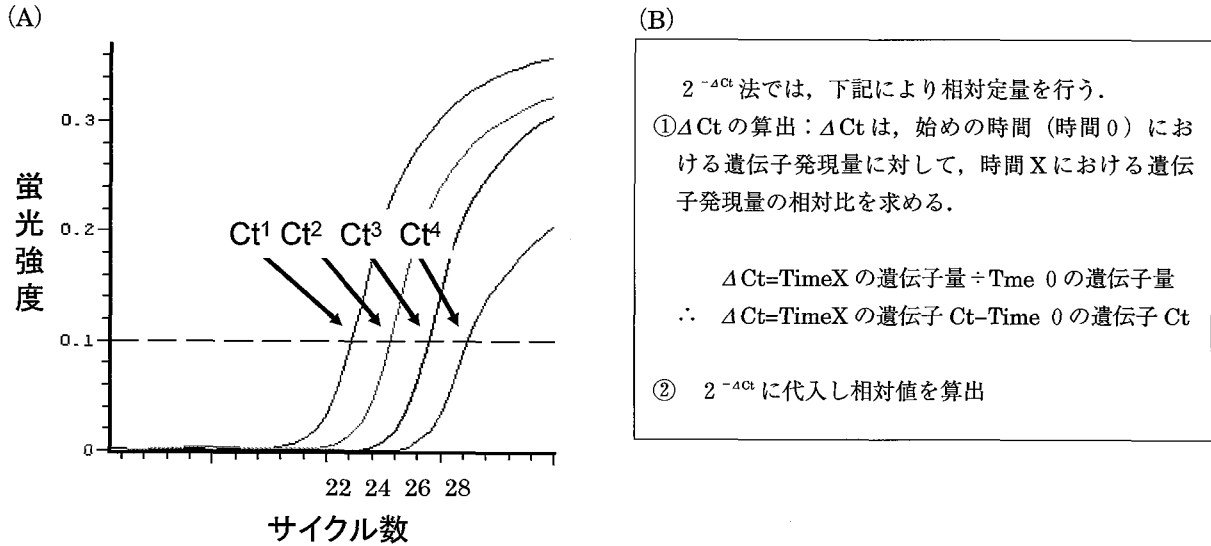


図 3：定量的リアルタイム PCR 法による相対定量

(A) 段階希釈したサンプルで実施して得られる増幅曲線，および定量性が最良と設定した閾値 (threshold) と増幅曲線の交点である Ct 値の算出；(B) $2^{-\Delta Ct}$ 法による遺伝子量の相対定量法

本法の基本は，増幅産物がある量 (閾値；threshold) に達するまでの増幅回数 (Threshold Cycle；Ct) からテンプレート DNA の初期量を計算することにある。

(A) は初期テンプレート量が既知である 4 サンプル ($Ct^1=32,000$, $Ct^2=8,000$, $Ct^3=2,000$, $Ct^4=500$ コピー) に対する増幅曲線を示す。PCR 法では，増幅効率が同一であれば反応 1 サイクルの差は初期テンプレート量が 2 倍あるいは 1/2 であることを意味するから，Ct を見たとき，各増幅曲線の間隔は 2 サイクルずつ異なり，テンプレート量は 2^2 ，すなわち 4 倍ずつ異なっている事が認められる。

比較 Ct 法では，Ct の差 (ΔCt) を基にして，相対的定量結果を $2^{\text{サイクル数の差}}$ 倍という式で求める (B)。この時，同一サンプル内において異なる遺伝子の量比を正確に求めることはできず，また，内部標準として一般的に利用される遺伝子 (ハウスキーピング遺伝子) であっても経時的に変化が生じる事が知られている。このため，本研究では，同一遺伝子の初期量に対する経時的変化を相対的に定量した。

NM_031144.

