

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

日本大学歯学部衛生学講座

助手 山中 一 浩

(指導：前野 正夫 教授，川戸 貴行 教授，中井 久美子 助教)

緒 言

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^{1,2)}。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³⁻⁵⁾。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^{6,7)}、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^{8,9)} 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^{10,11)}。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。

硫化水素とメチルメルカプタンは、呼気中の揮発性硫化物 (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^{12,13)}。硫化水素とメチルメルカプタンは、歯肉線維芽細胞によるコラーゲン合成を抑制するとともにコラゲナーゼ産生を増加させて、コラーゲン代謝の分解系を優位にする^{14,15)}。また VSC は、線維芽細胞および単球による炎症性サイトカインやプロスタグランジン E₂ などの主要な炎症性因子の産生を誘導する^{16,17)}。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^{18,19)}、骨芽細胞における ALPase 活性と非コラーゲン性の ECM タンパク産生抑制を介して、石灰化物形成能を低下させることが報告されている²⁰⁾。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^{21,22)}。一方、PAs は、不活性型のプラスミノーゲンを活性型のプラスミンに変換する。プラスミンは、基質特異性が広いセリンプロテアーゼであり、osteoid 層の多くの非コラーゲン性タンパクを分解する^{23,24)}。MMPs および PAs の活性は、それらの内因性阻害剤である tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) および plasminogen activator inhibitor (PAI) によって、それぞれ調節される^{8,9)}。

本研究では、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、硫化水素が骨芽細胞による ECM タンパク分解調節機能に及ぼす影響を *in vitro* で検討した。具体的には、骨芽細胞のモデルとして ROS17/2.8 を、硫化水素のドナーとして NaHS を用いて、ROS17/2.8 を NaHS で刺激し、ROS17/2.8 が産生する MMPs, TIMPs, PAs および PAI-1 の遺伝子発現に及ぼす影響を mRNA レベルで調べた。また、遺伝子発現に変化が認められた MMP-2, MMP-3, MMP-9 および TIMP-3 発現については、タンパクレベルでも NaHS 刺激の影響を調べ、硫化水素が骨芽細胞による osteoid 層の ECM タンパク分解調節機能に及ぼす影響を考察した。

材料および方法

1. 細胞培養

本研究には、骨芽細胞としてラット骨肉腫由来の株化骨芽細胞 ROS17/2.8 を用いた。ROS17/2.8 の培養には、10% ウシ胎児血清 (FBS; HyClone Laboratories) と 1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を含む α -minimal essential medium (α -MEM) を培養液として用いて、37°C、5% 炭酸ガス存在下で行った。ROS17/2.8 を刺激する際に用いる硫化水素のドナーには NaHS を用いた^{20,25)}。ROS17/2.8 を 6 穴プレートに 5×10^3 個 / cm^2 の密度で播種し、Kimura ら²⁰⁾ の報告を参考にして 0 (コントロール)、 10^{-4} M および 10^{-3} M の NaHS を加え、5 日間培養した。

2. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

培養後の細胞から NucleoSpin RNA (Takara Bio) を用いて全 RNA を抽出した。RNA の濃度は、NanoDrop 1000 (ND-1000; Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。Prime Script RT reagent kit (Takara Bio) で mRNA から complementary DNA (cDNA) を作成し、SYBR Green I を用いたインターカレーター法で real-time PCR を行った。第 1 表に使用した上・下流のプライマー配列を示す。遺伝子の増幅は Smart Cycler (Cepheid) を用い、SYBR Premix *Ex Taq* (Takara Bio) を cDNA に加え 95°C、10 秒間加熱した後、95°C で 5 秒間の denaturation、60°C で 20 秒間の annealing / extension を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。結果の解析は Smart Cycler Software version 2 (Cepheid) を用いて行った。あらかじめ作成した検量線をもとに遺伝子の増幅量を求め、グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) の増幅量で補正した値を mRNA 発現量とした。

