

—原 著—

ヒト歯周炎罹患歯肉におけるTIMP-1, TIMP-2 および Collagenase mRNA 発現の検索

野 村 隆 高 橋 徳 也* 原 耕 二

新潟大学歯学部歯科保存学第2教室

(主任:原 耕二 教授)

*新潟大学歯学部口腔生化学教室

Expression of TIMP-1, TIMP-2 and collagenase mRNA
in periodontitis-affected human gingival tissue.

Takashi NOMURA, Tokuya TAKAHASHI*, Kohji HARA

*Department of Periodontology, Niigata University School of Dentistry
(Chief: Prof. Kohji HARA)*

**Department of Oral Biochemistry, Niigata University School of Dentistry*

Key Words : TIMP-gene, Collagenase-gene, RT-PCR, Periodontitis.

ABSTRACT

Collagenolysis in periodontitis is thought to be modulated by the expression of three genes, one for collagenase and the two others for tissue inhibitors of metalloproteinases-1 and -2 (TIMP-1 and -2). We assessed possible difference in TIMP-1, TIMP-2 and collagenase mRNA levels between gingival samples from patients with periodontitis and those from healthy subjects by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The technique allows detection of transcripts from a very small sample quantity. The experiments showed levels of TIMP-1 and collagenase transcripts relative to β -actin to be significantly higher in the diseased group than in healthy controls (8.11 ± 0.83 versus $1.38 \pm 0.28\%$ for TIMP-1 and 0.50 ± 0.10 versus $0.0075 \pm 0.0024\%$ for collagenase, respectively). The difference in TIMP-2 was not significant between the two groups (2.91 ± 0.46 versus $1.84 \pm 0.87\%$). Our results suggest that the host responded to the increase in collagenase level by preferentially producing TIMP-1 to overcome tissue destruction due to periodontitis. The differential gene expression of TIMP-1 and TIMP-2 in our study may be accounting for a distinct genetic regulation of TIMP-1 and -2 *in vivo*.

要 旨

歯周炎罹患歯肉及び健常歯肉における collagenase, TIMP-1, -2 の mRNA 発現を検索するために、逆転写 PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR) 法という極めて高感度の mRNA 検索法を用いて、歯周炎患者10名及び健常者5名より得た微量歯肉サンプル中の各 mRNA 発現レベルを同時に検索した。mRNA の検出に際しては、 β -actin (house-keeping 遺伝子のひとつでありその発現が比較的一定である) をコントロールとして用い、各 mRNA の発現レベルを β -actin の mRNA レベルに対する比率%として求めた。

その結果、歯周炎患者歯肉における TIMP-1 と collagenase の mRNA レベルは、健常者歯肉に比べ有意に高いことが明らかになった (mean \pm S E ; TIMP-1 : 8.11 ± 0.83 vs $1.38 \pm 0.28\%$, collagenase : 0.50 ± 0.10 vs $0.0075 \pm 0.0024\%$)。それに対し、TIMP-2 の mRNA レベルについては患者と健常者で有意差は得られなかった (2.91 ± 0.46 vs $1.84 \pm 0.87\%$)。

これらの結果から、炎症歯肉においては、collagenase 産生の上昇による結合組織破壊が生じていると同時に、破壊の進行を抑えようとする生体の防御反応として TIMP-1 産生の上昇が起こっていること、また、TIMP-1 と TIMP-2 は異なる遺伝子調節を受けており、組織破壊に対する防御機構としては TIMP-2 よりも TIMP-1 の方が選択的に動員される可能性があることが示唆された。

緒 言

歯周炎に伴う結合組織破壊には、間質 collagenase (fibroblast-type, neutrophil-type) に代表される matrix metalloproteinases とその特異的 inhibitor とのバランスの崩壊が大きく関与していると考えられる¹⁻³⁾。このことは、歯周炎患者の歯肉あるいは GCF 中において collagenase 活性が健常者に比べ増加していること⁴⁻¹⁰⁾、また、歯周治療による炎症の消退とともにその活性は減少す

ること¹¹⁻¹³⁾、さらに健常者 GCF 中の collagenase inhibitor 濃度は歯周炎患者に比べ高いこと¹¹⁾、などの報告により支持されている。従来より、組織内の collagenase inhibitor として tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) がよく知られてきた^{14,15)}が、最近、TIMP-1 とは別の inhibitor (TIMP-2) がクローニングされ注目されている¹⁶⁻¹⁸⁾。Adachi と Nohara はウシ歯肉から性質の異なる3種類の collagenase inhibitor を分離した¹⁹⁾が、ヒト歯肉においても TIMP-1, TIMP-2 をはじめとするいくつかの inhibitor が生理的、病的に複雑に関わり合っていることが予測できる。歯肉局所における collagenase とその inhibitor の発現様式を知ることが、歯周炎に伴う組織破壊機構の解明に重要なヒントをもたらしてくれるものと思われるが、タンパクレベルでの検出は例えば好中球 elastase や活性酸素による TIMP 不活化など^{20,21)}の問題から見て難しく、そこで遺伝子レベルでの検索がより有用となる。今回著者らは、検出感度の点で非常に優れ、微量なサンプルでも検出可能な逆転写 PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR) 法²²⁻²⁴⁾を応用し、ある1箇所の歯周ポケット周囲の歯肉組織における collagenase, TIMP-1, TIMP-2 の発現を同時に遺伝子レベルで検索することに成功したのでここに報告する。

