IL-1 β 添加による培養ヒト歯肉上皮細胞の 細胞骨格および膜蛋白の変化

長谷川 郁 夫

昭和大学歯学部歯周治療学教室

(指導：長谷川紘司教授)

(平成 10 年 2 月 12 日受付)

Alteration of Cytoskeleton and Membrane Proteins in Human Gingival Epithelial Cells by Treatment with Interleukin-1 β : *in Vitro* Study

Ikuo Hasegawa

Department of Periodontics, Showa University Dental School

2-1-1 Kitasenzoku, Ohta-ku, Tokyo 145-8515, Japan

(Director : Kohji Hasegawa)

The oral mucosa became inflamed as a result of functional impairment and morphological degeneration caused by a variety of etiologic factors. In this study, the experimental degradation of the mucosal epithelial cells was investigated by treatment with a typical inflammatory stimuli. Human gingival epithelial cells obtained from clinically healthy gingiva were cultured for 24 or 48 hours and treated with 2.5 ng/ml and 25 ng/ml interleukin-1 β (IL-1 β). The following results were obtained. Light microscopy did not reveal any marked change except for slight widening of the intercellular space in the treated group. Ultrastructural examination, however, showed flattened cells, widened intercellular space, and degenerated and partially lost cell processes in the treated group. The actin filaments

oriented in all directions in the cytoplasm in the control group. In the treated group, they had become aggregated or formed bundles and lost their original morphology as stress fiber. In addition, expression of the cell membrane lining proteins, Vinculin and Focal Adhesion Kinase (FAK), had diminished in number or disappeared. Immunohistochemical study with antibodies for Vinculin and FAK showed that they were localized on the cell membrane in the control group, whereas in the treated group, they were diffusely distributed in cytoplasm around the nucleus. These findings might afford additional experimental morphological bases to the impaired gingival epithelial function by inflammatory stimuli.

Key words : Human gingival epithelial cells, Interleukin-1 β , Cytoskeleton, Vinculin, FAK

要旨：口腔粘膜は種々の病因により、機能的あるいは形態的な変化に続き、その防御機構が破壊される。本研究は炎症性サイトカイン刺激による培養ヒト歯肉上皮細胞の細胞骨格や細胞膜裏打ち蛋白の変化を検索することを目的としたものである。ヒト歯肉上皮細胞は臨床的に健康な歯肉より採取し、炎症性サイトカイン刺激として Interleukin-1 β (IL-1 β) を用いた。光顕的観察では刺激群は対照群と比較し、細胞間隙の軽度の拡大を認めた以外に顕著な変化を示さなかったが、その超微形態的観察では細胞は扁平化し、細胞間隙の拡大、細胞突起の変性および消失を認めた。さらに、対照群ではアクチンフィラメントは細胞質内を縦横に走行していたが、刺激群では凝集や束状配列を示し、ストレスファイバーとしての形態を喪失していた。また、細胞膜裏打ち蛋白である Vinculin と FAK (Focal adhesion kinase) は、刺激群ではいずれもその発現量が減弱あるいは消失してい

た。加えて、Vinculin, FAK の抗体を用いた免疫組織化学検索では、対照群では細胞膜に一致した分布を示したが、刺激群ではそれらの蛋白は細胞膜部での分布を示さず、核周辺の細胞質にビマン性の分布を示した。以上の結果より、IL-1 β 刺激によって歯肉上皮は細胞膜裏打ち蛋白やアクチンフィラメントの形態的变化を引き起こし、細胞突起の消失や細胞間隙の拡大をもたらす、正常の生理的上皮機能から逸脱する可能性が示唆された。

索引用語：ヒト歯肉上皮細胞, IL-1 β , 細胞骨格, Vinculin, FAK

緒 言

歯周炎は歯周病原性細菌もしくはその関連物質が歯周組織に侵入し、歯と歯肉の接合を破壊し歯槽骨吸収を起こす炎症性疾患である。この細菌性因子の侵入は上皮組織より始まり、その後上皮組織の生理的および機能的構造が破壊されると、炎症はさらに深部の歯周組織へと波及し歯周炎が進展する¹⁻⁴⁾。