3. SDS-PAGE および Western blotting

培養後の細胞は、0.05% Triton X-100、10 mM β -mercaptoethanol および protease inhibitor (Sigma Aldrich) および 25 mM Tri-HCl (pH 7.4) を含む溶液に溶解した。細胞溶解液を超音波処理した後、12,000 rpm、4°C で 5 分間遠心して上清を回収

した。細胞内タンパク 20 μg 含む培養上清を 4-20% ポリアクリルアミドゲルを用いて Laemmli ²⁶⁾ の方法に準じて SDS-PAGE を行った。ゲル内のタンパクを Trans-blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories) を用いて polyvinylidene difluoride 膜 (Merck Millipore) に転写した後、BSA (和光純薬) で非特異的な抗体反応をブロッキングした。Western Blotting 法は、1 次抗体としてウサギ免疫の抗 MMP-2 抗体, (Santa Cruz Biotechnology), ヤギ免疫の抗 MMP-3 抗体, 抗 MMP-9 抗体, 抗 TIMP-3 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), または、マウス免疫の抗 β -actin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いて、2 次抗体としてビオチン標識されたロバ免疫の抗ヤギ抗体 (Merck Millipore), ヤギ免疫の抗ウサギ抗体 (Zymed), ヤギ免疫の抗マウス抗体 (Abcam) を用いて行った。さらに、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液 (Zymed) を加えた後、ECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare Bio-Sciences) で化学発光反応を行って X 線フィルム (富士フィルム) に感光させた。

4. 統計学的分析

すべての実験は 3 回繰り返し、遺伝子発現の結果は平均値と標準偏差で表した。統計処理は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Tukey の多重比較検定を用いて行い、危険率 5%未満を統計的な有意差とした。

結 果

1. MMPs および TIMPs の遺伝子発現に及ぼす NaHS の影響

ROS17/2.8 を 10^{-4} M および 10^{-3} M の NaHS 刺激または非刺激 (コントロール) の培地で培養し、培養 5 日目の MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2 および TIMP-3 の遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて調べた (第 1 図および第 2 図)。

MMP-2, MMP-3 および MMP-9 の発現は、コントロールに比べて 10^{-3} M の NaHS 刺激で、それぞれ 1.78, 1.29 および 1.80 倍有意に増加したが、MMP-13 と MMP-14 の発現には NaHS 刺激の影響が認められなかった。一方、TIMP-3 の発現は、コントロールに比べて 10^{-3} M と 10^{-4} M の NaHS 刺激で、ともに 0.79 倍有意に減少したが、TIMP-1 と TIMP-2 の発現には NaHS 刺激による影響が認められなかった。

2. PAs および PAI-1 の遺伝子発現に及ぼす NaHS の影響

ROS17/2.8 を 10^{-4} M および 10^{-3} M の NaHS 刺激または非刺激 (コントロール) の培地で培養し、培養 5 日目の tissue PA (tPA), urokinase PA (uPA) および PAI-1 の遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて調べた (第 3 図)。

tPA, uPA および PAI-1 の発現は、コントロールと 10^{-3} M あるいは 10^{-4} M の NaHS 刺激の間で有意差が認められなかった。

3. MMP-2, MMP-3, MMP-9 および TIMP-3 のタンパク発現に及ぼす NaHS の影響

ROS17/2.8 を 10^{-3} M の NaHS 刺激または非刺激 (コントロール) の培地で培養し、培養 5 日目の MMP-2, MMP-3, MMP-9 および TIMP-3 のタンパク発現を Western blotting 法で調べた (第 4 図)。

MMP-2, MMP-3 および MMP-9 の発現は、 10^{-3} M の NaHS 刺激で増加した。一方、TIMP-3 の発現は、 10^{-3} M の NaHS 刺激で減少した。

考 察

本研究では、骨芽細胞のモデルとして株化細胞 ROS17/2.8 を、硫化水素のドナーとして NaHS を用いて、硫化水素が骨芽細胞の ECM 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を検討した。

