

## 論文の内容の要旨

氏名：山 中 一 浩

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：硫化水素が ROS17/2.8 細胞の細胞外マトリックスタンパク分解酵素とその内因性阻害剤の発現に及ぼす影響

歯周炎における歯槽骨吸収は、嫌気性の歯周病原菌が産生する病原性因子や宿主細胞が産生する炎症性因子が、歯槽骨代謝の骨形成と骨吸収の均衡を破綻させて吸収系を優位にすることによって起こる。骨芽細胞は高いアルカリフォスファターゼ (ALPase) 活性を有し、コラーゲン性および非コラーゲン性の細胞外マトリックス (ECM) タンパクを産生して、骨形成の中心的な役割を担っている。また、骨芽細胞は、破骨細胞分化調節因子を産生して単球/マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化を調節するとともに、matrix metalloproteinases (MMPs) および plasminogen activators (PAs) などのタンパク分解酵素とそれらの内因性阻害剤を産生し、破骨細胞が骨表層に吸着するプロセスで重要となる osteoid 層の ECM タンパク分解の調節にも関与する。すなわち、骨芽細胞は、骨形成だけでなく骨吸収においても重要な役割を担っている。一方、硫化水素とメチルメルカプタンは、呼吸中の揮発性硫化物 (volatile sulfur compound; VSC) の約 90%を占める口臭の主要な原因物質である。VSC は、歯周病の重症度に伴ってその濃度が増加することが知られており、歯周組織の病態変化にも密接に関わっている。VSC が骨代謝に及ぼす影響としては、硫化水素が破骨細胞分化を促進することや、石灰化物形成能を低下させることが知られている。つまり、歯周ポケット内プラーク中の嫌気性菌が産生する VSC は、歯槽骨代謝の均衡を骨吸収優位にすると考えられるが、VSC が骨芽細胞による osteoid 層の ECM タンパク分解調節機能に及ぼす影響については明らかにされていない。

骨芽細胞が産生する MMPs は中性の pH 領域で活性化され、osteoid 層のコラーゲン、プロテオグリカンおよび非コラーゲン性タンパクなどの ECM タンパクを分解する。MMPs は、その基質特異性に基づいてコラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロムライシン、マトリライシン、膜型 MMP およびその他の MMP に分類される。一方、MMPs の内因性阻害剤である tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) は、哺乳類においては 4 種類の TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 および TIMP-4) がクローン化されている。また、PAs には tissue PA (tPA) と urokinase PA (uPA) の 2 種類が存在し、それらの酵素活性は plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 によって阻害される。tPA と uPA は、不活性型のプラスミノゲンを活性型のプラスミンに変換する。プラスミンは、セリンプロテアーゼ様の作用を示し、osteoid 層の非コラーゲン性タンパクを分解する。さらに、プラスミンは不活性型 MMPs を活性化させることで、間接的に ECM タンパク分解にも関与する。

本研究では、歯周ポケットのプラーク中の嫌気性菌が産生する硫化水素が、歯肉上皮を透過して歯槽骨の骨芽細胞の機能に影響を及ぼすことを想定し、ROS17/2.8 を骨芽細胞のモデルとして、NaHS を硫化水素のドナーとして用いて、NaHS が ROS17/2.8 の MMPs, PAs, TIMPs および PAI-1 発現に及ぼす影響を検討した。なお、骨芽細胞においてはマトリライシンに関する報告はなく、また、ROS17/2.8 には MMP-1 と TIMP-4 の遺伝子発現が認められないことが明らかにされていることから、MMPs では、コラゲナーゼである MMP-13, ゼラチナーゼである MMP-2 と MMP-9, ストロムライシンである MMP-3, および膜型 MMP である MMP-14 の発現を、また、TIMPs では、TIMP-1, TIMP-2 および TIMP-3 の発現を調べた。その結果、ROS17/2.8 の MMP-2, MMP-3 および MMP-9 発現は NaHS 刺激で有意に増加した一方で、TIMP-3 発現は有意に低下した。また、MMP-13, MMP-14, TIMP-1 および TIMP-2 発現には NaHS 刺激の影響が認められなかった。I 型コラーゲンは、コラゲナーゼによって 3:1 の長さの断片に分解されゼラチン化する。ゼラチナーゼは、ゼラチン化したコラーゲン断片を分解する。また、ストロムライシンは、プロテオグリカンのコアタンパクおよび非コラーゲン性タンパクを分解する。一方、TIMP-3 は ECM タンパクに結合して、本研究で調べたサブタイプを含む複数の MMPs 活性を阻害する。すなわち、本結果から、硫化水素の刺激を受けた歯槽骨では、骨芽細胞による TIMP-3 産生

低下に伴い相対的に MMPs の活性が高くなるとともに、ゼラチナーゼである MMP-2 と MMP-9, ならびにストロムライシンである MMP-3 の産生増加によって ECM タンパク代謝の分解系が優位になる可能性が示唆された。また、本研究では、ROS17/2.8 における tPA, uPA および PAI-1 の発現は、NaHS 刺激で変化しなかったため、硫化水素は骨芽細胞によるプラスミノゲン/プラスミン経路には影響を及ぼさないと考えられた。

硫化水素が骨芽細胞に及ぼす影響としては、これまでに、硫化水素が ALPase 活性, 骨シアロタンパクおよびオステオポンチン産生低下を介して石灰化物形成能を低下させることや、破骨細胞分化促進因子である receptor activation of nuclear factor- $\kappa$ B ligand 発現増加を介して破骨細胞の分化誘導を促進させることが明らかにされている。これらの知見と本研究結果から、硫化水素は、骨芽細胞の骨形成に関連する機能を抑制するだけでなく骨吸収に関連する機能を促進し、骨代謝の均衡を吸収系優位にすると考えられた。

以上の結果から、歯周ポケット内プラーク中の嫌気性菌が産生する硫化水素は、歯肉上皮を透過して結合組織内に入り、歯槽骨に存在する骨芽細胞によるゼラチナーゼ (MMP-2, MMP-9) とストロムライシン (MMP-3) の産生を増加させる一方でそれらに対する内因性阻害剤 (TIMP-3) の産生を抑制して osteoid 層の ECM タンパク分解を促し、破骨細胞の骨基質への付着を容易にする可能性、すなわち歯周炎における歯槽骨破壊に関与することが示唆された。