材料および方法

1. 歯肉組織の採取

炎症歯肉組織は、新潟大学歯学部附属病院保存科を受診した成人性歯周炎患者10名より得た。初期治療終了後、歯周手術を必要とした部位について、臨床パラメーター: Gingival index (G I)²⁵⁾, Probing depth (PD), Loss of attachment (LA), Bleeding on probing (BOP), Alveolar bone loss on roentgenogram (BL)²⁶⁾を用いて診査した後、最も深い歯周ポケットのポケット側1/3の炎症歯肉を内斜切開により採取した。採取した歯肉組織は直ちに 4 M guanidium isothiocyanate (GSCN) 溶液 (Total RNA isolation

Table 1 Clinical assessments of the sampling sites

No.	Age(y.)	Sex	site	GI	PD(mm)	LA(mm)	BOP	BL(%)
Diseased samples								
1	45	M	27*ML	1	6	12	+	65
2	44	M	37 MB	1	7	9	+	40
3	57	F	34 MB	1	5	8	+	70
4	48	F	26 B	2	8	13	+	75
5	52	F	16 MB	1	9	9	+	90
6	49	M	47 MB	2	6	7	+	60
7	54	M	26 MB	1	6	7	+	80
8	58	F	37 DL	1	5	13	+	35
9	51	M	11 DL	2	8	8	+	50
10	46	M	15 MB	2	9	10	+	40
Mean±SD								
	50.4±4.9			1.4±0.5	6.9±1.5	9.6±2.3		60.5±18.8
Healthy samples								
1	15	F	24 B	0	1	1	-	5
2	17	F	14 B	0	1	1	-	10
3	14	F	24 B	0	0	0	-	5
4	13	M	44 B	0	0	0	-	5
5	12	F	44 B	0	1	0	-	0
Mean±SD								
	14.2±1.9			0±0	0.6±0.6	0.4±0.6		5.0±2.5

All values are expressed in mean±SD.

M:Male; F:Female. *:Tooth type. MB:Mesio Buccal; ML:Mesio Lingual; DL:Distolingual; B:Buccal.

GI:Gingival index; PD:Probing depth; LA:Loss of attachment; BOP:Bleeding on probing.

+:Presence of BOP; -:Absence of BOP. BL:Alveolar bone loss on roentgenogram.

kit, Invitrogen, CA) 中に入れ、dry ice-ethanol 中にて凍結させた後、 -78°C にて保存した。健常歯肉は、臨床的に健康な歯周組織を有する5名の矯正患者より便宜抜歯時に炎症歯肉と同様な方法で採取した。

採取部位の臨床パラメーターを Table 1 に示す。

2. 歯肉 RNA の抽出と精製

歯肉 RNA の抽出と精製は kit 付属のプロトコール (Total RNA isolation kit, Invitrogen, CA) に従って以下のように行った。氷温の GSCN 溶液中の歯肉組織を Polytron (Kinematica, Luzern) にてホモジネートした後、5.7M CsCl 溶液上に積層し超遠心分離 ($175,000\times g$, 20°C , 18時間) を行い RNA を抽出・精製した。精製後、RNA 溶液の濃度は吸光度260nm 測定によって定めた。

3. オリゴヌクレオチド・プライマー

すでに報告されているヒト TIMP-1¹⁵⁾, TIMP-2¹⁸⁾, fibroblast collagenase²⁷⁾, β -actin²⁸⁾ の cDNA 塩基配列を基に、それぞれに特異的なプライマーを設計し依頼合成した (種橋器械店、東京)。この研究で用いたプライマーを Table 2 に示す。プライマーの設計にあたっては PCR によって増幅される各 DNA 部分の長さが約100bp ずつ異なるように考慮して [β -actin (300bp), TIMP-1 (386bp), TIMP-2 (496bp), fibroblast collagenase (611bp)], それぞれの mRNA 発現量を同時に解析できるようにした。増幅された各 DNA はそれぞれ3種類の制限酵素 (β -actin については *Hinf* I, *Mfl* I, *Hap* II、TIMP-1 については *Hinf* I, *Nco* I, *Hae* II、TIMP-2 については *Hap* II, *Cfr* 13 I, *Kpn* I、fibroblast collagenase については *Dra* I, *Bam* HI, *Cla* I、制限酵素はすべて宝酒造より購入) により切断した結

Table 2 Synthetic oligonucleotide primers used for RT-PCR

Primer	Sequence	Length(mer)	Location	Length of PCR product(base pairs)
<i>β-actin</i>				
Forward	5'-GCGAGAAGATGACCCAGATCATGTT-3'	25	388-412 ^a	300
Reverse	5'-GCTTCTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'	25	663-687	
<i>TIMP-1</i>				
Forward	5'-AGTCAACCAGACCACCTTATACCA-3'	24	225-248 ^b	386
Reverse	5'-TTTCAGAGCCTTGGAGGAGCTGGTC-3'	25	586-610	
<i>TIMP-2</i>				
Forward	5'-GGAAGTGGACTCTGGAAACGACATT-3'	25	413-437 ^c	496
Reverse	5'-CTCGATGTCGAGAACTCCTGCTTG-3'	25	884-908	
<i>Fibroblast collagenase</i>				
Forward	5'-CATCCAAGCCATATATGGACGTTCC-3'	25	833-857 ^d	611
Reverse	5'-TCTGGAGAGTCAAAATTCTTCTCGT-3'	25	1419-1443	

^aThe sequence for the human *β-actin*(28).

^bThe sequence for the human *TIMP-1*(15).

^cThe sequence for the human *TIMP-2*(18).

^dThe sequence for the human fibroblast collagenase(27).