Nakai ら²⁷⁾ は、ROS17/2.8 の MMPs, TIMPs, PAs および PAI-1 発現が培養 5 日目にピークを迎え、7 日目には減少したと報告している。また、Kimura ら²⁰⁾ は、ROS17/2.8 の骨形成機能に及ぼす NaHS の影響は培養 3 日目から認められたと報告している。そこで、これらの報告をもとにして、遺伝子およびタンパク発現の分析は培養 5 日目に限定して行った。

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^{28,29)}。また、MMPs の内因性阻害剤である 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³⁰⁻³²⁾。一方、骨芽細胞においてマトリライシンに関する報告はなく、ROS17/2.8 には MMP-1 と TIMP-4 の遺伝子発現が認められなかったと報告されている²⁷⁾。さらに、Kimura ら²⁰⁾ は、 10^{-3} M および 10^{-4} M の NaHS の刺激で ROS17/2.8 の ALPase 活性ならびに ECM タンパク発現が低下したと報告している。そこで、これらの報告をもとに、本研究では ROS17/2.8 を 10^{-3} M および 10^{-4} M の NaHS で刺激して、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, ならびに内因性阻害剤の TIMP-1, TIMP-2 および TIMP-3 の発現を調べた。その結果、 10^{-3} M あるいは 10^{-4} M の NaHS 刺激で、MMP-2, MMP-3 および MMP-9 発現が上昇し、TIMP-3 発現は低下した。

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^{8,22)}。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^{22,33)}。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^{22,33)}。これらの

知見と本研究結果から、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。

PAs には tPA と uPA の 2 種類が存在し、それらの酵素活性は PAI-1 によって阻害される⁹⁾。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、ECM 中の非コラーゲン性タンパクを分解する²³⁾。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³⁴⁾。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。これらの結果から、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。

Katono ら³⁵⁾ は、本研究と同様に歯周病の病態を想定し、グラム陰性桿菌の菌体内毒素である lipopolysaccharide (LPS) で骨芽細胞を刺激して MMPs, TIMPs, PAs および PAI-1 の発現を調べ、複数の MMPs と tPA の発現が LPS 刺激で増加したと報告している。Katono ら³⁵⁾ の報告と本研究結果から、LPS と硫化水素はともに細菌由来であるが、骨芽細胞の tPA 発現に及ぼす影響は異なることが明らかとなった。さらに、Katono ら³⁵⁾ は、環境面における歯周病の増悪因子である喫煙を想定して、骨芽細胞をニコチンと LPS で同時に刺激すると、それぞれの単独刺激に比べて MMPs と tPA の発現が顕著に増加したと報告している。歯周病は多因性の疾患であり、歯周組織は歯周病原菌が産生する病原性因子だけでなく、タバクに含まれるニコチンや宿主細胞が産生する炎症性因子によっても障害される。また、VSC については、歯周病の重症度に伴い硫化水素に対するメチルメルカプタンの産生割合が上昇することから^{12,13)}、今後は、VSC としては硫化水素だけでなくメチルカプタンについても着目し、LPS やニコチンと VSC の同時刺激が、骨芽細胞の ECM タンパク分解調節機能に及ぼす影響について検討する必要がある。

硫化水素が骨芽細胞に及ぼす影響を検討したこれまでの報告では、硫化水素が骨芽細胞の 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抑制することや²⁰⁾、破骨細胞分化促進因子である receptor activation of nuclear factor- κ 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¹⁹⁾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。

以上のことから、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。

結 論

歯周ポケット内プラーク中の細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、また、NaHS を硫化水素のドナーとして用いて、NaHS が ROS17/2.8 の ECM タンパク分解酵素 (MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, MMP-14, tPA, uPA) とその内因性阻害剤 (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, PAI-1) の発現に及ぼす NaHS の影響を調べ、以下の結果および結論を得た。

