ヒト歯肉線維芽細胞が産生するインターロイキン6に関する研究

滝川 雅之

岡山大学歯学部歯科保存学第2講座

(指導：村山洋二教授)

(平成4年1月21日受付)

Study on Interleukin-6 Produced from Human Gingival Fibroblasts

Masayuki TAKIGAWA

Department of Periodontology and Endodontology,

Okayama University Dental School

2-5-1, Shikata-cho, Okayama 700, Japan

(Director : Prof. Yoji MURAYAMA)

Fibroblasts are regarded as potential participants in the orchestration of inflammation via the production of inflammatory mediators. Interleukin-6 (IL-6) produced by human gingival fibroblasts (HGFs) may be associated with the initiation and progression of periodontal disease. The purpose of this study was to investigate the kinetics of IL-6 produced by HGFs. The kinetics of IL-6 mRNA expression and IL-6 secretion were examined by stimulating HGFs with interleukin-1 β (IL-1 β) or tumor necrosis factor α (TNF α). HGFs were prepared from a subject with healthy gingiva. The expression of IL-6 mRNA was quantified by a reverse transcription-polymerase chain reaction analysis. The activity of IL-6 in the culture supernatants was measured using an IL-6-dependent murine hybridoma clone, MH 60.BSF 2. IL-6 producing cells in inflamed gingiva from patients with periodontal disease were detected immuno-

histochemically. With stimulation by either IL-1 β or TNF α , HGFs expressed IL-6 mRNA and secreted IL-6 in a dose-dependent manner. IL-1 β was more effective in stimulating IL-6 production than TNF α . Cells that had not been stimulated also expressed detectable IL-6 mRNA, but IL-6 activity in the culture supernatants was not detected. IL-6 secretion from HGFs was partially suppressed by prostaglandin E₂, which was produced by HGFs on stimulation by IL-1 β . On the other hand, IL-6 had no effect on DNA synthesis and collagen synthesis by HGFs. HGFs did not express IL-6 receptor mRNA. In inflamed gingiva, fibroblasts were stained with anti-IL-6 antibody. These results provided evidence that HGFs may synthesize IL-6 in the presence of certain inflammatory mediators and that the IL-6 may contribute to the orchestration of inflammation in periodontal disease.

Key words : Human gingival fibroblast, Interleukin-6, Prostaglandin E₂, Interleukin-6 receptor

要旨 : 歯周病の発症と進行におけるサイトカインネットワークのなかで、歯肉線維芽細胞がインターロイキン6 (IL-6) 産生を介し果たす役割を評価することを目的に、培養歯肉線維芽細胞の IL-6 産生の動態および調節機構を mRNA の発現ならびに蛋白の産生段階から調べた。さらに免疫染色によって炎症歯肉における線維芽細胞の IL-6 産生の様態について調べた。歯肉線維芽細胞は健常者の辺縁歯肉から分離した細胞を用いた。得られた結果は次の

通りである。1) インターロイキン 1 β (IL-1 β) あるいは腫瘍壊死因子 (TNF α) の刺激を受けた歯肉線維芽細胞は IL-6 mRNA を発現し, IL-6 を分泌した。2) 歯肉線維芽細胞の IL-6 産生は自ら産生するプロスタグランジン E₂ (PGE₂) を介して調節を受けることが示された。3) IL-6 は歯肉線維芽細胞の DNA 合成能およびコラーゲン合成能に影響を及ぼさなかった。4) 歯肉線維芽細胞の IL-6 レセプターの mRNA 発現は検出されなかった。5) 炎症歯肉においても線維芽細胞が IL-6 陽性細胞であることが確かめられた。以上の結果から, 炎症歯肉において歯肉線維芽細胞は IL-6 産生細胞として歯周病の炎症反応の調節に関与することが示唆された。

索引用語: ヒト歯肉線維芽細胞, インターロイキン 6, プロスタグランジン E₂, インターロイキン 6 レセプター

緒 言

歯肉線維芽細胞は, 歯周組織の主要な構成細胞として歯周組織の恒常性維持に重要な役割を果たしている。その一方, 抗原提示能¹⁾および炎症の各種メディエーター産生能²⁻⁵⁾を有する免疫担当細胞として, 炎症反応の調節に関与するとされている。歯周病の病態を歯肉線維芽細胞の面から捉えようとするれば, 歯周病原性細菌の刺激を受けて宿主防御細胞が産生するサイトカインを介した反応を, 歯肉線維芽細胞を中心に, マクロファージやリンパ球も含めたネットワークとして明確にしなければならない。

インターロイキン 6 (IL-6) は, B 細胞の抗体産生細胞への分化を誘導し^{6,7)}, また T 細胞の増殖や細胞障害性 T 細胞への分化を促進する^{8,9)}など, 炎症および感染に対する生体防御反応において重要な役割を果たすサイトカインである。さらに IL-6 は骨吸収を誘導する作用¹⁰⁾を有するサイトカインとして歯周病との関連が注目される。しかし, 歯周病における IL-6 に関する研究は少なく, 器官培養系において炎症歯肉は健康歯肉に比較して IL-6 量が増加していることを示した報告¹¹⁾, あるいは炎症歯肉由来の単核球が IL-6 レセプター (IL-6 R) を発現し, 高い IL-6 産生能を有することを示した報告¹²⁾がある程度である。ただし, これらの報告からは歯肉線維芽細胞の IL-6 産生について言及することはできない。一方, 歯肉線維芽細胞の IL-6 産生の様態に関しては, 歯周病原性細菌のリポ多糖体 (LPS) で刺激した歯肉線維芽細胞が IL-6 を産生することを示した報告¹³⁾はある。しかし, この報告では主眼がむしろ細菌種による IL-6 誘導能の違いにあったり, IL-6 は歯肉線維芽細胞が産生する胸腺細胞刺激因子 (TAF) の中でインターロイキン 1 (IL-1) の増強因子として捉えられているのみである。したがって, 歯肉線維芽細胞の IL-6 産生機構は明確でなく, 歯肉線維芽細胞が産生する IL-6 が歯周病の発症と進行に