果、予想された長さの断片が得られたことから、目的とする遺伝子由来であることを確認した。

4. 逆転写 PCR

逆転写反応は、細胞全 RNA (0.5 μg) を用い、先に記述された方法²⁹⁾に従って、10U avian myeloblastosis virus 逆転写酵素, 100ng random hexamer, 5 U RNase inhibitor, 各 1 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (宝酒造、京都), 50mM Tris-HCl (pH8.3), 140mM KCl, 10mM MgCl₂, 4 mM dithiothreitol (和光純薬、大阪) を含む 10 μl の反応液中にて 42°C、2 時間行った。その後、10 μl の逆転写反応液を PCR 反応液 [10mM Tris-HCl (pH8.3), 1.5mM MgCl₂, 0.1mg/ml 滅菌 gelatin, 0.2mM dNTPs, 10 μCi [^{α-32}P] dCTP (6000Ci/mmol: Amersham Japan), 5pmol 各 oligonucleotide primer, 2.5U *Taq*-DNA polymerase (AmpliTaq: 宝酒造、京都)] 90 μl に加え、DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus, CT) にて、denaturation; 94°C 1 分, annealing; 60°C 2 分, polymerizatio

n; 72°C 3 分の条件で PCR 反応を行った。目的とする 4 種類の各 DNA 断片 (*β-actin*, *TIMP-1*, *TIMP-2*, fibroblast collagenase) は同時に増幅された。増幅効率を調べる目的で、8 サイクルから 30 サイクルまで 2 サイクル毎に PCR 反応液 5 μl をサンプリングし、アガロースゲル電気泳動にかけた。

予備実験として、同一の RNA サンプル (Table 1, 患者群: No.1) 1.0 μg, 0.5 μg, 0.25 μg, 0.05 μg を用いて逆転写 PCR 法を行ったところ、*β-actin* に対する mRNA 発現量 (mean ± SD%) は、*TIMP-1* (11.2 ± 0.58%), *TIMP-2* (0.82 ± 0.058%), Collagenase (1.6 ± 0.23%) となり、この全 RNA 量の範囲内では非常にばらつきは少ないことから、全 RNA 0.5 μg を実験系に用いることは適正であると判断した。また、同一の RNA サンプルを用い、*β-actin*, *TIMP-1*, *TIMP-2*, Collagenase の全てのプライマーで 4 種類の DNA 断片を同時増幅した場合の各プライマー間の相互干渉を調べたところ、各 mRNA 発現量 (%) の数値は同時増幅によって影響されない

Table 3 Examination of possible interferences in simultaneous RT-PCR.

		Primer set				Transcript levels(%) relative to β -actin
		β -actin	TIMP-1	TIMP-2	Fibroblast collagenase	
TIMP-1	A	*	*	*	*	12.0
	B	*	*			11.2
TIMP-2	A	*	*	*	*	0.82
	B	*		*		0.83
Fibroblast collagenase	A	*	*	*	*	1.3
	B	*			*	1.3

0.5 μ g of total RNA obtained from the diseased sample (Table 1, No.1) was used for RT-PCR. A: All four primer-pairs were used; B: Two primer-pairs for β -actin and TIMP-1 or TIMP-2 or fibroblast collagenase) were used.

A comparison of the value of A with B shows the influence of simultaneous RT-PCR on the transcript levels to be minimal.

ことを確認した (Table 3)。

全ての RNA サンプルは、逆転写反応を行わずにそのまま PCR を行った場合には PCR 増幅産物が出現しないことから、RNA サンプル中には PCR 増幅産物を生じさせるような DNA の混入が無く、逆転写 PCR により出現するバンドは全て mRNA 由来であることを確認した。

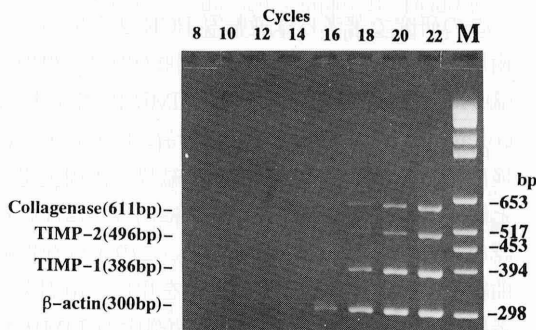


Fig.1 Ethidium bromide staining pattern of simultaneously-amplified PCR products on agarose-gel electrophoresis.

Total RNA extracted from the diseased sample (Table 1, No.1) displayed ethidium bromide positive bands on an ultraviolet rays-transilluminator. The bands for fibroblast collagenase (611bp), TIMP-2 (496bp), TIMP-1 (386bp) and β -actin (300bp) are demonstrated. The number on the top of each lane represents cycles in PCR. Lane M is the DNA molecular weight markers.

5. アガロースゲル電気泳動

8 サイクルから30サイクルまで2サイクル毎に5 μ lずつサンプリングした PCR 反応液に等量の1 \times loading buffer (0.042% bromophenol blue, 0.042% xylene cyanol FF, 5% glycerol) を加え、3% NuSieve 3:1 アガロース (FMC bioproducts) ミニゲルにて100Vで2時間電気泳動した (Fig.1)。電気泳動 buffer は0.5 \times TBE (0.045M Tris-borate, 0.001M EDTA) を用いた。

電気泳動後、ゲルは vacuum oven (80 $^{\circ}$ C、2時間) にて乾燥させ、以下の分析に用いた。

6. TIMP-1, TIMP-2, fibroblast collagenase の mRNA レベルの解析

TIMP-1, TIMP-2, fibroblast collagenase, β -actin の mRNA に由来するそれぞれに特異的な PCR 増幅産物のバンドの放射活性 (Fig.2a) を、Bioimage analyzer (BAS 2000; 富士フィルム社) を用いて測定した。得られた数値は片対数グラフにプロットし、その直線部分よりそれぞれの PCR 産物の増幅効率を求めた (Fig.2b)。