1. MMP-2, MMP-3 および MMP-9 発現は NaHS 刺激で有意に増加したが、MMP-13 および MMP-14 発現は変化しなかった。
2. TIMP-3 発現は NaHS 刺激で有意に低下したが、TIMP-1 および TIMP-2 発現は変化しなかった。
3. tPA, uPA および PAI-1 発現は、NaHS 刺激で変化しなかった。

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、破骨細胞の骨表面への吸着に重要となる 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して歯周炎における歯槽骨破壊に関与する可能性が示唆された。

謝 辞

本研究遂行にあたり，格別たるご指導ご鞭撻を賜りました日本大学歯学部衛生学講座の前野正夫教授および川戸貴行教授に謹んで心より感謝申し上げます。

また，本研究を通じ多大なるご協力を賜りました同講座の中井久美子助教および田中秀樹助教に深く感謝致します。

引用文献

1. Lerner UH (2006) Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res* 85, 596-607.
2. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S (2015) Mechanisms of bone resorption in periodontitis. *J Immunol Res* 2015, 615486. doi: 10.1155/2015/615486.
3. Anderson HC (1989) Mechanism of mineral formation in bone. *Lab Invest* 60, 320-330.
4. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG (1992) Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop Relat Res* 281, 275-294.
5. Mundlos S, Olsen BR (1997) Heritable diseases of the skeleton. Part II: Molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis. *FASEB J* 11, 227-233.
6. Suda T, Takahashi N, Martin TJ (1992) Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 13, 66-80.
7. Maeno M, Tanaka H, Zhang F, Kitami S, Nakai K, Kawato T (2013) Direct and indirect effects of IL-17A on RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Hard Tissue Biol* 22, 287-92.
8. Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92, 827-39.
9. Nagamine Y, Medcalf RL, Munoz-Canoves P (2005) Transcriptional and posttranscriptional regulation of the plasminogen activator system. *Thromb Haemost* 93, 661-675.
10. Holliday LS, Welgus HG, Fliszar CJ, Veith GM, Jeffrey JJ, Gluck SL (1997) Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. *J Biol Chem* 272, 22053-22058.
11. Zhao W, Byrne MH, Boyce BF, Krane SM (1999) Bone resorption induced by