どのように関わっているかにまで言及できないのが現状である。

本研究は, 歯周病の発症と進行におけるサイトカインネットワークのなかで, 歯肉線維芽細胞が IL-6 産生を介し果たす役割を評価することを目的に, 1) 培養歯肉線維芽細胞における IL-6 産生の動態を mRNA の発現および蛋白の産生段階から, 2) IL-6 の産生機構を細胞自らが産生するプロスタグランジン E₂ (PGE₂) のフィードバック調節機構および IL-6 のオートクリン調節機構から調べ, さらに, 3) 炎症歯肉における線維芽細胞の IL-6 産生の様態を調べるものである。

材料と方法

1. 供試線維芽細胞および培養

臨床的に炎症のない健全な歯周組織を有するドナー (27 歳, 男性) の辺縁歯肉から, 後藤ら¹⁴⁾の記載に従って分離した歯肉由来線維芽細胞様細胞を歯肉線維芽細胞として用いた。Out growth した線維芽細胞の培養は, 清水ら¹⁵⁾の記載を参考に, 非働化したウシ胎児血清 (FCS; Gibco, Grand Island, NY, U.S.A.) を 5% の割合に含むダルベッコ変法イーグル培地 (D-MEM; Flow Laboratories Inc., McLean, VA, U.S.A.) を用い, 5% 炭酸ガス存在下, 37°C で細胞が単層を形成するまで行った。なお, 本研究では 4~8 回継代した線維芽細胞を実験に供した。

2. 刺激因子

リコンビナントヒト IL-1 β (rhIL-1 β ; リンパ球刺激因子 [LAF] 活性 5 $\times 10^8$ units/mg) およびリコンビナントヒト tumor necrosis factor α (rhTNF α ; L 929 細胞障害活性¹⁶⁾ 2 $\times 10^6$ units/mg) は R & D Systems Inc. (Minneapolis, MN, U.S.A.) のものを使用した。リコンビナントヒト IL-6 (rhIL-6; 特異活性 5.0 $\times 10^6$ unit/mg) は岸本忠三博士 (大阪大学医学部第三内科) から, PGE₂ は小野薬品工業 (大阪) から

恵与を受けた。PG 合成阻害剤はインドメタシン (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, U.S.A.) を使用した。なお、PGE₂ およびインドメタシンは、エタノールに溶解して使用したが、培地に添加したときのエタノールの最終濃度が線維芽細胞の機能に影響を与えない 0.1% 以下になるように調製した¹⁵⁾。

3. mRNA の検出

mRNA は、線維芽細胞から抽出した全 RNA から reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法¹⁷⁾によって増幅して得た mRNA の PCR 産物を電気泳動し、エチジウムブロマイド (Sigma) で染色して検出した。以下にその手順を示す。

1) 線維芽細胞の刺激および RNA の抽出

5% FCS 添加 D-MEM を入れた 96 ヶプレート (Corning Co., Corning, NY, U.S.A.) に、1 穴当たり 1.0×10^4 個ずつ線維芽細胞を接種し、単層を形成した細胞を IL-1 β あるいは TNF α で刺激した後、細胞層から全 RNA を抽出した。なお、線維芽細胞は 4 日間培地交換を行わず培養を続け、細胞周期をおおむね静止期に揃えた状態で用いた。そして、細胞を D-MEM で 2 回洗浄した後に、IL-1 β あるいは TNF α を含む D-MEM を添加して細胞を刺激した。線維芽細胞からの全 RNA の抽出は、acid guanidinium thiocyanate/phenol/chloroform (AGPC) 法¹⁸⁾に従った。

2) complementary DNA (cDNA) の調製

mRNA の cDNA への変換は Rappolee ら¹⁷⁾の記載に従い、moloney murine leukemia virus 由来 reverse transcriptase (MMLV-RT; Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD, U.S.A.) を用いた逆転写反応によって行った。

3) cDNA の増幅

cDNA の増幅は、目的とする cDNA の特定部位に相補的に結合するプライマーと耐熱性の *Thermus aquaticus* (Taq) ポリメラーゼ (宝酒造, 京都) を用いる PCR 法¹⁷⁾によって行った。なお、IL-6、IL-6 レセプター (IL-6 R) および β -actin のプライマーはそれぞれの cDNA の塩基配列¹⁹⁻²¹⁾を参考にして設計し、DNA シンセサイザー (Model 380 B; Applied Biosystems Inc., Foster, CA, U.S.A.) を用いて作製した (表 1)。増幅反応は、DNA サーマルサイクラー (Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, CT, U.S.A.) 中で 30 サイクルまで行った。なお、1 サイクルは 94°C で 1 分間の熱変性、1 分間のアニーリング、および 72°C で 1 分間の伸張反応から構成されている。アニーリング

表 1 プライマーの塩基配列

プライマーの塩基配列		サイズ (bp)
IL-6	: 5'-TTC TCC ACA AGC GCC TTC GGT-3'	474
	: 5'-TAG ATT CTT TGC CTT TTT CGT-3'	
IL-6 R	: 5'-CCT GCC AAC ATC ACA GTC ATC-3'	96
	: 5'-TCT GTA GAA AGA TGA GTT CCA-3'	
β -actin	: 5'-ATG ACC CAG ATC ATG TTT GAG-3'	642
	: 5'-AGG AGC AAT GAT CTT GAT CTT CA-3'	

温度は、 β -actin の cDNA を増幅する際には 60°C、IL-6 および IL-6 R では 55°C に設定した。また、Noonan ら²²⁾の記載を参考に、cDNA を増幅する際に [α^{32} P] dCTP (specific activity 110 TBq/mmol; Amersham International plc., Bucks, UK) を最終濃度が 13.45 pmol/ml となるように反応系に添加して増幅 DNA の RI 標識を行った。

4) 増幅 DNA の検出と定量

増幅 DNA の検出は、Sambrook ら²³⁾の記載を参考に、PCR 反応産物を 0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイドを含む Tris-acetate 緩衝液 (TAE 緩衝液; 0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA) 中で、4% アガロースゲル (3% Nusieve GTG/1% Seakem ME agarose; FMC Bio Products, Rockland, ME, U.S.A.) を用いて電気泳動 (100 V, 40 分) した後、トランスイルミネーター (フナコシ, 東京) を用いて行った。また、増幅 DNA の定量は、ゲル上に検出した増幅 DNA のバンドを切り出し、その放射性を液体シンチレーションスペクトロメーター (LSC-700, Aloka, 東京) を用いて測定することによって行った。なお、mRNA の発現量はこの放射性値をもって表した。