TIMP-1, TIMP-2, fibroblast collagenase の mRNA レベルは、house-keeping 遺伝子であり

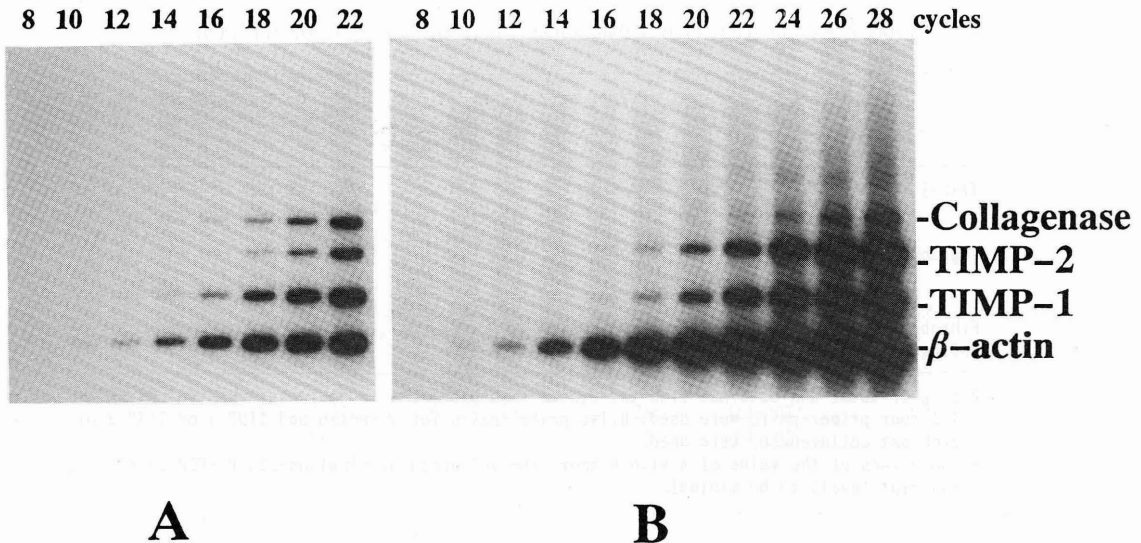


Fig.2 a: Autoradiograms of RT-PCR products.

The gels were dried and exposed for 3h. Clearly different patterns between the diseased (Table 1, No.1: A) and the healthy (Table 1, No.1: B) samples are shown.

転写レベルが一定といわれる β -actin の mRNA の転写レベルに対する相対値 (%) として、Chelly ら²⁴⁾ の式を応用した以下の公式によって算出した。

$$A\chi / A\beta = Y\chi (1 + R\beta)^n GC\beta / Y\beta (1 + R\chi)^n GC\chi$$

この公式は次の等式から得られたものである。

$$Y\beta = A\beta (1 + R\beta)^n GC\beta$$

$$Y\chi = A\chi (1 + R\chi)^n GC\chi$$

A: PCR 増幅前の DNA 量、すなわち mRNA に相当する量

Y: PCR 増幅後の DNA 量

R: PCR 増幅効率 (理論的には、 $0 < R \leq 1$)

GC: PCR 増幅断片 sense strand 中の GC 数

n: PCR サイクル数

β : β -actin

χ : TIMP-1, TIMP-2, fibroblast collagenase

7. 統計分析

TIMP-1, TIMP-2, fibroblast collagenase の

β -actin に対する mRNA 発現レベル (%) について統計処理を行った。Student's t-test にて、 $p < 0.05$ で有意差有りとした。

結 果

この研究で著者らは逆転写 PCR 法を応用し、歯周ポケットあるいは歯肉溝周囲の微量な歯肉組織中に発現している TIMP-1, TIMP-2, fibroblast collagenase の各 mRNA を同時にしかも迅速に検出することに成功した。その結果、歯周炎患者と健常者ではその発現パターンに明らかに違いが認められた (Fig.2a, Fig.2b)。このような増幅曲線の直線部分 (対数増幅期) を用い、歯周炎患者群及び健常者群より得た歯肉組織中の TIMP-1, TIMP-2, fibroblast collagenase の mRNA 発現レベル (%) を求めた結果を Fig.3, Table 4 に示す。TIMP-1 の β -actin に対する mRNA 発現レベル (mean \pm SE) は、患者数で $8.11 \pm 0.83\%$ 、健常者群で $1.38 \pm 0.28\%$ であり、患者群は健常者群の 5.9 倍と有意に高かった ($p < 0.001$)。それに対して TIMP-2 では、患者群で $2.91 \pm 0.46\%$ 、健常者群で $1.84 \pm 0.87\%$ と、患者群と健常者群で