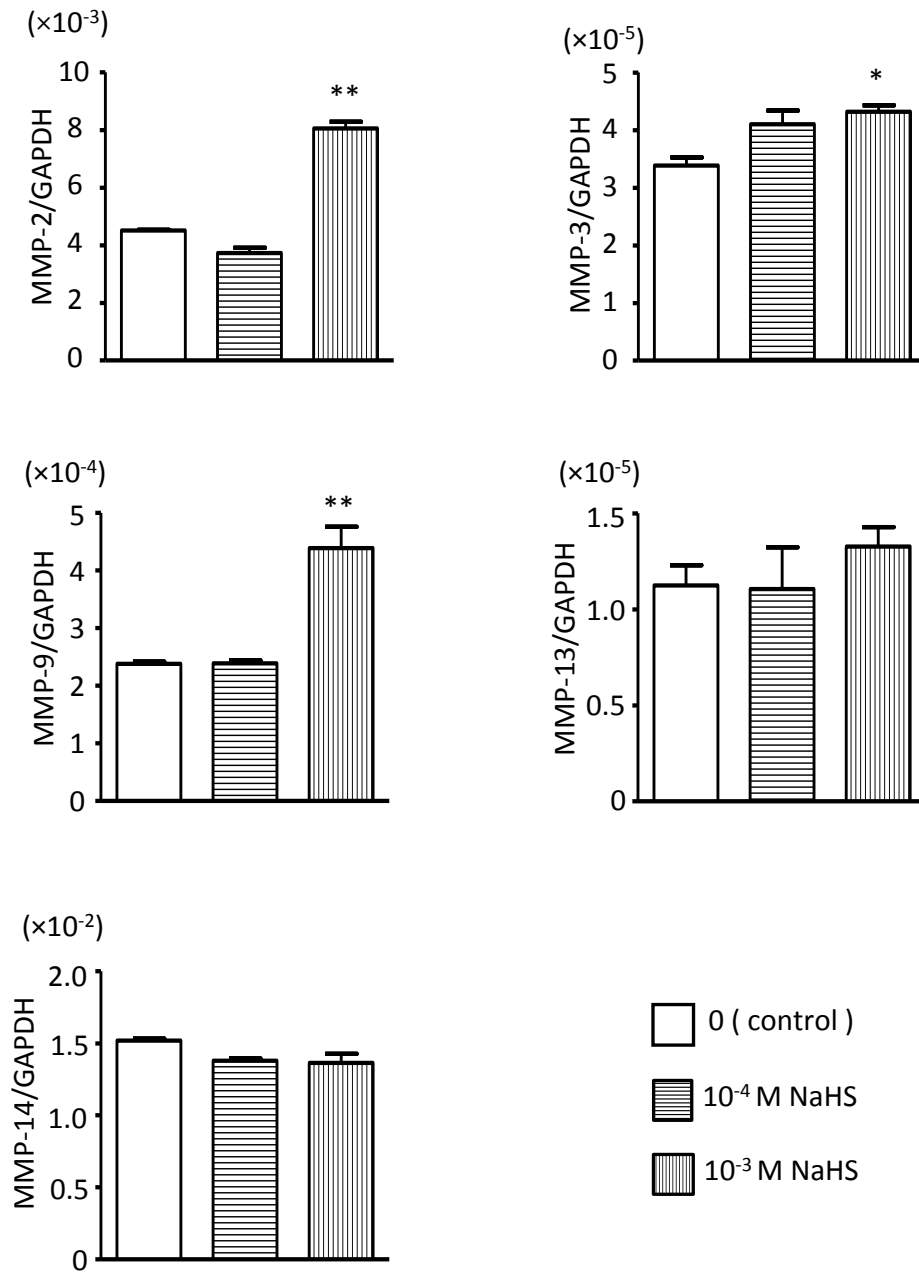
- parathyroid hormone is strikingly diminished in collagenase-resistant mutant mice. *J Clin Invest* 103, 517-24.
12. Rizzo AA (1967) The possible role of hydrogen sulfide in human periodontal disease. I. Hydrogen sulfide production in periodontal pockets. *Periodontics* 5, 233-236.
 13. Yaegaki K, Sanada K (1992) Volatile sulfur compounds in mouth air from clinically healthy subjects and patients with periodontal disease. *J Periodontal Res* 27, 233-238.
 14. Johnson PW, Yaegaki K, Tonzetich J (1992) Effect of volatile thiol compounds on protein metabolism by human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 27, 553-561.
 15. Johnson P, Yaegaki K, Tonzetich J (1996) Effect of methyl mercaptan on synthesis and degradation of collagen. *J Periodontal Res* 31, 323-329.
 16. Ratkay LG, Waterfield JD, Tonzetich J (1995) Stimulation of enzyme and cytokine production by methyl mercaptan in human gingival fibroblast and monocyte cell cultures. *Arch Oral Biol* 40, 337-344.
 17. Zhi L, Ang AD, Zhang H, Moore PK and Bhatia M (2007) Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via the ERK-NF- κ B pathway. *J Leukoc Biol* 81, 1322-1332.
 18. Ii H, Imai T, Yaegaki K, Irie K, Ekuni D and Morita M (2010) Oral malodorous compound induces osteoclast differentiation without receptor activator of nuclear factor κ B ligand. *J Periodontol* 81, 1691-1697.
 19. Irie K, Ekuni D, Yamamoto T, Morita M, Yaegaki K, Ii H, Imai T (2009) A single application of hydrogen sulphide induces a transient osteoclast differentiation with RANKL expression in the rat model. *Arch Oral Biol* 54, 723-729.
 20. Kimura A, Kawato T, Katono-Tani T, Nakai K, Iwata S, Zhao N, Maeno M (2012) Hydrogen sulfide suppresses mineralized nodule formation by osteoblastic ROS17/2.8 Cells. *J Hard Tissue Biol* 21, 219-224.
 21. Malesud CJ (2006) Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 11, 1696-1701.