一般に角化扁平上皮である歯肉上皮は、種々の外來性刺激に対しては角質層自体のバリアー機能、あるいは Membrane Coating Granule (MCG) で代表される生理的透過性関門による防御機構を有する。しかしながら、歯周組織の中でも付着上皮などの非角化性扁平上皮ではこれらのバリアー機構がなく、単に上皮細胞の細胞質内に異物の処理を行うライソゾーム、細胞微小器官が発達しているという形態的特徴を有することの他に^{5,6)}、上皮細胞突起の運動あるいは上皮内に浸潤した好中球などによる防御反応などが考えられる⁷⁻⁹⁾。つまり、歯肉溝上皮を含む口腔粘膜上皮に種々の刺激が加わった場合に起きる変化は刺激による細胞の形態的变化、生化学的变化であると考えられることができる。

この、細胞の形態的变化は細胞骨格により規制されている¹⁰⁾。細胞骨格は微小管、アクチンフィラメント、および中間径フィラメントの3種類の蛋白性線維から成り立っている。それらはすべて基本単位のタンパク質の重合体であることを特徴とし、基本的にはその線維の両端は free end で終わることなく細胞膜と結合している。また、それらの線維には様々な結合蛋白が付随しており、それらを介して3種の蛋白線維が相互作用をしている。この相互作用は静的なものではなく、種々の刺激に対応した動的なものとしても知られている¹⁰⁾。

特に、アクチンフィラメントは細胞内の様々な場所に局在するが、細胞分裂時には分裂溝に集合し、ATPase と共同で細胞膜を内側に引き込む作用を担い、細胞増殖や細胞形態維持に重要な機能を果たしている。また、アクチン線維はお互いの細胞間の結合に関与するアドヘレンスジャンクションと細胞と細胞外基質の接着に関与するフォーカルコンタクトに細胞の

内面から結合しており、これらの結合は細胞のシグナル伝達系の経路となっている。

アクチンフィラメントの結合部にはさらに結合蛋白あるいは細胞膜裏打ち蛋白として知られている Vinculin や Focal Adhesion Kinase (FAK) がある。これらの裏打ち蛋白のアクチンフィラメントとの解離やリン酸化不全は、細胞の運動性の低下や細胞代謝不全を引き起こすことが知られており、アクチンフィラメントと共に細胞の増殖、形態維持に有用な役割を担っている¹¹⁾。

一方、炎症が起こると種々の細胞からサイトカインが産生され、産生されたサイトカインによって上皮組織や結合組織が障害を受ける。このようなサイトカインによる組織障害は、歯周組織の再生を妨げる要因となる。炎症性サイトカイン刺激に対する粘膜上皮の反応は、上皮より産生されるサイトカインが免疫反応を調整する役割と、様々な刺激により誘導された上皮下結合組織に浸潤する活性化Tリンパ球由来のサイトカインによる炎症性の免疫反応の役割であると考えられる。特に、Interleukin-1 β (以下 IL-1 β) は生理的状态でも上皮細胞から産生されるが、外傷、炎症性刺激、紫外線照射などの刺激が加わると、その産生が促進される。また種々の刺激が加わると上皮細胞では IL-1 β を遊離するだけでなく、上皮細胞の IL-1 β リセプターの発現も上昇するために、上皮細胞が産生した IL-1 β が上皮細胞の破壊にも関与する¹²⁻¹⁴⁾。そしてこれらのサイトカインはリンパ球や多形核白血球の遊走、増殖を誘導する。さらに IL-1 β はコラゲナーゼの産生の誘導、プロスタグランジン E₂ の産生、骨吸収の促進にも深く関与するために¹⁵⁻¹⁷⁾、IL-1 β は幅広く互いにオーバーラップする生物学的活性があり、炎症性歯周病変の発症および進行に重要な役割を果たしていると考えられる。

このように、病因刺激が加わった場合、上皮細胞はその刺激を防御あるいは排除する機構が本来備わっている。しかしながら、各種炎症性サイトカイン刺激で上皮細胞がいかなる変化を生じて破壊されるかの詳細については不明な点が多い。そこで本研究は炎症性サイトカインの一つである IL-1 β を、培養ヒト歯肉由来上皮細胞 (Human Gingival Epithelial cells; 以下 HGE 細胞) に添加し、その超微形態と細胞骨格であ