PCRにはpyrobest (Takara Biochemicals, Shiga, Japan) を用いた。アニーリング温度は，全て $1 \sim 2^\circ\text{C}$ の温度勾配下で予備実験を行い最も適切な温度を決定した。プライマーの特異性は，増幅された PCR 産物の塩基配列を決定して確認した。定性分析は，PCR 産物を 2% アガロースゲルを用いて電気泳動後，エチジウムブロマイド染色を行い検討した。

3. 定量的リアルタイム PCR 法による分析²⁰⁻²²⁾

mRNA の定量は，0.2 ml のチューブを用いて SYBR Green 法 (DyNAmo SYBR Green qPCR kit, FINNZYMES, OY, Finland) で実施した。SYBR Green の発する蛍光強度を Opticon リアルタイム PCR 分析システム (BIO-RAD Lab. Inc., CA, U.S.A.) で検出し，データーは Opticon software, version 1.08 で解析した。

各プライマーは $10\text{pmol}/\mu\text{l}$ に調整し -20°C で保存した。SYBER Green Mix を $10\mu\text{l}$ ，プライマー

をセンス，アンチセンスそれぞれ $0.5\mu\text{l}$ ，cDNA を $5\mu\text{l}$ と RNase-free の超純水 (Mili-Q 水) を $4\mu\text{l}$ 入れて反応総量は $20\mu\text{l}$ とした。PCR は，まず 94°C で 5 分係留してから 94°C ，10 秒，それぞれのアニーリング温度で 20 秒の係留後， 72°C で 20 秒伸長反応を行い，これを 40 サイクル実施した。EMMPRIN はメルティングカーブよりプライマーダイマーと思われるピークが出たため，それを除去する目的で 72°C の後に 79°C ，2 秒の処置を施した。

4. 統計処理と分析

リアルタイム PCR の定量的分析は $2^{-\Delta Ct}$ 法によった¹⁹⁾。即ち，サンプルごとに一定の蛍光強度を得るために必要なサイクル数 (Ct) を，0 時間に発現した量を基準として，経過時間におけるサイクル数と相対比較した。計算式と解説を図 3 に示す。データーは Student *t* test により *p* 値が 0.05 以下であることを確認した。

結 果

設計プライマーと PCR 産物の特異性は、アガロースゲル電気泳動、定量的リアルタイム PCR 法によるメルティングカーブの解析、ならびに塩基配列の決定によって確認した。

エラスチックバンド挿入後の経過時間における歯肉中の EMMPRIN, MMP-2, MMP-13, IL-

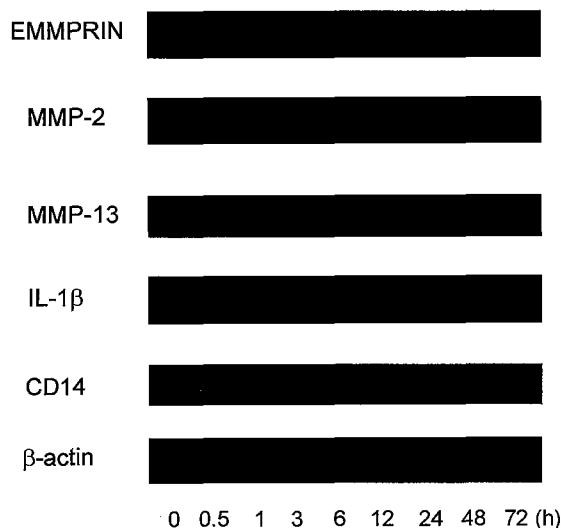


図4：EMMPRIN, MMP-2, MMP-13, IL-1βおよびβ-actin mRNA の RT-PCR 分析

エラスチックバンド挿入後の経過時間に伴う遺伝子の発現を示した。本実験では、ハウスキーピング遺伝子としてβ-actin mRNA を対照とした。

1 β, CD 14およびβ-actin の mRNA 発現パターンを図4に示した。

EMMPRIN と IL-1 B は正常歯肉においては検出されなかったが、メカニカルストレス負荷後30分より両者の発現が確認できた。このEMMPRIN の発現変動は、リアルタイム PCR 法によるメルティングカーブの解析でも支持された(図5)。IL-1 B はストレス負荷後12時間から急激な増加が認められたが、EMMPRIN の発現量には大きな変化が認められなかった。一方、MMP-2とMMP-13は正常歯肉においても発現が確認でき、その発現量は72時間までに大きな変化は認められなかった。

エラスチックバンド挿入時に起こりうる単球/マクロファージの歯肉組織への遊走を、CD 14抗原をマーカーとして検討した。CD 14はメカニカルストレス負荷後24時間までは検出されなかったが、48時間にその発現が確認された。しかし、72時間には、CD 14の発現は検出できなかった。