22. Paiva KB, Granjeiro JM (2014) Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions. *Arch Biochem Biophys* 561, 74-87.
23. Skrzydlewska E, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S (2005) Proteolytic–antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 11, 1251-1266.
24. Tanigawa S, Kawato T, Aida Y, Suzuki N, Ochiai K, Matsumura H, Maeno M (2011) Interleukin-17F down-regulates the plasminogen/plasmin pathway in chondrocytes. *J Hard Tissue Biol* 20, 195-202.
25. Xu ZS, Wang XY, Xiao DM, Hu LF, Lu M, Wu ZY, Bian JS (2011) Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H₂O₂-induced oxidative damage-implications for the treatment of osteoporosis. *Free Radic Biol Med* 50, 1314-1323.
26. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
27. Nakai K, Kawato T, Morita T, Iinuma T, Kamio N, Zhao N, Maeno M (2013) Angiotensin II induces the production of MMP-3 and MMP-13 through the MAPK signaling pathways via the AT₁ receptor in osteoblasts. *Biochimie* 95, 922-933.
28. John A, Tuszynski G (2001) The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol* 7, 14-23.
29. Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-174.
30. Olson MW, Gervasi DC, Mobashery S, Fridman R (1997) Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem* 272, 29975-2983.
31. Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner Jr. JF (2000) TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem* 275, 31226-3132.
32. Huang W, Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M (2002) Tissue inhibitor of

- metalloproteinases-4 (TIMP-4) gene expression is increased in human osteoarthritic femoral head cartilage. *J Cell Biochem* 85, 295-303.
33. Nagase H, Visse R, Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69, 562-573.
 34. Pins GD, Collins-Pavao ME, Van De Water L, Yarmush ML, Morgan JR (2000) Plasmin triggers rapid contraction and degradation of fibroblast-populated collagen lattices. *J Invest Dermatol* 114, 647-653.
 35. Katono T, Kawato T, Tanabe N, Tanaka H, Suzuki N, Kitami S, Morita T, Motohashi M, Maeno M (2009) Effects of nicotine and lipopolysaccharide on the expression of matrix metalloproteinases, plasminogen activators, and their inhibitors in human osteoblasts. *Arch Oral Biol* 54, 146-155.