るアクチンフィラメント, および細胞骨格を規制している細胞膜裏打ち蛋白の検索を行い, IL-1 β 添加によるヒト歯肉上皮の影響を観察したものである。

材料および方法

1. 培養ヒト歯肉上皮細胞の分離

HGE細胞の採取にあたり, 臨床的に健康な歯肉を有し口腔外科手術を行う必要のある20代の患者をボランティアとして選択した。歯肉採取にあたりボランティアには, 十分なインフォームドコンセントを得た。

歯肉は下顎埋伏歯抜歯時に下顎埋伏智歯周辺の歯肉または, 下顎枝矢状分割咬合改善術時に分割下顎骨辺縁歯肉を採取した。歯肉切除後, 直ちに滅菌Mg, Ca不含リン酸緩衝液(以下PBS(-))中にて洗浄し, 血液成分を可及的に除去した。この歯肉片を眼下用ハサミにて結合組織部を除去した後, さらに細分し, 500 unit/ml 結晶ペニシリンGカリウム(明治製菓, 東京), 500 μ g/ml 硫酸ストレプトマイシン(明治製菓, 東京), および3 μ g/ml fungizone(Gibco, USA)含有PBS(-)にて, 10分ずつ4回洗浄し, 浸漬滅菌を行った。その後, 細分した歯肉片を0.1%トリプシン含有Earle's balanced salts溶液(SIGMA Chemical Co., USA)中で4°C, 12時間浸漬を行った。

上皮細胞の分離には実体顕微鏡下で上皮組織部と結合組織部を剥離し, 上皮組織片は0.05%トリプシン/EDTA(Difco, USA)溶液で処理を行い, HGE細胞を分離した。HGE細胞の培養液はkeratinocyte-SFM(Gibco BRL, USA)を用いた。培養環境は37°C 5% CO₂, 95% Air気相下で行った。

2. 培養方法

HGE細胞の培養は6穴マルチプレート(Falcon, USA)に, 又はLAB-TEKチャンパー(Nalge Nunc International, USA)の各ウェルに5 $\times$ 10⁴個のHGE細胞を播種し, 3日から5日培養後, セミコンフルエントの状態にてRecombinant Human Interleukin-1 β (Genzyme, USA)を2.5 ng/ml, および25 ng/mlの濃度で各wellに1 ml添加し, 24時間もしくは48時間培養した。

3. アクチンフィラメントの観察

アクチンフィラメントの観察はHallら¹⁸⁾の方法に従って行った。すなわち, IL-1 β 刺激終了後, 3.7%パラフォルムアルデヒドにて20分間室温にて固定後PBS(-)にて洗浄し, 0.5% Triton X-100にて5分室温でインキュベートを行い, FITC Labeled

Phalloidin(SIGMA Chemical Co., USA)にて1時間, 室温にて染色を行った。染色後, 通法に従いGel-MOUNT™(BIOMEDIA, USA)で封入を行った。観察は蛍光顕微鏡(OLYMPUS, 東京)にて行った。

4. 電子顕微鏡観察

HGE細胞培養終了後, カコジレート緩衝液にて4°C, 3回洗浄後, カルノフスキー溶液(2.5% グルタルアルデヒド, 2% パラフォルムアルデヒド, 0.1 M カコジレート溶液, pH 7.4)にて1時間固定(4°C)した。後固定は1% オスミウム液にて1時間(4°C)行った。以下, 通法に従い上昇アルコール系列で脱水を行い, 無水アルコール・エポンで浸漬, 置換後Poly Bed 812(Polysciences, USA)にて包埋した。薄切は細胞に対して縦断面で超薄切片を作製した。超薄切片は, 酢酸ウラニル・クエン酸鉛による二重染色を施し, 透過型電子顕微鏡(日立-300電子顕微鏡, 日立, 東京)にて観察, 撮影を行った。

5. 免疫染色

IL-1 β 刺激終了後, 3.7%パラフォルムアルデヒド(TAAB, UK), 0.5% Triton-X 100(SIGMA Chemical Co., USA)で20分室温にて固定後, PBS(-)にて洗浄し, 一次抗体として, Anti Human Vinculin抗体(mouse, monoclonal)(SIGMA Chemical Co., USA)およびAnti Human Focal Adhesion Kinase抗体(Rabbit, polyclonal)(Takara, 京都)を用い, 37°Cにて1時間反応後, 一次抗体の動物種にあわせマウスS-HRP染色キット(生化学工業, 東京), ウサギS-HRP染色キット(生化学工業, 東京)を用い, 染色はDAB基質キット(生化学工業, 東京)にて行った。一次抗体は純水にて, 抗Vinculin抗体, 抗FAK抗体ともに200倍希釈で使用した。免疫染色後通法に従い核染色を行い, 封入を行った。