5) RT-PCR 法の特異性および定量性

本研究で用いた RT-PCR 法によって IL-6 および IL-6 R の mRNA が特異的に検出できることの確認は、IL-6 および IL-6 R の cDNA を含む pBSF 2.38.1¹⁹⁾ および pBSF 2 R.236²⁰⁾ (ともに岸本忠三博士からの恵与) から調製したプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション法²⁴⁾によって行った。また、 β -actin の場合は、制限酵素 *Msp* I (宝酒造) を用いた増幅 DNA の制限酵素切断法によって、642 bp の β -actin の増幅 DNA が 449, 110 および 83 bp の断片に切断されたことから確認した。一方、RT-PCR 法の定量性は、前述のプラスミド pBSF 2.38.1、あるいはプラスミド pCRTM 1000 (Invitrogen, San

図 1 RT-PCR 法の特異性ならびに定量性
M. 分子量マーカー, ●: IL-6, ○: β -actin

Diego, CA, U.S.A.) に組み込んだ β -actin の増幅 DNA を段階希釈した試料を PCR 法によって増幅し、反応産物の放射活性値をもとに作製した検量線がほぼ比例関係を示すことから確認した (図 1)。

4. IL-6 活性の測定

前述の 3-1) に示した線維芽細胞の培養系から回収した上清の IL-6 活性の測定は、Matsuda ら²⁵⁾の方法に従い、IL-6 依存性マウスハイブリドマクロンである MH 60. BSF 2 細胞 (岸本忠三博士からの恵与) を用いたバイオアッセイによって行った。なお、IL-6 活性は標準 rhIL-6 を用いて得た標準曲線に基づいて算出し、ユニット値 (U) で示した。

5. PGE₂ の定量

培養上清中の PGE₂ の定量は、滝川ら²⁶⁾の記載に従い、Prostaglandin E₂ [¹²⁵I] Assay System (Amersham) を用いたラジオイムノアッセイによって行った。

6. DNA 合成能ならびにコラーゲン合成能の測定

線維芽細胞の DNA 合成能の測定は滝川ら²⁶⁾の記載に従い、そして、コラーゲン合成能の測定は清水ら¹⁵⁾の

記載に従って行った。なお、DNA 合成能は培養系に添加した [³H]-チミジン ([³H]-thymidine; specific activity 0.74 TBq/mmol, New England Nuclear, Boston, MA, U.S.A.) の細胞内取り込み量を、そして、コラーゲン合成能は培養系に添加した [³H]-プロリン (L-[³H]-proline; specific activity 1.15 TBq/mmol, Amersham) のコラーゲナーゼ消化性蛋白への取り込み量をもって表わした。

7. 免疫組織染色

1) 歯肉組織片の調製

歯周病患者の歯肉組織を歯肉辺縁から歯槽骨頂部までを含む組織片として歯周外科時に採取し、直ちに OCT コンパウンド (Miles Laboratories, Inc., Naperville, IL, U.S.A.) を用いて封入し、液体窒素中で凍結した。得られた凍結歯肉組織片を Tissue-Tek (Miles) を用いて 5 μ m の連続切片を作製した。

2) IL-6 陽性細胞の検出

歯肉組織における IL-6 陽性細胞の検出は、抗 IL-6 抗体 (α -BSF 2-60 [IgM, κ]) と染色キット (Vecstain ELITE ABC; フナコシ) を用いた免疫染色によって行った。なお、抗 IL-6 抗体は、高橋慶壮学士 (岡山大学歯学部歯科保存学第 2 講座) から恵与を受け使用した。免疫染色の発色基質には 3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩 (DAB; ナカライ, 京都) を、核対比染色にはメチルグリーン (Sigma) を用いた。細胞の同定は、他の連続切片について T 細胞, B 細胞, マクロファージ, および血管内皮細胞に対する特異抗体を用いて免疫染色を施した場合、あるいはヘマトキシリン・エオジン染色を施した場合の組織像を参考にして行った。なお、上記の細胞に対する特異抗体は、それぞれ Leu 4, Leu 14, LeuM 5 (Becton Dickinson, San Jose, CA, U.S.A.), および VLA 1 (T Cell Sciences Inc. Cambridge, MA, U.S.A.) を使用した。また、IL-6 R の免疫染色には抗 IL-6 R 抗体²⁷⁾ (MT 18; 岸本忠三博士からの恵与) を用いた。

8. 統計分析

有意差検定は Student-*t* 検定によった。

結 果

1. 線維芽細胞の IL-6 産生の動態

IL-1 β あるいは TNF α の刺激によって線維芽細胞が発現する IL-6 および β -actin の mRNA 量ならびに細胞外に分泌する IL-6 の活性を調べ、その結果を

図2 IL-1 β あるいはTNF α 刺激によって発現されるIL-6 mRNAならびにIL-6活性
●: IL-6, ○: β -actin, ■: IL-6活性, IL-6活性の値は3試料の平均値 $\pm$ 標準偏差で表わした。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

図2に示した。IL-6 mRNAの発現量はIL-1 β あるいはTNF α の添加濃度に依存して増加した。また、その最大値はIL-1 β (1 ng/ml) で刺激した時の方がTNF α (0.5 ng/ml) で刺激した時より高かった。一方、遺伝子発現のコントロールとして用いた β -actinのmRNA発現量は、IL-1 β あるいはTNF α の全ての添加濃度においてほぼ一定であった。IL-6活性はIL-1 β およびTNF α の添加濃度に依存して上昇したが、活性の最大値はIL-1 β (1 ng/ml) で刺激した時の方がTNF α (50 ng/ml) で刺激した時より著明に高かった。

IL-1 β (1 ng/ml) あるいはTNF α (5 ng/ml) で線維芽細胞を刺激した時のIL-6 mRNAの発現量および培養上清のIL-6活性の推移を経時的に調べ、その結果を図3に示した。IL-6 mRNAはIL-1 β あるいはTNF α の刺激1~2時間後に発現し、4~12時間の間で最大値を維持した。それ以後はIL-6 mRNAの発現