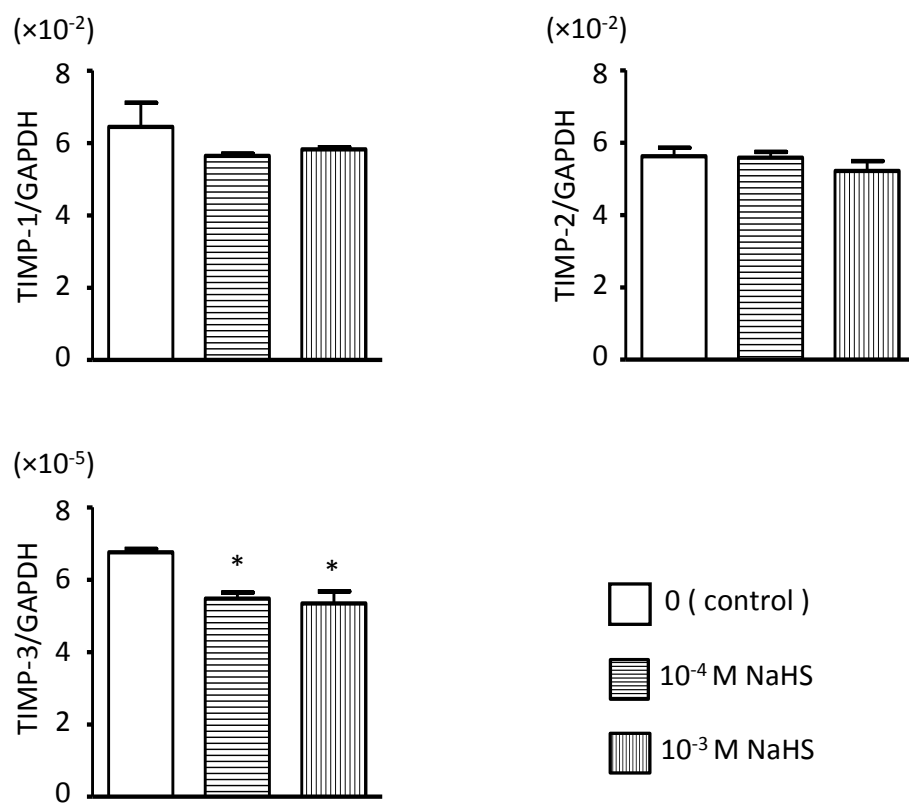
第 1 表 プライマー配列

Target	Forward Primer Reverse Primer	Genbank acc No.
MMP-2	5'-CCAAGAACTTCCGACTATCCAATGA-3' 5'-CAGTGTAGGCGTGGGTCCAGTA-3'	NM_031054.2
MMP-3	5'-TGATGGGCCTGGAATGGTC-3' 5'-TTCATGAGCAGCAACCAGGAATA-3'	NM_133523.3
MMP-9	5'-AGCCGGAACGTATCTGGA-3' 5'-TGGAACTCACACGCCAGAAG-3'	NM_031055.1
MMP-13	5'-CCCTGGAATTGGCGACAAAG-3' 5'-GCATGACTCTCACAATGCGATTAC-3'	NM_133530.1
MMP-14	5'-GAGAACTTCGTGTTGCCTGATGAC-3' 5'-TTCTGGGCTTATCTGGGACAGAG-3'	BC072509.1
TIMP-1	5'-GGGCTACCAGAGCGATCACTT-3' 5'-AAGGTATTGCCAGGTGCACAA-3'	AF411319.1
TIMP-2	5'-ACATCTCCTCCCCGGATGA-3' 5'-GGTGCCCATTGATGCTCTTC-3'	BC084714.1
TIMP-3	5'-GGGCTGTGCAACTTTGTGGA-3' 5'-ATTCTTGGAGGTCACAAAGCAAGG-3'	NM_012886.2
tPA	5'-GTCAGATTCCAGTCAGTGTG-3' 5'-GTTGCTCGTGATGGTTTTG-3'	NM_013151.2
uPA	5'-TCGGACAAGAGAGTGCCA-3' 5'-TCACAATCCCGCTCAGAG-3'	NM_013085.3
PAI-1	5'-GACAATGGAAGAGCAACATG-3' 5'-ACCTCGATCTTGACCTTTTG-3'	NM_012620.1
GAPDH	5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3' 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'	NG_028301.2