6. Western Blotting

IL-1 β 刺激終了後, 培養細胞はPBSで3回洗浄し, サンプルバッファー(0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10%グリセリン(和光純薬工業, 大阪)), 10% SDS(SIGMA Chemical Co., USA), bromphenol blue(SIGMA Chemical Co. USA)を加えて細胞を溶解し, 試料とした。試料の細胞数は6穴シャーレ1 wellにコンフルエントの状態の1 $\times$ 10⁶個/wellとした。その後10% Sodium Dodecyl Sulfate ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)でタンパクの分離を行った。泳動はスラブゲル電気泳動装置(マリソル社, 東京)を用いて行った。泳動条件は2時間30分, 4°C, 80 V定電圧で行った。

SDS-PAGE 後ゲルからニトロセルロース膜への転写はゲルメンブラン転写装置（マリソル社，東京）を用い，ニトロセルロース膜は Hybond-C（Amersham, UK）を用いて行った。ニトロセルロース膜への転写は 2 時間，4°C，60 V 定電圧で行った。転写終了後 Western blot kit（KBL Lab., USA）を用いた。一次抗体として，前述した抗 Vinculin 抗体（純水にて 2,000 倍希釈）および抗 FAK 抗体（純水にて 1,000 倍希釈）を用い 37°C にて 1 時間反応した。

結 果

1. 位相差顕微鏡観察

対照群の HGE 細胞は類円形の細胞が敷石状に増殖する細胞として認められた。細胞間隙は狭く，互いに隣接する細胞と密に接していた。これらの細胞に IL-1 β 刺激を行った場合，いずれの濃度の刺激でも対照群と比較し，軽度の細胞間隙の拡大を認めるものの，光学顕微鏡的にはその形態には明らかな差は認められなかった（図 1）。また，刺激後の細胞増殖能は対照群と比較して差を認めなかった。

2. アクチンフィラメントの観察

細胞骨格の一つである，アクチンを特異的に染色する FITC Labeled Phalloidin にて染色を行った結果，対照群の HGE 細胞では細胞内にアクチンフィラメントが網目状に観察され，細胞を縦横に走行するいわばストレスファイバーとして認められた。この線維は一

方の細胞膜と結合し，その端は相対する他方の細胞膜と結合していた（図 2-a）。

一方，IL-1 β 刺激群（図 2-b, c）では，アクチンのストレスファイバーは種々の程度に変化を認めた。その代表的な所見は図中のオープンアローで示すように細胞内のアクチンフィラメントが線維様構造を示さず，粒子状となるいわゆるドットストラクチャーとして認められた。また，図 2-b 中のシングルアローで示すように，多数のアクチンフィラメントが束状になり凝集したり，さらには図 2-c 中のダブルアローで示したように，細胞膜近傍でのアクチンフィラメントの集束が強く，その一方の端は細胞膜に結合しているものの，他方の端は相対する細胞膜と結合せず，遊離端となっていた。このようなアクチンの形態学的変化は IL-1 β のいずれの濃度による添加でも認められた。

3. 超微形態学的観察

HGE 細胞は細胞質内に多数のミトコンドリア，粗面小胞体，および遊離リボソームを認めた。細胞間には多数の細胞突起による嵌合を認め，細胞あるいは細胞突起が接する部分には電子密度の高いデスマゾームを認めた（図 3-a）。

IL-1 β 刺激群の上皮細胞は，細胞の厚さが対照群と比較して薄くなり，細胞辺縁にいくに従い，より薄い細胞質を呈していた。これらの細胞は隣接する細胞と重なりあっているもの（図 3-b）や，対照群と同様な細胞間隙を有するにも関わらず，細胞突起の減少や細胞突起による嵌合の減少を認めるもの（図 3-c），