量は減少したが、TNF α で刺激した時の方がIL-1 β で刺激した時より急激に減少し、24時間後にbasal levelにまで低下した。培養上清のIL-6活性はIL-6 mRNA発現に遅れて認められた。しかし、活性の出現は刺激因子によって異なり、IL-1 β では4時間後に、TNF α では8時間後に有意に上昇を開始した($p < 0.05$)。また、IL-1 β で刺激した系では、IL-6活性の著しい上昇が24時間後まで持続した。なお、両刺激因子を含まない対照系においてもわずかにIL-6 mRNAの発現を認めたが、IL-6活性の上昇は検出されなかった。

2. PGE₂によるIL-6産生の調節

IL-1 β は線維芽細胞のPGE₂産生を著明に促進した。5% FCS存在下においてIL-1 β (1 ng/ml)を含む培地で24時間培養した上清のPGE₂量は高く、125.6 ng/mlに達した。しかし、この時の線維芽細胞のPGE₂産生は、1 μ Mのインドメタシンの添加によって完全

図 3 IL-1 β あるいはTNF α 刺激によって発現されるIL-6 mRNAならびにIL-6の経時的变化
 ●: IL-6, ○: β -actin, ■: IL-6 活性, IL-6 活性の値は3試料の平均値 $\pm$ 標準偏差で表わした。
 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

A: IL-1 β (1 ng/ml) を含む D-MEM で培養
 B: TNF α (5 ng/ml) を含む D-MEM で培養
 C: D-MEM のみで培養

図 4 IL-1 β による線維芽細胞の PGE₂ 産生ならびに IL-6 活性に及ぼす PG 合成阻害剤の影響

A : IL-1 β による PGE₂ 産生に及ぼす PG 合成阻害剤の影響

B : IL-1 β による IL-6 産生に及ぼす PG 合成阻害剤の影響

値は 3 試料の平均値±標準偏差で表わした。* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

図 5 IL-1 β による線維芽細胞の IL-6 mRNA 発現に及ぼす PGE₂ の影響

値は 3 試料の平均値±標準偏差で表わした。* : $p < 0.05$

図 6 IL-1 β による線維芽細胞の IL-6 mRNA 発現に及ぼす PG 合成阻害剤の影響

値は 3 試料の平均値±標準偏差で表わした。

に阻害された ($p < 0.01$, [図 4-A])。一方, IL-1 β とインドメタシンを同時に添加した時に線維芽細胞が分泌する IL-6 の活性は, インドメタシンを添加しない対照より高かった ($p < 0.05$, [図 4-B])。

線維芽細胞を IL-1 β で 8 時間刺激した時の IL-6 mRNA 発現量は, PGE₂ を添加することによってわず

かに減少した。ただし, PGE₂ による IL-6 mRNA 発現の抑制は, 線維芽細胞の PGE₂ 産生量を調べた図 4-A で得た結果の約 8 倍も高濃度の PGE₂ を添加したときに認められたのみである ($p < 0.05$, [図 5])。さらに, IL-6 mRNA の発現量は IL-1 β とインドメタシン

図7 IL-6による線維芽細胞のDNA合成能ならびにコラーゲン合成能に及ぼす影響

A: DNA合成能に及ぼすIL-6の影響

B: コラーゲン合成能に及ぼすIL-6の影響

値は3試料の平均値 $\pm$ 標準偏差で表わした。

図8 IL-1 β , TNF α およびIL-6による線維芽細胞のIL-6 RmRNA発現に及ぼす影響

M: マーカ、medium: D-MEMのみで0, 1, 4, 8, および24時間培養, IL-1 β : IL-1 β (1 ng/ml) で1, 4, 8, および24時間培養, TNF α : TNF α (5 ng/ml) で8時間培養, IL-6: IL-6 (100 U/ml) で8時間培養, positive control: 末梢血単核球をLPSで24時間培養

を添加した系とインドメタシンを添加しなかった対照系との間に差はなかった(図6)。

3. 線維芽細胞のDNA合成能およびコラーゲン合成能に及ぼすIL-6の影響

線維芽細胞のDNA合成能ならびにコラーゲン合成

能は, IL-6を添加してもIL-6を添加しない対照系との間に差がなかった(図7)。また, 結果には示していないが, 線維芽細胞のPGE $_2$ 産生量あるいはIL-6 mRNAの発現量に関しても, IL-6で刺激した系と刺激しなかった対照系との間に差はなかった。

図 9 歯肉組織における IL-6 陽性細胞像

A : H.E 染色 (×250), B~D : 抗 IL-6 抗体による免疫染色 (×250), B : 線維芽細胞, C : 血管内皮細胞, D : マクロファージ

図 10 歯肉組織における線維芽細胞の IL-6 産生の様態

抗 IL-6 抗体による免疫染色 (×250), A : IL-6 陽性の線維芽細胞が著明な部位, B : IL-6 陽性の線維芽細胞がほとんど存在しない部位

歯肉線維芽細胞が IL-6 の標的細胞として IL-6 R を発現するかどうかについて, IL-6 R の mRNA 発現を調べ, その結果を図 8 に示した。線維芽細胞の IL-6 R の mRNA 発現は, IL-1 β , TNF α , および IL-6 のいずれで刺激した系でも, また刺激しない対照系においても検出されなかった。なお, 抗 IL-6 R 抗体を用い

て培養線維芽細胞を免疫染色した場合においても IL-6 R の発現は検出されなかった。

4. 歯肉組織における線維芽細胞の IL-6 産生の様態

炎症歯肉における線維芽細胞は IL-6 陽性細胞として検出された。また, 血管内皮細胞およびマクロファ

ジも IL-6 陽性細胞であった。一方、上皮細胞、T細胞およびB細胞は IL-6 の陽性細胞像としては検出されなかった(図9)。さらに、IL-6 陽性の線維芽細胞は、血管内皮細胞および炎症性細胞浸潤が著明に観察される部位に多く観察され、炎症所見の乏しい部位には IL-6 陽性の線維芽細胞はあまり観察されなかった(図10)。

考 察

本研究は歯周病の発症と進行におけるサイトカインネットワークの中で、歯肉線維芽細胞が IL-6 産生を介した役割を評価することを目的に、培養歯肉線維芽細胞における IL-6 産生の動態および調節機構について検討し、さらに、炎症歯肉における線維芽細胞の IL-6 産生の様態について調べたものである。