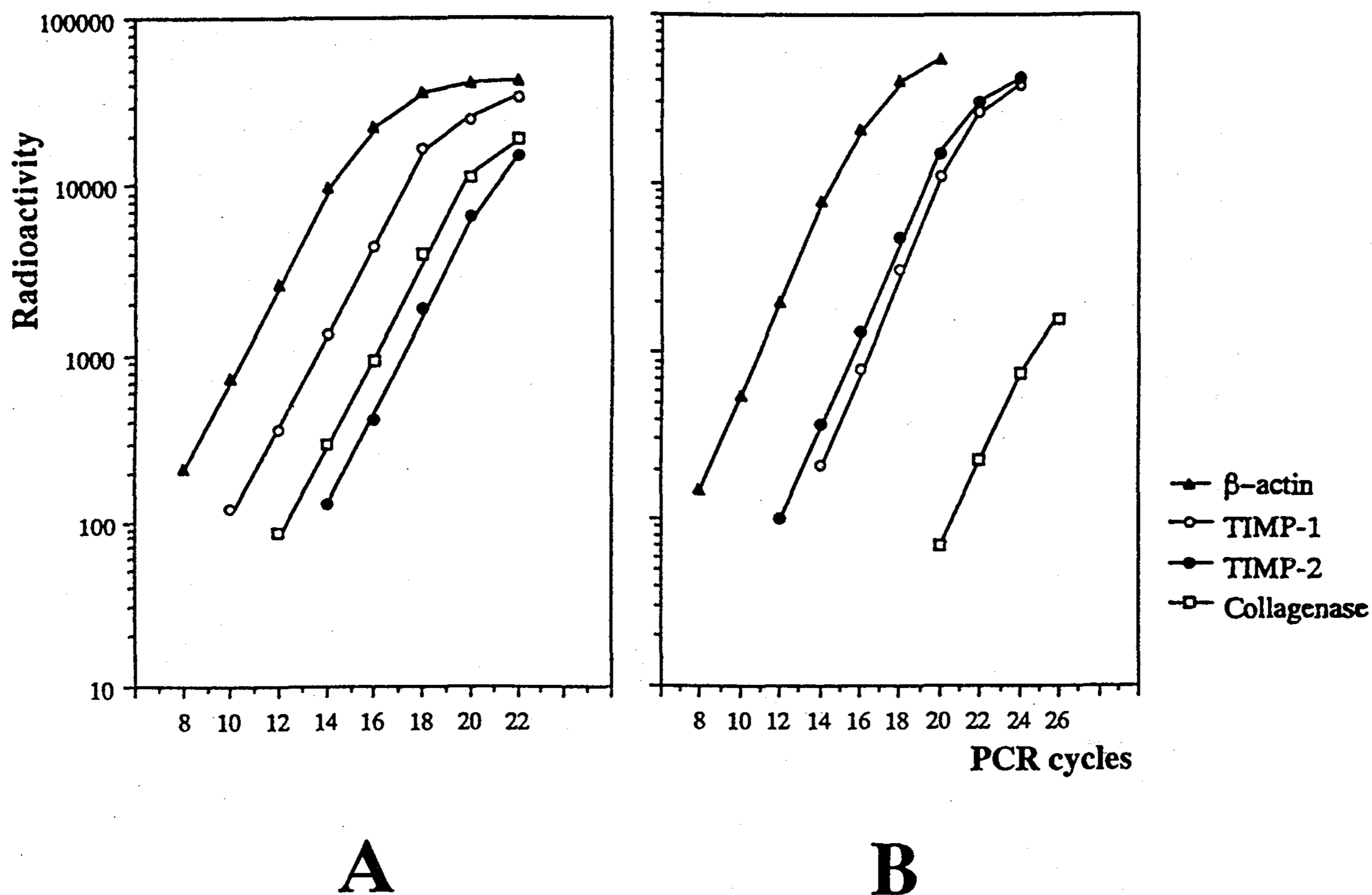


Fig. 2 b: Relative levels of RT-PCR amplification products as per the results obtained by laser image analysis.

Radioactivity of each band, calculated with laser image analyzer, is plotted on a semilogarithmic scale. The average background pixels in the areas above and below the band of interest were subtracted from the pixels in the band. The amplification curve consists of an exponential phase which ends in a plateau. The same samples as (Fig. 2a) were used.

A: Periodontitis-affected sample; B: Healthy sample.

Vertical axis: radioactivity expressed in BAS-2000 analyzer unit; Horizontal axis: Amplification cycles by RT-PCR.

有意差は得られなかった。また、fibroblast collagenase については、患者群で $0.50 \pm 0.10\%$ 、健常者群で $0.0075 \pm 0.0024\%$ であり、患者群は健常者群の67倍と有意に高かった($p < 0.005$)。

考 察

今回著者らは RT-PCR 法という、極めて mRNA 検出の感度に優れ、しかも簡便で迅速な方法を用いた^{22,23}。この方法によって、ある1箇所の歯周ポケットをターゲットにして、そのポケットを取りまく非常に微量な歯肉組織中の種々 mRNA レベルを検出することが可能になった。RT-PCR は DNA が対数的に増幅される反応であるため、mRNA の定量に応用することは難し

いとされてきたが、現在までいくつかの RT-PCR 法を用いた mRNA 定量法が報告されている^{24,30,31}。そのなかで著者らは Chelly らの方法²⁴に注目し、 β -actin 遺伝子を calibrator として用い、さらに目的の遺伝子の PCR 増幅産物の大きさに差が生じるように各種プライマーを設計することによって、TIMP-1, TIMP-2, collagenase (fibroblast-type) の mRNA 発現レベルを同時に検索することに成功した。 β -actin のような内部コントロールの mRNA 量が多い場合、内部コントロール遺伝子の増幅が目的遺伝子の増幅に影響を与えることが報告されている³¹が、今回の研究では各プライマーの濃度を通常の1/10程度、すなわち $0.05 \mu\text{M}$ という低い濃度に設定すること