図 1 位相差顕微鏡観察

- a. 対照群（×100）
敷石状配列を示す培養ヒト歯肉上皮細胞
- b. IL-1 β 2.5 ng/ml 24 時間刺激（×100）
対照群と同様な細胞増殖を示す。

図2 アクチンストレスファイバーの観察

a. 対照群 (×600)

網目状の走行を示すストレスファイバー

b. IL-1 β 2.5 ng/ml 24時間刺激 (×600)

c. IL-1 β 2.5 ng/ml 48時間刺激 (×600)

●; アクチンフィラメントのドットストラクチャー

→; アクチンフィラメントの凝集

⇒; アクチンフィラメントの集束

あるいは隣接する細胞はお互いに細胞辺縁が非常に薄くなり、わずかな細胞突起の接着により結合しているもの(図3-d)など、様々な形態変化を認めた。いずれの形態変化も細胞間是对照群と比較して、広く、細胞突起の数も減少し、いわば、細胞間が非常にルーズな拡大を示していた。

4. 免疫組織染色所見

抗 Vinculin 抗体を用いた免疫染色の結果、対照群の HGE 細胞は細胞膜の内側に沿って DAB 反応が強い陽性を呈していた(図4-a)。しかしながら、IL-1 β 刺激の HGE 細胞は、Vinculin の局在を示す DAB の陽性部分は核周辺の細胞質にビマン性に分布しており、対照群と比較し、明らかな Vinculin の局在の変化を認めた(図4-b)。

抗 FAK 抗体を用いた免疫染色の結果では、対照群の HGE 細胞は細胞膜の内側に沿って DAB 反応を認め、HGE 細胞における FAK の分布は細胞膜の裏打ち部分であることを示していた(図5-a)。

一方、IL-1 β 刺激群の HGE 細胞では FAK の分布は細胞質全体にビマン性に認め、特に、核近傍の細胞質に強い局在を認め、細胞膜部位では染色程度の減弱が見られた(図5-b)。これらの FAK の分布は IL-1 β 刺激群で認められた Vinculin と同様な染色所見であった。

5. Western Blotting 所見

HGE 細胞の Vinculin は約 116 kDa のバンドを示した。しかしながら、いずれの濃度の IL-1 β 刺激でも HGE 細胞は約 116 kDa のバンドを認めず、Vinculin の発現は認められなかった(図6左)。

また、上皮細胞における FAK の発現は対照群では約 120 kDa のバンドを認めたが、刺激群においては 2.5 ng/ml 刺激においてその発現が認められるものの、その発現は減弱していた。また高濃度 (25 ng/ml) 刺激においては、その発現が消失していた(図6右)。

考 察

疾病を誘発する刺激は、無生物による疾病因子から、生物による疾病因子までであるが、とりわけ口腔粘膜では生物学的因子の中でも細菌性因子が種々の粘膜疾患や歯周病の発生病因因子として知られている。炎症性歯周病変では、この刺激の初期侵入経路は上皮組織であり、外来性刺激により炎症が惹起し、上皮組織の破壊ばかりでなく、組織内部で発生した炎症性起炎物質により、上皮が有する機能的構造、生理的構造を破壊し、上皮下の結合組織へとさらに炎症が進展していく。なかでも炎症性サイトカインの一つである IL-1

図 3 電子顕微鏡観察

- a. 対照群 ($\times 14,000$): 細胞間には多数細胞突起を認める。
 b. IL-1 β 2.5 ng/ml 24 時間刺激 ($\times 50,000$): 隣接する細胞と重なりを認める。
 c. IL-1 β 2.5 ng/ml 48 時間刺激 ($\times 30,000$): 細胞間に細胞突起の減少を認める。
 d. IL-1 β 2.5 ng/ml 24 時間刺激 ($\times 30,000$): 細胞間がルーズな拡大を認める。
 rER; 粗面小胞体, Cp; 細胞突起, Mt; ミトコンドリア, To; トノフィラメント,
 Is; 細胞間隙

図 4 免疫染色 Vinculin

- a. 対照群 (×600): 細胞膜に沿って強い DAB 陽性反応を認める。
 b. IL-1 β 2.5 ng/ml 24 時間刺激 (×600): 核周辺の細胞質のビマン性の DAB 陽性反応を認める。