得られた知見の概要は次の通りである。1) 歯肉線維芽細胞は IL-6 産生能を有する、2) 歯肉線維芽細胞の IL-6 産生は、細胞自らが産生する PGE₂ によって調節される、3) IL-6 は歯肉線維芽細胞に対しミトジェン活性を示さず、またそのコラーゲン合成能に影響を及ぼさない、4) 歯肉線維芽細胞は IL-6 R の mRNA を発現しない、5) 炎症歯肉において線維芽細胞は IL-6 陽性細胞の 1 つである。

本論文の緒言において、歯周病の病態に関わる IL-6 の研究の現状は、ほとんど何も分かっていないように紹介した^{12,13)}。しかし、本論文の執筆中に著者が取り上げた研究目的と同じ立場から、培養歯肉線維芽細胞ならびに歯肉組織における線維芽細胞が IL-6 を産生することを示した Bartold ら²⁸⁾の研究報告に接した。従って、上述した歯肉線維芽細胞の IL-6 産生の動態、および炎症歯肉における線維芽細胞の IL-6 産生の様態に関する結論については、一部著者が得た結果と合わせて考察を加える必要が生じた。

本研究では、まず歯肉線維芽細胞の IL-6 産生機構を基本的に把握する上で、線維芽細胞の IL-6 産生の動態を IL-6 mRNA ならびに IL-6 活性の発現段階から検討した。その結果、IL-1 β あるいは TNF α の刺激を受けた歯肉線維芽細胞は IL-6 mRNA を発現し、細胞外に IL-6 を分泌することが明らかとなった。この点に関して前述の Bartold ら²⁸⁾も、IL-1 β 、歯周病原性細菌の LPS、あるいは FCS で刺激した歯肉線維芽細胞が IL-6 を産生すると結論している。ただし、彼らは歯肉線維芽細胞の IL-6 産生の有無を IL-6 活性の

測定によって行っているのみである。歯肉線維芽細胞が刺激を受け最終的に IL-6 を細胞外に分泌するまでには、刺激に対するレセプター発現、細胞内の情報伝達、IL-6 mRNA 発現、さらに蛋白合成、分泌などの段階が存在すると考えられている。IL-6 産生はこれらいずれの段階でも調節を受けると考えられるため、IL-6 産生機構を把握する上で各段階から IL-6 産生の動態を解析することが望まれる。その点、著者は歯肉線維芽細胞をサイトカインで刺激した時の IL-6 活性を調べるだけでなく、mRNA レベルでの発現をも合わせて調べることによって、細胞内における IL-6 産生の動態を鋭敏に捉えることができた。したがって、歯肉線維芽細胞が示す IL-6 産生動態の生物学的意味合いを解釈する上で、より詳細な情報を提供したことになる。また、サイトカインで刺激しない対照系において IL-6 mRNA の発現を検出したが、培養上清に有意な IL-6 活性の上昇は検出されないという結果を得た。mRNA レベルでの検出と活性レベルでの検出結果の違いは、両者の測定方法が検出感度の点で大きな差があるので不思議ではない。本研究で用いた RT-PCR 法では 10⁻⁸ pmol という微量な mRNA の検出が可能である。また、本研究における細胞の約 5 倍量を用い、培養時間を 2 倍に延長した条件下では刺激のない場合にも培養上清中に低いながら IL-6 活性を認めることを示した Bartold²⁸⁾の報告と合わせ考えるなら、歯肉線維芽細胞は刺激のない状態でも IL-6 を産生する細胞であると考えられる。

さて、本研究では IL-1 β あるいは TNF α で刺激した歯肉線維芽細胞の IL-6 mRNA 発現のパターンおよび得られた IL-6 活性には、刺激の違いによってそれぞれ差が認められた。IL-6 mRNA の発現パターンについては、ヒト包皮由来線維芽細胞においても報告^{29,30)}されており、IL-6 の細胞内情報伝達系の解析結果から、IL-6 mRNA の発現を増大させる経路が IL-1 β と TNF α では異なる可能性が示唆されている。IL-1 β あるいは TNF α の刺激に対する歯肉線維芽細胞の IL-6 産生経路あるいは IL-6 誘導能の差についても、細胞内情報伝達系の違いという観点から調べる必要があろう。

歯肉線維芽細胞の IL-6 産生は、細胞自らが産生する PGE₂ によって部分的に抑制されることが示された。著者の研究グループは、かつて PGE₂ が歯肉線維芽細胞の細胞増殖、DNA 合成、コラーゲン合成および非コラーゲン蛋白合成を抑制すること³¹⁾、そして、IL

$\text{IL-1}\beta$ が歯肉線維芽細胞の DNA 合成およびコラーゲン合成を細胞自らが産生する PGE_2 を介して抑制することを報告²⁶⁾した。また、歯肉線維芽細胞は由来を異にする線維芽細胞のなかでも、 IL-1 の刺激によって PGE_2 を著明に産生する特徴を有していることも知られている³²⁾。このようなことから、 PGE_2 を介する IL-6 産生のフィードバック調節機構については関心が持たれる。 PGE_2 以外で IL-6 産生を抑制する物質として、transforming growth factor- β ($\text{TGF}\beta$) あるいはグルコルチコイドが $\text{IL-1}\beta$ および $\text{TNF}\alpha$ で刺激した血管内皮細胞の IL-6 産生を抑制することが報告³³⁻³⁵⁾されている。ただし、 $\text{TGF}\beta$ の IL-6 産生抑制のメカニズムは不明であり、 $\text{IL-1}\beta$ あるいは $\text{TNF}\alpha$ のレセプター発現を抑制するために起こるのではないかと推察されているにすぎない。一方、グルコルチコイドについては、 IL-6 mRNA の発現を抑制することによって IL-6 産生を抑制することが示されている。 PGE_2 が $\text{IL-1}\beta$ で刺激した歯肉線維芽細胞の IL-6 mRNA の発現段階には影響しないという本研究結果から、 PGE_2 が上述のグルコルチコイドのように IL-6 mRNA の発現段階の調節に関わる可能性は低く、むしろ細胞が mRNA を発現した後に PGE_2 が働くのであろうと考えられる。 PGE_2 が歯肉線維芽細胞の DNA 合成および高分子基質合成を著明に抑制する作用があること³¹⁾と考え合わせると、 IL-6 が蛋白として合成される段階、あるいは IL-6 が分泌型となる段階において PGE_2 の調節が働くと考えるのが妥当かも知れない。