上記 RT-PCR 分析の結果を踏まえて、メカニカルストレス負荷後の遺伝子発現応答をリアルタイム PCR 法で定量的に検討した。結果を図6に示す。EMMPRIN と IL-1 B の遺伝子の発現量は、 $2^{-\Delta Ct}$ 法の計算式でそれらの遺伝子の発現が認められた30分を起始点とした相対量として表示した。

メルティングカーブ

定量線

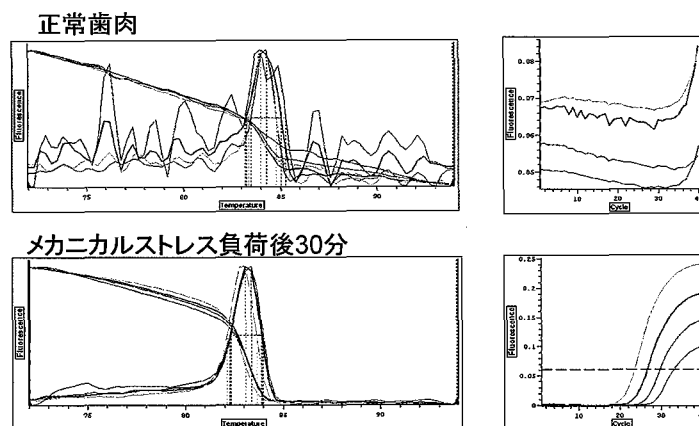


図5：リアルタイム PCR 法によるメルティングカーブ解析

PCR の増幅産物は特定の融解温度 (Tm 値) を持っているため、そのメルティングカーブ解析は産物の特異性と同質性、ならびにプライマー適性の判断に有効である。左図は、縦軸に蛍光強度、横軸に温度をプロットしたメルティングカーブであり、右図は図3に示した定量線である。サンプルは正常歯肉とメカニカルストレス負荷後30分の歯肉で、EMMPRIN の定量を試みた結果を示す。EMMPRIN は正常歯肉に発現していないこと、ストレス負荷後では発現が認められ定量が可能であることが確認される。