図 5 免疫染色 FAK

- a. 対照群 (×600): 細胞膜に沿って強い DAB 陽性反応を認める。
 b. IL-1 β 2.5 ng/ml 24 時間刺激 (×600): 核周辺の細胞質のビマン性の DAB 陽性反応を認める。

β は、局所における炎症性反応に重要な役割を果たしていることが知られている¹⁹⁾。加えて、IL-1 β は線維芽細胞、上皮細胞の増殖、さらには上皮細胞自身の IL-1 の産生を促し、IL-6, IL-8, GM-CSM などのサイトカイン産生を誘導する²⁰⁾。この IL-1 には α と β の二つのサブクラスが存在し、ともに細胞内で前駆蛋白として合成された後、 α は主に細胞内に局在し、 β は細胞外に分泌されていると考えられている²⁰⁾。歯周病においても歯周炎罹患歯肉組織中や歯肉溝滲出液中にも IL-1 の存在が確認されている²¹⁾。また歯肉溝滲出液中の IL-1 β 量は歯周組織の炎症あるいは破壊程度と相関し²¹⁾、また歯周治療により歯肉溝滲出液中の IL-1 β 量が減少する²²⁾ことも報告されている。

口腔粘膜は皮膚と並び外界と接する組織であり、疾病原因である種々の刺激を直接受けるために、角質層

の形成、粘膜上皮の透過性関門や上皮細胞突起の運動による組織液の流動あるいは、上皮内の好中球による異物の排除など、刺激に対する種々なる防御機構を有している^{5,6)}。そこで、本研究は種々の細胞より分泌される炎症性サイトカインの一つである IL-1 β が上皮細胞にどのような影響をもたらすかを検索したものである。

本研究結果では HGE 細胞に IL-1 β を添加した場合、光顕的観察では対照群の細胞と比較し光顕的には顕著な変化が認められなかった。しかしながら、電顕的観察では、対照群と比較し、細胞は扁平となり、細胞間隙の拡大を認めた。加えて、対照群と比較してより顕著な変化としては、細胞突起の減少と細胞突起による細胞嵌合の減少であった。上皮細胞における細胞突起は隣接する細胞との結合に関与するばかりでな

図 6 Western blotting

く、その細胞突起の運動により細胞間の組織液の流動性の制御や細胞の代謝物の排除、さらには外来刺激や組織内の炎症性刺激の防御機構としても作用している²³⁾。そのため本研究で認められた IL-1 β による細胞突起の変化は、細胞突起の有する機能を阻害していると考えられる。

一方、細胞突起の進展や運動は細胞内で調整され、細胞外部の刺激に対するシグナル伝達の経路であることも知られている²⁴⁾。つまり、細胞突起の進展や運動に関わる機構は、細胞内の細胞骨格が重要なものであることは容易に推測される。細胞骨格は細胞膜とある種の蛋白を介して連結し、これらの蛋白や細胞骨格が外来刺激に対してのシグナル伝達系を有している²⁵⁾。一般的に、アクチンフィラメントは細胞がある方向に移動する時、Filopodia の伸展や Lamellipodia が伸びだし、細胞外基質との接着が起り、細胞を固定する現象の主役を担っていると考えられている²⁶⁾。このような運動は主に細胞内のアクチンの組換えにより生じる。また、細胞が基質に接着した時には、細胞接着斑 (Focal adhesion) が形成されており、そこを基点としてアクチンストレスファイバーの構築が認められる。このように細胞の形態学的変化は細胞外のような刺激により誘導されることも知られている²⁷⁾。いわば、アクチンフィラメントは細胞の運動や形態を規制し、この規制は細胞自身の分化や機能と相関し、細胞外環境因子による変化を受けることが判明している²⁷⁾。これらのことから本研究で認められた、アクチンフィラメントのドットストラクチャーや凝集、さらには細胞膜近傍でのアクチンフィラメントの集束などの変化は、IL-1 β 刺激により惹起され、特に電顕的に観察された細胞突起の減少や細胞の扁平化の要因

になったものと考えられた。

一方細胞内のアクチンフィラメントは細胞の形態や機能を規制しているために、細胞内に遊離したものでなく、フィラメントの一端は細胞膜と結合し、その結合部は細胞膜裏打ち蛋白と称されるテーリン、Vinculin, パキシリン, FAK などの多くの蛋白と結合している^{28,29)}。また、この部の細胞外領域においては細胞接着の主要な因子の一つであるインテグリンがフィブロネクチンやラミニンといった細胞外マトリックスと結合を示している。このようにアクチンフィラメントは細胞内や細胞外の種々なる蛋白と結合し、細胞接着斑同士あるいは細胞外基質を互いに結ぶようにストレスファイバーを形成する。