Zhang ら³⁶⁾はヒト包皮由来線維芽細胞を用いた研究において、 PGE_1 がサイクリック AMP (cAMP) を介する経路を促進することによって、 IL-6 mRNA の発現ならびに IL-6 産生を促進することを報告している。PG の作用は PG の種類あるいは作用を受ける細胞の種や由来によって異なる^{37,38)}ので、彼らの報告と本研究結果に違いがあっても決して矛盾しない現象であると解釈することもできる。しかし、 PGE_1 と同様に、 PGE_2 は歯肉線維芽細胞の細胞内 cAMP レベルを上昇させる作用を有している³¹⁾ことからすれば、彼らの報告は本研究結果に相反する現象を示すものである。このことについては、歯肉線維芽細胞において IL-6 がどのような細胞内情報伝達系を介して発現するかが未だに不明であるため、これ以上の考察はできない。ヒト包皮由来線維芽細胞を用いた研究では、 IL-6 の細胞内情報伝達系は 1) cAMP-A キナーゼ系^{36,39)}、2)

ジアシルグリセロール (DG)-C キナーゼ系⁴⁰⁾、3) 1) 2) 以外にも他の未知の系を介する³⁹⁾とされ、統一した見解はないものの非常に注目されている。今後、歯肉線維芽細胞における IL-6 の細胞内情報伝達系が明らかになれば、 IL-6 産生調節機構もさらに明確にされると思われる。

歯肉線維芽細胞の DNA 合成能およびコラーゲン合成能に及ぼす IL-6 の影響、さらに、歯肉線維芽細胞の IL-6 R の発現について調べ、歯肉線維芽細胞には IL-6 のオートクリン調節機構は存在しないとの結論を得た。ラットメサングウム細胞では、 IL-6 がオートクリン増殖因子として作用することが示されている⁴¹⁾。また、 IL-6 はヒト上皮細胞の細胞増殖を促進することが知られている⁴²⁾。さらに、 IL-6 はマウス血管平滑筋細胞に対し、血小板由来成長因子 (PDGF) の産生を介し細胞増殖を促進することが報告⁴⁴⁾されている。その一方、ヒト血管内皮細胞では、 IL-6 は細胞増殖、白血球への付着能、あるいは PGE_2 産生にまったく影響しないことを示した報告^{44,45)}もある。このように、 IL-6 の作用は細胞の種や由来の違いによって異なっており報告されていることに着目する必要がある。一方、歯肉線維芽細胞の機能に IL-6 がどのように作用しているかを考察し得る研究報告はこれまでに全くなく、 IL-6 が歯肉線維芽細胞の DNA 合成能およびコラーゲン合成能にまったく影響を及ぼさないことを示した本研究結果は初めての知見である。さらに、線維芽細胞の IL-6 の mRNA 発現は、 IL-6 自身によっては影響されないという知見も得ている。

IL-6 の作用は IL-6 R を介し細胞内に伝達されるので、歯肉線維芽細胞が IL-6 R を発現するかどうかは、 IL-6 が歯肉線維芽細胞の機能に影響を与える可能性を調べる上で関心が持たれる。歯肉線維芽細胞の IL-6 R に関する研究はこれまで報告がないが、歯肉以外の様々な組織由来の細胞が IL-6 R を発現することは明らかにされている⁴⁶⁾。しかし、ヒトの末梢血 B 細胞のように、通常は IL-6 R を発現していないが、マイトジェン刺激によってプラスト化した場合に IL-6 R を発現するようになる例もある⁴⁶⁾。そのようなことから、歯肉線維芽細胞を $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{TNF}\alpha$ あるいは IL-6 で刺激して IL-6 R の mRNA 発現を調べる研究を行った。歯肉線維芽細胞の IL-6 R の mRNA 発現は、非常に微量な mRNA の検出が可能である RT-PCR 法によっても検出することができなかった。さらに、抗 IL-6 R 抗体を用いて培養歯肉線維芽細胞に免疫染色を施した場合

においても IL-6 R を検出することができなかった。したがって、IL-6 が歯肉線維芽細胞に対しマイトジェン活性を示さず、また、そのコラーゲン合成能に影響を及ぼさなかったのは、同細胞が IL-6 R を有していないためによると考えられ、歯肉線維芽細胞が産生する IL-6 は、少なくとも線維芽細胞の機能にはオートクリンに作用していないであろうと結論することができる。

歯周病患者から得た歯肉組織においても線維芽細胞が IL-6 陽性細胞として検出された。炎症歯肉における IL-6 陽性細胞が何であるかの研究は、本研究と同じ方法を用いて高橋⁴⁷⁾が行っており、線維芽細胞、血管内皮細胞およびマクロファージが IL-6 陽性細胞であるとの結果を得ている。また、このことは前述の Bartold ら²⁸⁾の報告にも見ることができる。しかし、Bartold らは非炎症部の線維芽細胞や上皮細胞においても IL-6 が局在したと述べている。本研究の免疫組織所見では、IL-6 陽性の線維芽細胞は血管内皮細胞および炎症性細胞浸潤が著明な所に多く観察され、炎症所見の乏しい組織像を呈している所では少なく観察されている。ただし、この結果は炎症の程度および IL-6 陽性の線維芽細胞の割合を数値化して比較検討したものではないので、線維芽細胞由来の IL-6 と炎症との関連を裏付けるものではない。しかし、少なくとも歯肉組織において線維芽細胞が IL-6 産生を介し血管内皮細胞あるいは単核球と相互に関わり合っていることは示唆できる。また、炎症歯肉において非リンパ球系の細胞が IL-6 陽性細胞であったことは、炎症部に浸潤するいわゆる免疫担当細胞のみならず、線維芽細胞および血管内皮細胞などの結合組織の構成細胞が炎症反応の調節に関与することを示唆するものである。

以上の考察から、歯肉線維芽細胞は種々の刺激に応じて IL-6 を産生することで歯周病の炎症反応に関与していることを示すことができた。線維芽細胞由来の IL-6 は炎症のメディエーターとして、B 細胞の抗体産生細胞への分化を誘導し、歯周病に特徴的とされる B 細胞病変⁴⁸⁾ならびに慢性炎症の成立に寄与する可能性も示唆される。本研究で得た知見は、サイトカインネットワークにおける歯肉線維芽細胞の役割のごく一部にすぎず、その役割が十分に評価できたとはまだ言い難いかも知れない。しかし、本研究のような歯肉線維芽細胞のとりわけ免疫担当細胞としての役割を明確にしてゆく試みが歯周病の病態を解析するために必要であろう。