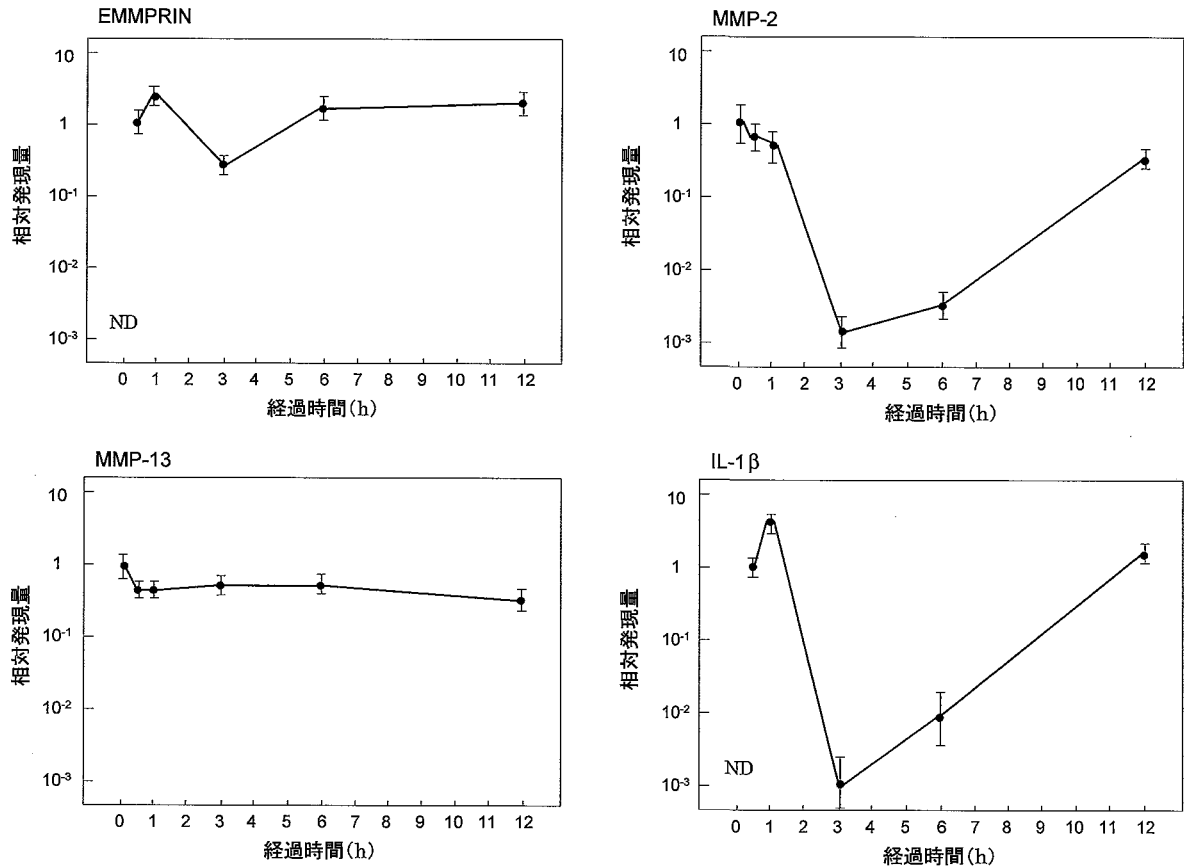


図6 : EMMPRIN, MMP-2, MMP-13および IL-1B の相対発現量

エラスチックバンド挿入後の経過時間に伴う遺伝子の発現を、定量的リアルタイムPCR法で分析し、12時間までの経時変化を示した。EMMPRIN および IL-1B は正常歯肉（0時間）では検出されず、ND (Not Detectable) と表示した。MMP-2と MMP-13は正常歯肉での発現量を、EMMPRIN と IL-1B はストレス負荷後30分の発現量を1とした相対量としてプロットした。

EMMPRIN は30分で発現し、1時間で2.3倍 ($-\Delta Ct = 1.19 \pm 0.09, p < 0.01$) に亢進し、3時間で1/3 ($-\Delta Ct = -1.70 \pm 0.22, p < 0.01$) に抑制され、その後は大きな変化はなかった。MMP-13は30分で1/4 ($-\Delta Ct = -2.05 \pm 0.13, p < 0.01$) に抑制され、1時間で1/2 ($-\Delta Ct = -0.84 \pm 0.30, p < 0.05$) になり、その後は変化がなかった。MMP-2と IL-1B は最初発現が亢進され、3時間後にMMP-2は1/400 ($-\Delta Ct = -7.71 \pm 0.66, p < 0.01$) に、IL-1B は1/1000 ($-\Delta Ct = -9.92 \pm 1.37, p < 0.01$) に抑制された。その後両遺伝子とも、正常歯肉と同じレベルにもどった。各遺伝子とも、24時間後以降に大きな変化はなかった (図を略す)。

考 察

ECM におけるタンパク質分解は、炎症が進行していく過程において生物学的関心だけでなく、

臨床的にも重要である。本研究において私は、メカニカルストレスを受けた歯肉組織におけるEMMPRIN と MMP-2, MMP-13の挙動を観察することができた。本研究により、4つの重要な知見が得られた。第一に、EMMPRIN は正常歯肉において発現が認められなかった。第二に、EMMPRIN はメカニカルストレスにより急速な発現が認められた。第三に、メカニカルストレスにより IL-1B と MMP-2は3時間後に発現が大きく抑制された。第四に、EMMPRIN は MMP-2の発現に影響を与えているとは考えられなかった。これらの結果より、メカニカルストレスを受けた歯肉組織の応答について新たな視点を得ることができた。

本実験において、EMMPRIN はラットの正常歯肉で発現が確認できなかったが、ヒトの正常歯肉溝浸出液においては膜結合型および可溶性型EMMPRIN の存在が確認されている²³⁾。メカニ

カルストレス負荷後の EMMPRIN の発現は非常に速く現れ、エラスチックバンド挿入後15分においても発現が認められた (大久保ら未発表)。各種の刺激により15分以内に発現応答する遺伝子は、早期応答型遺伝子 (immediately early response genes, IEGs) と呼ばれ^{24,25)}、初期炎症に関係のある *IL-1B* も IEGs の一種として知られている²⁶⁾。現在まで EMMPRIN が IEGs だという報告はなく、本研究が初めて EMMPRIN が IEGs である可能性を指摘した。炎症における組織反応として顆粒球と単球が炎症部位に集結してくるため、EMMPRIN の起源が血液中のリンパ球、単球/マクロファージにある可能性も指摘される (図7)²⁷⁾。実際に、単球/マクロファージの指標となる CD 14 mRNA の発現をリアルタイム PCR 法で検討してみると、正常歯肉では CD 14 の発現は検出されなかったが、エラスチックバンド挿入後15分の歯肉においてその発現が確認された (大久保ら未発表)。従って、EMMPRIN の一部は血液中の細胞由来の可能性があると指摘できる。しかし、図4において定性的に示したように、CD 14はエラスチックバンド挿入後48時間であらうじて検出できる程度の極微量しか発現していなかった。これらの結果は、EMMPRIN はストレス負荷後に歯肉組織が産生したことを強く示唆している。