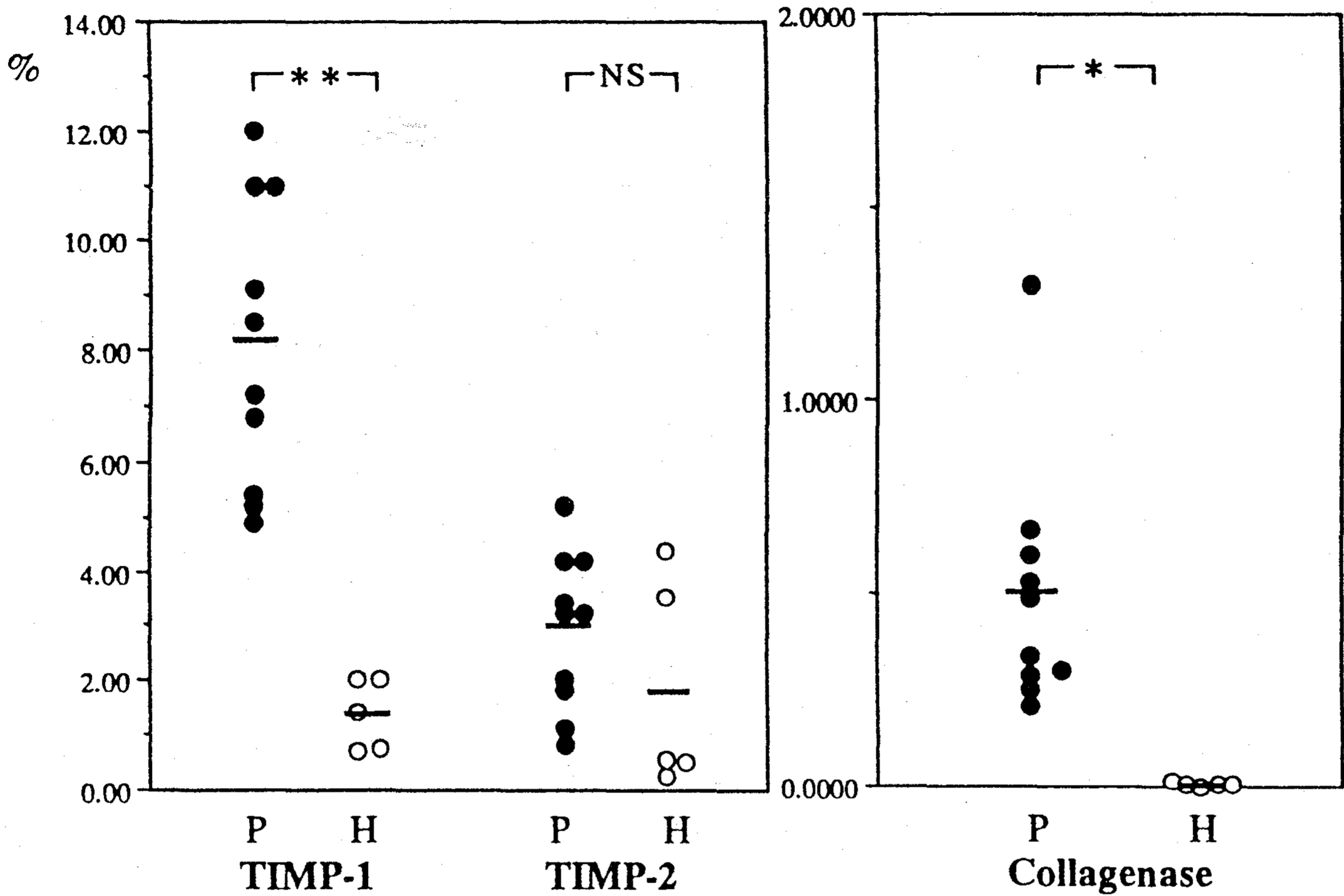


Fig.3 Individual transcript levels(%) of TIMP-1, TIMP-2 and collagenase genes in patients with periodontitis (P,●) and healthy controls (H,○). The horizontal bar represents the mean value of each group. **: significant at $p < 0.001$; *: significant at $p < 0.005$; and NS: not significant ($p > 0.05$) by Student *t*-test.

Table 4 Transcript levels of TIMP-1, TIMP-2 and fibroblast collagenase relative to β -actin in human gingival tissue.

	TIMP-1	TIMP-2	Fibroblast collagenase
Diseased samples(n=10 sites)			
Mean±SE %	8.11±0.83**	2.91±0.46NS	0.50±0.10*
Healthy samples(n=5 sites)			
Mean±SE %	1.38±0.28	1.84±0.87	0.0075±0.0024

All values are expressed in mean±SE percentage of transcript levels relative to β -actin (%).

** :Difference with healthy samples significant at $p < 0.001$.

* :Difference with healthy samples significant at $p < 0.005$.

NS:Not significant ($p > 0.05$).

によって、非常に効率の良い増幅が得られた。このような報告は以前にもあるが³²⁾、これはプライマー濃度を必要最小限にすれば、分析に必要な対数増幅期 (Fig.2b) がある程度得られた時点でプライマーは欠乏状態に達するため、その後の不必要な増幅が起こらないようになり、その結果、増幅途中にある他の遺伝子の増幅への影響が最小限に抑えられたものと考えられる (Table 3)。RT-PCR 法は特に歯肉のような微量の組織中の種々の mRNA レベルを検索する上でこれから大いに役立つものと思われる。

この研究で著者らは、歯周炎罹患歯肉中では健康者歯肉に比べ、collagenase と同様に TIMP-1 の mRNA レベルが上昇していること、それに対して、TIMP-2 はほとんど変化していないことを証明した。細菌等に由来する抗原刺激を受けやすい、歯周ポケットに近接する歯肉組織においては、collagenase 発現レベルの過度の上昇に伴い正常な collagen 代謝機能は失われ、過度な組合組織破壊が生じる環境にある一方で、破壊の進行を少しでも和げようとして collagenase-inhibitor (特に TIMP-1) の発現レベルの上昇が起こり、生体の防御反応が働いているものと考えられる。歯肉固有層中の炎症細胞浸潤部では collagen 合成が低下しているのに対し浸潤部周囲の線維化の亢進している部分では collagen 合成が促進していること³³⁾がこのことを裏付けている。また、慢性炎症疾患であるリウマチ性関節炎では、組織破壊が生じている病的滑膜中では、collagenase に比べ TIMP-1 の発現レベルが低下している³⁴⁾のに対し、それを取り囲む関節液中では正常関節液よりも TIMP-1 濃度が高いこと³⁵⁾、さらに腫瘍分野においても、癌組織中では TIMP-1 の mRNA レベルが高いこと^{36,37)}、*in situ hybridization* の結果、TIMP-1 は腫瘍細胞ではなく、それを取り囲む間質細胞が発現していること³⁷⁾などの報告も見られる。