結 論

歯肉線維芽細胞がサイトカインネットワークの構成細胞として、歯周病の発症と進行において果たす役割を評価することを目的に、培養歯肉線維芽細胞から産生される IL-6 の動態および産生調節機構、さらに炎症歯肉における線維芽細胞の IL-6 産生の様態について検討した。得られた結論は次のとおりである。

1. IL-1 β あるいは TNF α の刺激を受けた歯肉線維芽細胞は IL-6 mRNA を発現し、細胞外に IL-6 を分泌する。このことは、歯肉線維芽細胞は IL-6 産生細胞として歯周病の炎症反応に関与することを示すものである。
2. 歯肉線維芽細胞は自ら産生する PGE₂ を介して IL-6 産生を部分的に調節する。
3. IL-6 は歯肉線維芽細胞に対してマイトジェン活性を示さず、そのコラーゲン合成能に影響を及ぼさない。また、歯肉線維芽細胞は IL-6 R を発現していない。これらのことは、歯肉線維芽細胞は IL-6 の標的細胞ではなく、線維芽細胞が産生する IL-6 はオートクリンに作用していないことを意味する。
4. 炎症歯肉の免疫組織学的検索から、線維芽細胞は IL-6 陽性細胞であることが確かめられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、始終懇篤な御指導と後校閲を賜りました岡山大学歯科保存学第 2 講座、村山洋二教授に深く感謝いたします。また、本研究を遂行するに際し、種々の面にわたり貴重な御援助、御助言、御協力を頂いた野村慶雄助教授、高柴正悟助手、高橋慶壮学士をはじめとする歯科保存学第 2 講座の皆様にご心から感謝致します。さらに、IL-6 cDNA をはじめ貴重な材料を快く御恵み下さった大阪大学医学部第三内科、岸本忠三博士に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 島袋善夫, 村上伸也, 武田ゆか, 岡田 宏: 歯肉由来線維芽細胞による HLA-DR 抗原発現機能の解析. 日歯周誌, 秋季特別号, 30: 88, 1988.
- 2) 花澤重正, 北野繁雄: 歯肉組織細胞とサイトカイン. 歯科ジャーナル, 31: 947-953, 1990.
- 3) Takada, H., Mihara, J., Morisaki, I. and Hamada, S.: Production of cytokines by human gingival fibroblasts, Hamada, S., Holt, S.C., McGhee, J.R.,

- Periodontal Disease: Pathogens and Host Immune Responses, Quintessence, Tokyo, 1991., 265-276.
- 4) Richards, D. and Rutherford, R.B.: The effects of interleukin 1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal-ligament and gingival fibroblast. Arch. Oral Biol., 33: 237-243, 1988.
 - 5) Mochan, E., Armor, L. and Sporer, R.: Interleukin 1 stimulation of plasminogen activator production in cultured gingival fibroblasts. J. Periodont. Res., 23: 28-32, 1988.
 - 6) Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., Nakajima, K., Pyun, K.H. and Kishimoto, T.: Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 5490-5494, 1985.
 - 7) Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K. and Kishimoto, T.: The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. J. Exp. Med., 167: 332-344, 1988.
 - 8) Lotz, M., Jirik, F., Kabouridis, P., Tsoukas, C., Hirano, T., Kishimoto, T. and Carson, D.A.: B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a co-stimulant for human thymocytes and T lymphocytes. J. Exp. Med., 167: 1253-1258, 1988.
 - 9) Takai, Y., Wong, G.G., Clark, S.C., Burakoff, S.J. and Herrmann, S.H.: B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. J. Immunol., 140: 508-512, 1988.
 - 10) Ishimi, Y., Miyaura, C., Jin, C.H., Akatsu, T., Abe, E., Nakamura, Y., Yamaguchi, A., Yoshiki, S., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T. and Suda, T.: IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. J. Immunol., 145: 3297-3303, 1990.
 - 11) 鎌形有祐, 宮坂信之, 井上裕子, 橋本純子, 飯田正人: ヒト炎症歯肉組織から産生されるサイトカインに関する検討—特にインターロイキン6について—. 日歯周誌, 31: 1081-1087, 1989.
 - 12) Kono, Y., Beagley, K.W., Fujihashi, K., McGhee, J. R., Taga, T., Hirano, T., Kishimoto, T. and Kiyono, H.: Cytokine regulation of localized inflammation: Induction of activated B cells and IL-6-mediated polyclonal IgG and IgA synthesis in inflamed human gingiva. J. Immunol., 146: 1812-1821, 1991.
 - 13) Takada, H., Mihara, J., Morisaki, I. and Hamada, S.: Induction of Interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* lipopolysaccharides. Infect. Immun., 59: 295-301, 1991.
 - 14) 後藤弘幸, 木下正彦, 野村慶雄, 清水秀樹, 宝来宏治, 小野耕資, 新井英雄, 難波秀樹, 栗原英見, 村山洋二: 歯周組織由来線維芽細胞の代謝機能—歯周病の病型の違い—. 日歯保誌, 30: 706-715, 1987.
 - 15) 清水秀樹, 宝来宏治, 木下正彦, 野村慶雄, 村山洋二: 根管治療薬のヒト線維芽細胞に及ぼす影響. 日歯保誌, 28: 1389-1402, 1985.
 - 16) Tsujimoto, M., Yip, Y.K. and Vilcek, J.: Tumor necrosis factor: Specific binding and internalization in sensitive and resistant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 7626-7630, 1985.
 - 17) Rappolee, D.A., Wang, A., Mark, D. and Werb, Z.: Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells. J. Cell. Biol., 39: 1-11, 1989.
 - 18) Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem., 162: 156-159, 1987.
 - 19) Yasukawa, K., Hirano, T., Watanabe, Y., Muratani, K., Matsuda, T., Nakai, S. and Kishimoto, T.: Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. EMBO Journal, 6: 2939-2945, 1987.
 - 20) Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T. and Kishimoto, T.: Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IL-6) receptor. Science, 12: 825-828, 1988.
 - 21) Nakajima-Iijima, S., Hamada, H., Reddy, P. and Kakunaga, T.: Molecular structure of the human cytoplasmic β -actin gene: Interspecies homology of sequences in introns. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 6133-6137, 1985.
 - 22) Noonan, K.E., Beck, C., Holzmayer, T.A., Chin, J. E., Wunder, J.S., Andrulis, I.L., Gazdar, A.F., Willman, C.L., Griffith, B., Von Hoff, D.D. and Roninson, I.B.: Quantitative analysis of *MDR 1* (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 7160-7164, 1990.
 - 23) Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989, 6.1-6.19.
 - 24) Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., 98: 503-517, 1975.
 - 25) Matsuda, T., Hirano, T. and Kishimoto, T.: Establishment of an interleukin 6 (IL 6)/B cell stimulatory factor 2-dependent cell line and preparation of anti-IL 6 monoclonal antibodies. Eur. J. Immunol., 18: 951-956, 1988.
 - 26) 滝川雅之, 野村慶雄, 木下正彦, 清水秀樹, 後藤弘幸, 新井英雄, 樋口 豊, 鷲尾憲文, 村山洋二: ヒト歯肉線維芽細胞の機能に及ぼすインターロイキン-1 β の影響. 日歯保誌, 35: 554-563, 1992.
 - 27) Hirata, Y., Taga, T., Hibi, M., Nakano, N., Hira-