Redlich ら²⁸⁾は、犬の歯肉を使った *in vivo* 実験において、MMP-1 の発現量はメカニカルストレスを与えてから3日間に変化しなかったが、7日後に20倍に増加したことを報告した。また、Apajalathi ら²⁹⁾は、ヒトの歯肉溝浸出液を使って矯正力を加えた後の MMP-1 および



EMMPRIN MMP-2 CD14
MMP-13 IL-1β

図7：単球/マクロファージの EMMPRIN, MMP-13, MMP-2, IL-1β および CD 14 mRNA の RT-PCR 分析

全身麻酔下でラットから末梢血液を採取し、Ficol-Paque Plus (GE Healthcare UK Ltd., England) キットによって、白血球 (リンパ球・単球/マクロファージ) を分離抽出した。サンプルから総 RNA を抽出して RT-PCR 分析に供した。白血球は、EMMPRIN, *IL-1B* および *CD 14* を高発現していた。

MMP-8 (好中球コラゲナーゼ) の発現状態をウエスタンブロット法と免疫蛍光抗体法で調べた。その結果、MMP-8 は4~8時間で有意に高値を示したのに対し、MMP-1 は8時間後まで検出されなかったと報告している。一方私の実験において、ラットの正常歯肉に MMP-13 が発現していることを観察できた。実験法の違いはあるにしても、間質コラゲナーゼの発現パターンは、私の結果とは異なっていた。これらの差異が、種差に起因する可能性を含めて、さらに解析することが必要と思われた。

in vitro 実験において、エンドトキシンや他の微生物由来因子の刺激により、ヒト *IL-1B* の発現は3~4時間でピークに達し、6~8時まで持続した後急速に抑制されることが報告されている^{25,30)}。しかし本実験では、*in vivo* で *IL-1B* と MMP-2 で早期に大幅な発現抑制が観察された。研究対象とした4種の遺伝子は、程度の差はあっても、全てが早期に発現抑制を受けた。MMP-2 の早期に発現が抑制されるという知見は、本研究が最初と思われる。現在この発現抑制の機序を説明することはできないが、細胞増殖に関わる可能性も指摘される。Zentner ら³¹⁾は、私と同様なラット歯肉を用いた実験において、メカニカルストレスを受けた1時間後に歯肉細胞の増殖が2倍に上昇し、この状態が72時間後まで続く事を報告した³¹⁾。従って、細胞増殖活性が4種類の遺伝子の産生量を減少させている可能性が考えられる。

最近、Braundmeier と Nowak³²⁾は、ヒトの子宮線維芽細胞を用いた実験で、*IL-1β*, *TGF-β*, *TNF-α* の添加量と処理時間に依存して MMP 発現が亢進されたのに対し、EMMPRIN 添加では変化がなかったと報告した。また、Chen ら³³⁾はマウス胚盤細胞を使って定量的 PCR を行い、MMP-2 と MMP-9 の発現に EMMPRIN は変化を与えないと報告している³³⁾。これらのデータは、歯肉を使った私の実験結果と一致している。

EMMPRIN は $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ インテグリンと会合することが知られている³⁴⁾。一方、持続的牽引力を加えたヒト歯肉線維芽細胞において、 α_6 と β_1 インテグリン・サブユニットの発現が mRNA レベルで亢進されることが報告された³⁵⁾。従って、メカニカルストレスを加えた歯肉において、EMMPRIN は細胞接着に関与する情報伝達を誘