そこで本研究結果で認められた細胞の形態変化、細胞突起の減少、および細胞間隙の拡大はアクチンフィラメントの変化によるものか、あるいは細胞骨格のシグナル伝達系やリン酸化に強い関与を示す Vinculin および FAK の細胞膜裏打ち蛋白の変化が関与しているかについて検索を行った。

その結果、抗 Vinculin 抗体および抗 FAK 抗体を用いた免疫染色の結果において、対照群はいずれの抗体も細胞全体に観察されるとともに、特に、細胞膜に沿って Vinculin および FAK 蛋白の強い局在を認めた。また、Western blotting の結果でも Vinculin は 116 kDa の蛋白、および FAK は 120 kDa の蛋白として認められた。しかしながら、IL-1 β 刺激により、これらの蛋白は免疫染色ではいずれの蛋白も細胞の核周辺に分布し、細胞膜にはその分布が消失していた。加えて Western blotting による観察でも IL-1 β 刺激により 116 kDa の Vinculin および 120 kDa の FAK は強く減弱するかあるいは消失していた。

以上のことは、アクチンフィラメントの形態学的変化やこのアクチンフィラメントと細胞膜を結合する蛋白である Vinculin や FAK の消失は細胞の形態変化をもたらした結果、細胞突起の減少や細胞間隙の拡大を惹起させたことを示唆している。さらに、Vinculin や FAK の機能が細胞骨格との結合因子としての役割だけでなく、細胞外の刺激がこれらの蛋白群を介して伝達されるということを考えあわせると³⁰⁾、これらの情報伝達の不全が引き起こされたものと考えられた。つまり、HGE 細胞は、IL-1 β 刺激により細胞膜裏打ち蛋白や細胞骨格の変性、消失を惹起し、その結果細胞突起の解離や細胞間隙の拡大による上皮の構造異常が起き、正常の生理的上皮機構から逸脱する可能性が示唆された。今後の課題として、IL-1 の中和抗体を用いた系や、遺伝子レベルでの系、また単層培養ではなく 3 次元培養での系など、詳細に検索する必要がある。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の御指導、御校閲を賜りました昭和大学歯周治療学教室、長谷川紘司教授に深く感謝いたします。また本研究の遂行に際し、終始懇切なる御指導と御校閲を賜りました本学口腔病理学教室、吉木周作名誉教授、立川哲彦教授に厚く御礼申し上げます。最後に本研究に御理解と御支援をいただきました、本学歯周治療学教室、宮下元教授はじめ教室員各位ならびに本学口腔病理学教室員各位に心から御礼申し上げます。