健康者に比べ、歯周炎罹患歯肉で TIMP-1 の mRNA レベルが高いという今回の結果は、TIMP は歯周炎患者よりも健康者および歯周治療後の患者の GCF 中に高濃度で存在するという先

の報告^{1,11)}と相反するものであった。これはおそらく、歯周炎患者 GCF においては、好中球の浸潤に伴う elastase 活性の増加³⁸⁻⁴⁰⁾、あるいは活性酸素系の亢進が生じ、これらによって TIMP-1 のほとんどが不活性化されてしまう^{20,21)}ためであろう。

組織修復に関与するサイトカインの1つとして TGF- β がよく知られるが、*in vitro* の実験で、TGF- β には collagen 合成能⁴¹⁾に加えて、collagenase 産生の抑制、TIMP-1 産生の促進作用^{36,42)}、TIMP-2 産生の抑制作用³⁶⁾のあることが報告されている。歯周ポケットに近接する炎症組織の周囲では組織破壊を抑制するために TGF- β が発現していると仮定すれば、TIMP-2 ではなく TIMP-1 が著明に増加していることが説明できるだろう。このような炎症歯肉における TIMP-1 と TIMP-2 の独立した発現様式は、大腸癌組織における報告³⁶⁾と一致し非常に興味深い。以上のことから、炎症、腫瘍に関わらず、組織破壊が生じた時の生体防御反応として、TIMP-2 よりも TIMP-1 が選択的に動員される可能性があることが推測される。

炎症歯肉あるいは炎症部位より得られた GCF 中に collagenase 活性があることは、これまで数多く報告されており⁴⁻¹³⁾、また、成人性歯周炎罹患歯肉で発現している collagenase は基質特異性などの生化学的性質から見て、主として neutrophil-type であるのに対し、若年性歯周炎患者では主として fibroblast-type であるとされている⁴³⁻⁴⁵⁾。しかし、今回著者らは fibroblast collagenase²⁷⁾ の DNA 塩基配列に特異的なプライマーを用いた RT-PCR 法によってその mRNA レベルを調べたところ、成人性歯周炎患者歯肉において fibroblast collagenase mRNA レベルが健康者の約67倍も高まっていることを証明し、neutrophil collagenase に加え、fibroblast collagenase も歯周組織の破壊に関与している可能性があることが示唆された。今後、neutrophil collagenase⁴⁶⁾ の塩基配列に特異的なプライマーを用いて同様の実験を行えば、歯肉局所における neutrophil-type と fibroblast-type の collagenase の発現を遺伝子レベルで検索することが可能となり、成人性歯周炎

と若年性歯周炎の結合組織破壊機構の解明に大いに役立つものと考えられる。

歯肉における collagen 代謝機構には多くの要因が複雑に関与しているものと考えられるが、今回著者らの示した知見は、それを解明する上で極めて有用なものであろう。将来、さらなるこのような研究に *in situ hybridization* などの方法を併用すれば、歯周炎における TIMP-1, TIMP-2, collagenase の詳細な役割が解明されていくに違いない。

結 論

歯周炎罹患歯肉及び健常歯肉中の TIMP-1, TIMP-2, collagenase mRNA 発現レベルを、逆転写 PCR 法を用いて検索し、以下のような結論を得た。

- 1) 歯周炎患者歯肉における TIMP-1 と collagenase の mRNA レベルは、健常者歯肉に比べ有意に高かった。それに対して、TIMP-2 の mRNA レベルは患者と健常者で有意差は得られなかった、このことから、炎症歯肉においては、collagenase 産生の上昇による結合組織破壊が生じていると同時に、破壊の進行を抑えようとする生体の防御反応として TIMP-1 産生の上昇が起こっていること、また TIMP-1 と TIMP-2 は異なる遺伝子調節を受けており、組織破壊に対する防御機構としては TIMP-2 よりも TIMP-1 の方が選択的に動員される可能性があることが示唆された。
- 2) 成人性歯周炎患者歯肉で発現されている collagenase は主として neutrophil-type とされているが、この研究で、炎症歯肉において fibroblast-type collagenase mRNA レベルが健常歯肉の67倍も上昇していることが証明された。このことから、成人性歯周炎に伴う歯肉組織破壊には neutrophil-type に加えて、fibroblast-type collagenase も関与している可能性があることが示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたって、本研究の遂行に際し、

ご懇篤なるご助言、ご指導を賜りました野原廣美新潟大学名誉教授に深く感謝いたします。さらに、歯肉組織採取の際の患者管理に際しご指導、ご助言を賜りました本学歯科保存学第2教室、吉江弘正助教授、Laser Image Analyzer の使用に際しご懇切なるご指導を賜りました新潟大学遺伝子実験施設、桑野良三助教授、対照群としての歯肉組織採取の際にご協力下さいました本学歯科矯正学教室および口腔外科学第1、第2教室の諸先生に謹んで感謝の意を表します。また、研究に多大なるご協力を頂いた本学歯科保存学第2教室および口腔生化学教室の諸先生に感謝いたします。

尚、本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(課題番号03454440)及び日本学術振興会特別研究員研究奨励金によって行われた。