導する可能性も指摘される。

最近, Schwab ら³⁶⁾は, 免疫組織化学的手法を用いて, ラット歯胚の分化に EMMPRIN が関与する可能性を指摘した。このように, 口腔領域においても EMMPRIN の作用が注目されつつある。EMMPRIN による MMPs の発現亢進は糖鎖修飾の度合いにより変化するため¹⁰⁾, その機能の研究にはタンパク質レベルでの実験も不可欠である。今後, 本研究で得られた成績を *in vitro* レベルで検証し, メカニカルストレスに対する歯周組織の反応に新たな知見を得たい。

結 論

メカニカルストレス負荷後のラット歯肉における EMMPRIN, MMP-2, MMP-13 および IL-1 β の遺伝子発現の経時的変化について定性および定量的分析を行って検討し, 以下の結論を得た。

1. EMMPRIN は正常歯肉において発現が認められなかった。
2. メカニカルストレス負荷により, 歯肉において EMMPRIN は急速に発現した。
3. メカニカルストレス負荷により, IL-1 β と MMP-2 は 3 時間後に発現が著しく抑制された。
4. EMMPRIN と MMP-2 の発現に相関性は認められなかった。

以上のことから, メカニカルストレス負荷後の初期には, EMMPRIN は MMPs の制御に関与していない可能性が示唆された。また EMMPRIN は早期応答型サイトカインである可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり, 御懇篤なるご指導と御校閲を賜りました松本歯科大学大学院 平岡行博教授, 同大歯学部 上松節子講師(現, 大阪大学歯学部附属病院講師)に深く感謝いたします。

本研究の論文作成にあたって, 御助言, 御校閲を賜りました松本歯科大学総合歯科医学研究所 小林泰浩准教授に深く感謝いたします。

松本歯科大学口腔生化学教室研究補助員の武井智子さん, 同化学教室研究補助員 倉田あいさんには, 本研究の遂行と論文作成にご協力戴きました。深く感謝いたします。

最後に, この研学生活を絶えず支援してくれました両親(大久保三郎, 清子), 妻(由紀子)そして二人の息子(学, 領)に心から感謝致します。

文 献

- 1) Bartold PM, Walsh LJ and Narayanan AS (2000) Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol* 2000 **24**: 28-55.
- 2) Nagase H and Woessner JF Jr (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **274**: 21491-4.
- 3) Birkedal-Hansen H (1993) Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* **64**: 474-84.
- 4) Birkedal-Hansen, H (1987) Catabolism and turnover of collagens: collagenases. *Methods Enzymol* **144**: 140-71.
- 5) Cawston TE (2004) Collagenase 1, In Barrett AJ, Rawling ND and Woessner AF *Handbook of Proteolytic Enzyme 2 nd Edition*, 472-80, Elsevier Academic Press, London.
- 6) Murphy G (2004) Gelatinase A, Ed. by Barrett AJ, Rawling ND and Woessner AF eds. *Handbook of Proteolytic Enzyme 2 nd Edition*, 497-503, Elsevier Academic Press, London.
- 7) Uematsu S, Mogi M and Deguchi T (1996) Interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α , epidermal growth factor, and β_2 -microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res* **75**: 562-7.
- 8) Uematsu S, Mogi M and Deguchi T (1996) Increase of transforming growth factor- β_1 in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol* **41**: 1091-5.
- 9) Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M and Menashi S (2006) The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res* **85**: 22-32.
- 10) Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H and Nabeshima K (1995) The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* **55**: 434-9.
- 11) DeCastro R, Zhang Y, Guo H, Kataoka H, Gordon MK, Toole B and Biswas G (1996) Human keratinocytes express EMMPRIN, an extracellular matrix metalloproteinase inducer. *Invest Dermatol* **106**: 1260-5.