文 献

- Page, R.C. and Schroder, H.E. : Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. : A summary of current work. *Lab Invest.*, 34 : 235-249, 1976.
- Genco, R.J. : Host responses in periodontal disease : current concepts., *J. Periodontol.*, 63 : 338-335, 1990.
- Listgarten, M.A., : Pathogenesis of periodontitis, *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 418-425, 1986.
- Wilson, M. Reddi, K. and Henderson, B. : Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J. Periodont. Res.*, 31 : 393-407, 1996.
- Shimono, M. and Clementi, F. : Intercellular junctions of oral epithelium. Studies with freeze-fracture and tracing methods of normal rat keratinized oral epithelium., *J. Ultrastruct. Res.*, 56 : 121-136, 1976.
- Shimono, M. and Clementi, F. : Intercellular junctions of oral epithelium. Ultrastructural changes in rat buccal epithelium induced by trypsin digestion. *J. Ultrastruct. Res.*, 59 : 101-121, 1977.
- Jensen, R.L. and Folke, L.E. : The passage of exogenous tritiated thymidine into gingival tissue., *J. Periodontol.*, 45 : 786-791, 1974.
- McDougall, W.A. : Pathways of penetration and effects of horseradish peroxidase in rat molar gingiva. *Archs. Oral Biol.*, 15 : 621-633, 1970.
- McDougall, W.A. : Penetration pathways of a topically applied foreign protein into rat gingiva. *J. Periodont. Res.*, 6 : 89-99, 1971.
- Ishikawa, H., Hatano, S. and Sato, H. : Molecules and Organization, In cell. University of Tokyo Press., 417-444, 1979.
- Yamada, K.M. and Miyamoto, S. : Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7 : 691-689, 1995.
- Kristensen, M., Deleuran, B., Eedy, D.J., Feldmann, M., Breathnach, S.M. and Breathnach, F. M. : Distribution of interleukin 1 receptor antagonist protein (IRAP), interleukin 1 receptor, and interleukin 1 α in normal and psoriatic skin. Decreased expression of IRAP in psoriatic lesional epidermis. *Br. J. Dermatol.*, 127 : 305-311, 1992.
- Bigler, C.F., Norris, D.A., Weston, W.L. and Arend, W.P. : Interleukin-1 receptor antagonist production by human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 98 : 38-44, 1992.
- Levine, S.J., Benfield, T. and Shelhamer, J.H. : Corticosteroids induce intracellular interleukin-1 receptor antagonist type expression by a human airway epithelial cell line. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 15 : 245-251, 1996.
- Gowen, M. and Mundy, G.R. : Actions of recombinant interleukin 1, interleukin 2, and interferon γ on bone resorption in vitro. *J. Immunol.*, 136 : 2487-2482, 1986.
- 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.
- Stashenko, P., Dewhirst, F.E., Rooney, M.L., Desjardins, L.A. and Heely, J.D. : Interleukin-1 β is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *J. Bone Min. Res.*, 2 : 559-565, 1987.
- Micahel, D.H., Kelly, S.F., Maurizio, C., Luciano, Z. and Lloyd, A.C. : Adhesion of human dermal reticular fibroblasts on complement fragments of fibronectin : Aging in vivo or in vitro. *Exp. Cell*

- Res., 179 : 115-136, 1989.
- 19) Takada, H. : Production of cytokines by human gingival fibroblasts. in : Periodontal disease : pathogens & host immune responses : Quintessence Pub., TOKYO, 265-276, 1991.
- 20) Charles A.D. : The interleukin-1 family : 10 years of discovery., The FASEB Journal, 8 : 1314-1325, 1994.
- 21) Hou, L-T., Liu C-M. and Rossomando, E.F. : Crevicular interleukin-1 β in moderate and severe periodontitis patients and the effect of phase I periodontal treatment. J. Clin. Periodontal., 22 : 162-167, 1995.
- 22) Masada, M.P., Persson, R., Kenney, J.S., Lee, S. W., Page, R.C. and Allison, A.C. : Measurement of interleukin-1 α and -1 β in gingival crevicular fluid : implications for pathogenesis of periodontal disease. J Periodont. Res., 25 : 156-163, 1990.
- 23) Pamela, C. : Adhesive cell junctions of keratinocyte, Irene. M., Leigh, E., Birgitte, L and Fiona, M.W. : The keratinocyte handbook, Cambridge University Press, USA, 1994, 165-180.
- 24) Anne E.W. : The role of gap junctions in amphibian development. J. Embryol. Exp. Morph., 89 : 365-380, 1985.
- 25) Tapon, N. and Hall, A. : Rho, Rac and Cdc 42 GTPases regulate the organization of actin skeleton., Curr. Opin. Cell. Biol., 9 : 86-92, 1997.
- 26) 渡辺直樹, 成宮 周 : Rho ファミリー蛋白質, 宇井理生, 細胞内情報伝達のしくみ, 羊土社, 東京, 103-118.
- 27) Andrew, P.G. and Keith, B. : Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate., Nature, 381 : 531-535, 1996.
- 28) Yamada, K.M. and Geiger, B. : Molecular interaction in cell adhesion complex., Curr. Opin. Cell. Biol., 9 : 76-85, 1997.
- 29) Yamada, K.M. and Miyamoto, S. : Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. Curr. Opin. Cell. Biol., 7 : 681-689, 1995.
- 30) 宮坂昌之 : 細胞接着とその制御, 岡山博人, 細胞内シグナル伝達系路, メジカルレビュー社, 東京, 1996, 130-139.

連絡先 :

昭和大学歯学部歯周治療学教室

〒145-8515 東京都大田区北千束 2-1-1