- no, T. and Kishimoto, T. : Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Immunol.*, 143 : 2900-2906, 1989.
- 28) Bartold, P.M. and Haynes, D.R. : Interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *J. Periodont. Res.*, 26 : 339-345, 1991.
- 29) Walther, Z., May, L.T. and Sehgal, P.B. : Transcriptional regulation of the interferon- β_2 /B cell differentiation factor BSF-2/hepatocyte-stimulating factor gene in human fibroblasts by other cytokines. *J. Immunol.*, 140 : 974-977, 1988.
- 30) Defilippi, P., Poupart, P., Tavernier, J., Fiers, W. and Content, J. : Induction and regulation of mRNA encoding 26-kDa protein in human cell lines threatened with recombinant human tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84 : 4557-4561, 1987.
- 31) 新井英雄 : ヒト骨肉線維芽細胞のプロスタグランジンに対する応答に関する研究—プロスタグランジン E_2 の DNA 合成への作用機序について—。 *日歯周誌*, 32 : 402-421, 1990.
- 32) Newton, R.C. and Covington, M. : The activation of human fibroblast prostaglandin E production by interleukin 1. *Cell. Immunol.*, 110 : 338-349, 1987.
- 33) Shalaby, M.R., Waage, A. and Espevik, T. : Cytokine regulation of interleukin 6 production by human endothelial cells. *Cell. Immunol.*, 121 : 372-382, 1989.
- 34) Waage, A., Slupphaug, G. and Shalaby, R. : Glucocorticoids inhibit the production of IL 6 from monocytes, endothelial cells and fibroblasts. *Eur. J. Immunol.*, 20 : 2439-2443, 1990.
- 35) Helfgott, D.C., May, L.T., Sthoeger, Z., Tamm, I. and Sehgal, P.B. : Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of β_2 interferon by human fibroblasts. *J. Exp. Med.*, 166 : 1300-1309, 1987.
- 36) Zang, Y., Lin, J.X. and Vilcek, J. : Synthesis of interleukin 6 (interferon- β_2 /B cell stimulatory factor 2) in human fibroblasts is triggered by an increase in intracellular cyclic AMP. *J. Biol. Chem.*, 263 : 6177-6182, 1988.
- 37) 宝田誠逸 : アラキドン酸カスケード, 宝田誠逸, プロスタグランジンと病態, 第3版, 東京化学同人, 東京, 1986, 3-37.
- 38) 鹿取 信 : 生物活性と整作用の概要, 山本尚三, 鹿取 信, プロスタグランジン研究法 (上), 東京化学同人, 東京, 1986, 32-37.
- 39) Zang, Y., Lin, J.X., Yip, Y.K. and Vilcek, J. : Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibroblasts : Role in the induction of interleukin 6, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85 : 6802-6805, 1988.
- 40) Sehgal, P.B., Walther, Z. and Tamm, I. : Rapid enhancement of β_2 -interferon/B-cell differentiation factor BSF-2 gene expression in human fibroblasts by diacylglycerols and the calcium ionophore A23187. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84 : 3663-3667, 1987.
- 41) Horii, Y., Muraguchi, A., Iwano, M., Matsuda, T., Hirayama, T., Yamada, H., Fujii, Y., Dohi, K., Ishikawa, H., Ohmoto, Y., Yoshizaki, K., Hirano, T. and Kishimoto, T. : Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J. Immunol.*, 143 : 3949-3955, 1989.
- 42) Grossman, R.M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D.P., May, L.T., Kupper, T. S., Sehgal, P.B. and Gottlieb, A.B. : Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86 : 6367-6371, 1989.
- 43) Ikeda, U., Ikeda, M., Oohara, T., Oguchi, A., Kamitani, T., Tsuruya, Y. and Kano, S. : Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner. *Am. J. Physiol.*, 260 : H1713-H1717, 1991.
- 44) Podor, T.J., Jirik, F.R., Loskutoff, D.J., Carson, D. A. and Lotz, M. : Human endothelial cells produce IL-6 : Lack of responses to exogenous IL-6. *Ann. New York Acad. Sci.*, 374-387, 1990.
- 45) Sironi, M., Breviario, F., Proserpio, P., Biondi, A., Vecchi, A., Van Damme, J., Dejana, E. and Mantovani, A. : IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J. Immunol.*, 142 : 549-553, 1989.
- 46) Taga, T., Kawanishi, Y., Hardy, R.R., Hirano, T. and Kishimoto, T. : Receptors for B cell stimulatory factor 2 : Quantitation, specificity, distribution, and regulation of their expression. *J. Exp. Med.*, 166 : 967-981, 1987.
- 47) 高橋慶壮 : 歯周病の進行におけるインターロイキン 6 の様態に関する研究。 *日歯周誌*, 35 : 1992. (投稿中)
- 48) Tew, J., Engel, D. and Mangan, D. : Polyclonal B-cell activation in periodontitis. *J. periodont. Res.*, 24 : 225-241, 1989.

連絡先 :

岡山大学歯学部歯科保存学第2講座

〒700 岡山市鹿田町2-5-1