- 12) Hasaneen NA, Zucker S, Cao J, Chiarelli C, Panettieri RA and Foda HD (2005) Cyclic mechanical strain-induced proliferation and migration of human airway smooth muscle cells : role of EMMPRIN and MMPs. *FASEB J* **19** : 1507-9.
- 13) Nabeshima K, Iwasaki H, Koga K, Hojo H, Suzumiya J and Kikuchi M (2006) Emmprin (basigin/CD147) : matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathol Int* **56** : 359-67.
- 14) Muraoka K, Nabeshima K, Murayama T, Biswas C and Kono M (1993) Enhanced expression of a tumor-cell-derived collagenase-stimulatory factor in urothelial carcinoma : its usefulness as a tumor marker for bladder cancers. *Int J Cancer* **55** : 19-26.
- 15) Polette M, Gilles C, Marchand V, Lorenzato M, Toole B, Tournier JM, Zucker S and Birembaut P (1997) Tumor collagenase stimulatory factor (TCSF) expression and localization in human lung and breast cancers. *J Histochem Cytochem* **45** : 703-9.
- 16) Tang Y, Kesavan P, Nakada MT and Yan L (2004) Tumor-stroma interaction : positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN. *Mol Cancer Res* **2** : 73-80.
- 17) Sodek J (1977) A comparison of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in adult rat periodontal tissues and skin using a microassay. *Arch Oral Biol* **22** : 655-65.
- 18) Waldo CM and Rothblatt JM (1954) Histologic response to tooth movement in the laboratory rat ; procedure and preliminary observations. *J Dent Res* **33** : 481-6.
- 19) Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* **25** : 402-8.
- 20) Schmittgen TD and Zakrajsek BA (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression : validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* **46** : 69-81.
- 21) Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W and Nitsche A (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **313** : 856-62.
- 22) Silver N, Best S, Jiang J and Thein SL (2006) Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol* **7** : 33.
- 23) Emingil G, Tervahartiala T, Mantyla P, Maatta M, Sorsa T and Atilla G (2006) Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase (MMP)-7, extracellular MMP inducer, and tissue inhibitor of MMP-1 levels in periodontal disease. *J Periodontol* **77** : 2040-50.
- 24) Dinarello CA (1991) Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* **77** : 1627-52.
- 25) Auron PE and Webb AC (1994) Interleukin-1 : a gene expression system regulated at multiple levels. *Eur Cytokine Netw* **5** : 573-92.
- 26) Sng JCG, Taniura H and Yoneda Y (2004) A Tale of Early Response Genes. *Biol Pharm Bull* **27** : 606-12.
- 27) Yurchenko V, Constant S and Bukrinsky M (2006) Dealing with the family : CD 147 interactions with cyclophilins. *Immunology* **117** : 301-9.
- 28) Redlich M, Reichenberg E, Harari D, Zaks B, Shoshan S and Palmon A (2001) The effect of mechanical force on mRNA levels of collagenase, collagen type I, and tissue inhibitors of metalloproteinases in gingivae of dogs. *J Dent Res* **80** : 2080-4.
- 29) Apajalahti S, Sorsa T, Railavo S and Ingman T (2003) The *in vivo* levels of matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during initial orthodontic tooth movement. *J Dent Res* **82** : 1018-22.
- 30) Schindler R, Ghezzi P and Dinarello CA (1990) IL-1 induces IL-1. IV. IFN- γ suppresses IL-1 but not lipopolysaccharide-induced transcription of IL-1. *J Immunol* **144** : 2216-22.
- 31) Zentner A, Panagiotis K and Heaney T (2001) Early cellular reactions in mechanically stimulated gingival connective tissue. *J Orofac Orthop* **62** : 476-87.
- 32) Braundmeier AG and Nowak RA (2006) Cytokines regulate matrix metalloproteinases in human uterine endometrial fibroblast cells through a mechanism that does not involve increases in extracellular matrix metalloproteinase inducer. *Am J Reprod Immunol* **56** : 201-14.
- 33) Chen L, Nakai M, Belton RJ Jr and Nowak RA

- (2007) Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinases during mouse embryonic development. *Reproduction* **133** : 405–14.
- 34) Berdichevski F, Chang S, Bodorova J and Hemler ME (1997) Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that $\alpha^3\beta_1$ complexes with EMMPRIN/basigin/OX 47/M 6. *J Biol Chem* **272** : 29174–80.
- 35) Bolcato-Bellemin AL, Elkaim R, Abehsera A, Fausser JL, Haikel Y and Tenenbaum H (2000) Expression of mRNAs encoding for α and β integrin subunits, MMPs, and TIMPs in stretched human periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Dent Res* **79** : 1712–6.
- 36) Schwab W, Harada H, Goetz W, Nowicki M, Witt M, Kasper M and Barth K (2007) Immunocytochemical and biochemical detection of EMMPRIN in the rat tooth germ : differentiation-dependent co-expression with MMPs and co-localization with caveolin-1 in membrane rafts of dental epithelial cells. *Histochem Cell Biol* **128** : 195–203.