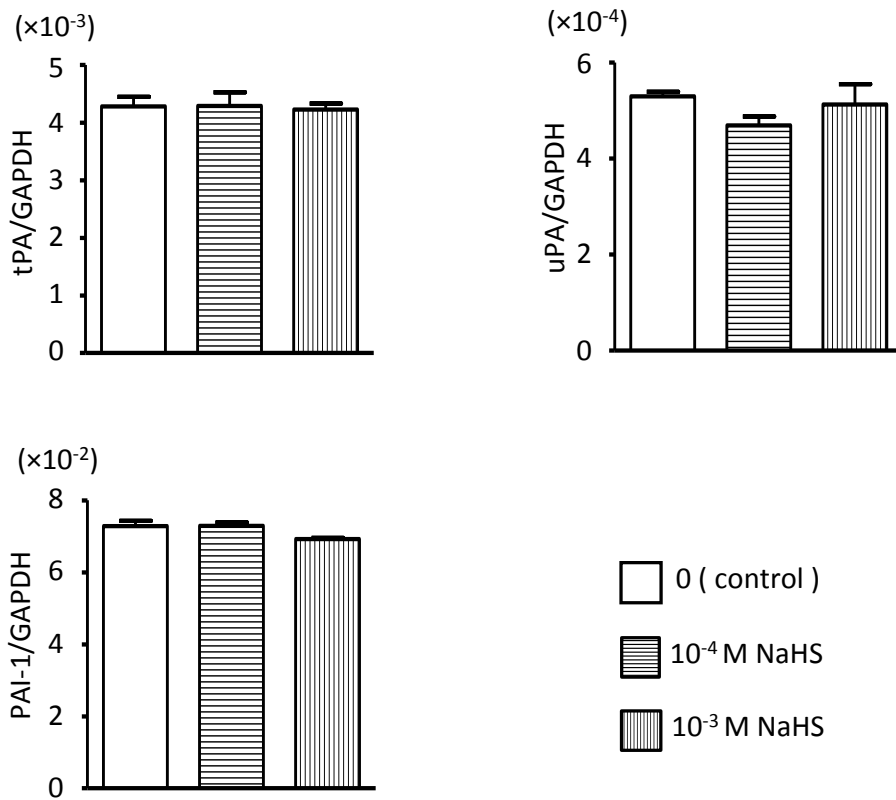


第 1 図 MMPs の遺伝子発現に及ぼす NaHS の影響

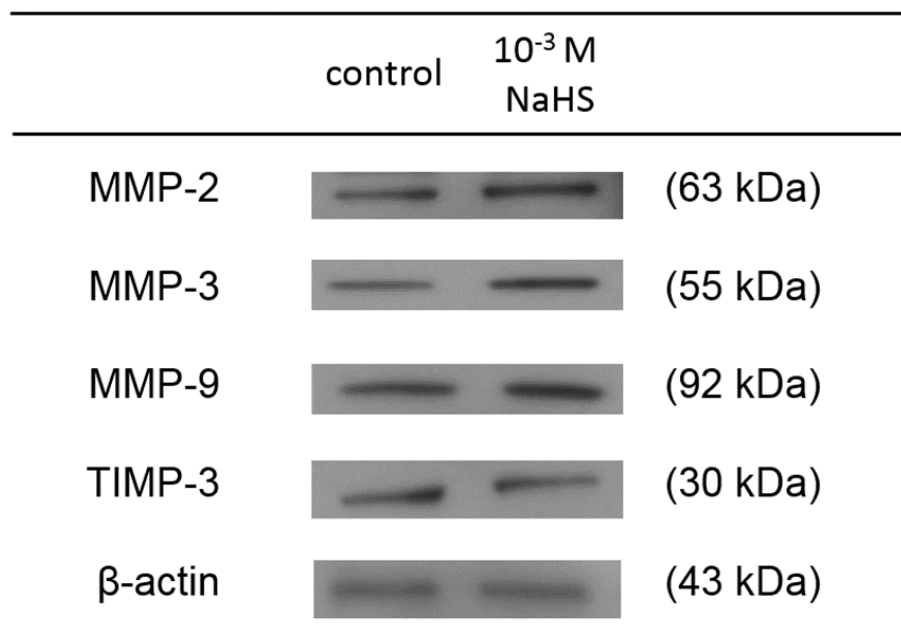
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (NaHS vs. control)



第2図 TIMPsの遺伝子発現に及ぼすNaHSの影響
 $*p < 0.05$ (NaHS vs. control)



第3図 PAs および PAI-1 の遺伝子発現に及ぼす NaHS の影響



第4図 MMP-2, MMP-3, MMP-9 および TIMP-3 のタンパク発現に及ぼす NaHS の影響