REFERENCES

- 1) Page, R. C.: The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodont. Res.*, **26**: 230-242, 1991.
- 2) Overall, C. M., Wrana, J. L. and Sodek, J.: Induction of formative and resorptive cellular phenotypes in human gingival fibroblasts by TGF- β 1 and concanavalin A: Regulation of matrix metalloproteinases and TIMP. *J. Periodont. Res.*, **26**: 279-282, 1991.
- 3) Docherty, A. J. P. and Murphy, G.: The tissue metalloproteinase family and the inhibitor TIMP: a study using cDNAs and recombinant proteins. *Ann. Rheum. Dis.*, **49**: 469-479, 1990.
- 4) Golub, L. M., Kaplan, R., Mulvihill, J. E. and Ramamurthy, N. S.: Collagenolytic activity of crevicular fluid and of adjacent gingival tissue. *J. Dent. Res.*, **58**: 2132-2136, 1979.
- 5) Kowashi, Y., Jaccard, F. and Cimasoni, G.: Increase of free collagenase and

- neutral proteinase activities in the gingival crevice during experimental gingivitis in man. *Archs. Oral. Biol.*, **24**: 645-650, 1979.
- 6) Uitto, V-J., Appelgren, R. and Robinson, P. J.: Collagenase and neutral metalloproteinase activity in extracts of inflamed human gingiva. *J. Periodont. Res.*, **16**: 417-424, 1981.
- 7) Yanagimura, M., Hara, K. and Nohara, H.: Collagenase activities in healthy and inflamed gingiva of dogs. *J. Periodont. Res.*, **18**: 1-10, 1983.
- 8) Villela, B., Cogen, R. B., Bartolucci, A. A. and Birkedal-Hansen, H.: Collagenolytic activity in crevicular fluid from patients with chronic adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and gingivitis, and from healthy control subjects. *J. Periodont. Res.*, **22**: 381-389, 1987.
- 9) Overall, C. M., Wiebkin, O. W. and Thonard, J. C.: Demonstration of tissue collagenase activity *in vivo* and its relationship to inflammation severity in human gingiva. *J. Periodont. Res.*, **22**: 81-88, 1987.
- 10) Kryshchalskyj, E. and Sodek, J.: Nature of collagenolytic enzyme and inhibitor activities in crevicular fluid from healthy and inflamed periodontal tissues of beagle dogs. *J. Periodont. Res.*, **22**: 264-269, 1987.
- 11) Larivée, J., Sodek, J. and Ferrier, J. M.: Collagenase and collagenase inhibitor activities in crevicular fluid of patients receiving treatment for localized juvenile periodontitis. *J. Periodont. Res.*, **21**: 702-715, 1986.
- 12) Hakkarainen, K., Uitto, V-J. and Ainamo, J.: Collagenase activity and protein content of sulcular fluid after scaling and occlusal adjustment of teeth with deep periodontal pockets. *J. Periodont. Res.*, **23**: 204-210, 1988.
- 13) Yanagimura, M., Koike, F. and Hara, K.: Collagenase activity in gingival crevicular fluid and inhibition by tetracyclines. *J. Dent. Res.*, **68(Spec Iss)**: 1691-1693, 1989.
- 14) Docherty, A. J. P., Lyons, A., Smith, B. J., Wright, E. M., Stephens, P. E. and Harris, T. J. R.: Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature*, **318**: 66-69, 1985.
- 15) Carmichael, D. F., Sommer, A., Thompson, R. C., et al.: Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 2407-2411, 1986.
- 16) Goldberg, G. I., Marmer, B. L., Grant, G. A., Eisen, A. Z., Wilhelm, S. and He, C.: Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 8207-8211, 1989.
- 17) Stetler-Stevenson, W. G., Kruttsch, H. C. and Liotta, L. A.: Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J. Biol. Chem.*, **264**: 17374-17378, 1989.
- 18) Boone, T. C., Johnson, M. J., De Clerck, Y. A. and Langley, K. E.: cDNA cloning and expression of a metalloproteinase inhibitor related to tissue inhibitor of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 2800-2804, 1990.
- 19) Adachi, Y. and Nohara, H.: Separation

- and partial characterization of three forms of collagenase inhibitor from bovine gingiva. *Archs. Oral. Biol.*, **34**: 431–436, 1989.
- 20) Okada, Y., Watanabe, S., Nakanishi, I., et. al.: Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteinases. *FEBS Lett.*, **229**: 157–160, 1988.
- 21) Stricklin, G. P. and Hoidal, J. R.: Oxidant-mediated inactivation of TIMP. In: Birkedal-Hansen, H., Werb, Z., Welgus, H. and Wart, H. V., eds. *Matrix metalloproteinases and inhibitors.*, P.325, Gustav Fischer Verlag, New York, 1992.
- 22) Kawasaki, E. S., Clark, S. S., Coyne, M. Y., et al.: Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 5698–5702, 1988.
- 23) Rappolee, D. A., Mark, D., Banda, M. J. and Werb, Z.: Wound macrophages express TGF- α and other growth factors *in vivo*: Analysis by mRNA phenotyping. *Science*, **241**: 708–712, 1988.
- 24) Chelly, J., Kaplan, J-C., Maire, P., Gautron, S. and Kahn, A.: Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature*, **333**: 858–860, 1988.
- 25) Loe, H.: The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J. Periodontol.*, **38**: 610–616, 1967.
- 26) Schei, O., Waerhaug, J., Lovdal, A. and Arno, A.: Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. *J. Periodontol.*, **30**: 7–16, 1959.
- 27) Goldberg, G. I., Wilhelm, S. M., Kronberger, A., Bauer, E. A., Grant, G. A. and Eisen, A. Z.: Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J. Biol. Chem.*, **261**: 6600–6605, 1986.
- 28) Ponte, P., Ng, S-Y., Engel, J., Gunning, P. and Kedes, L.: Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic. Acids. Res.*, **12**: 1687–1696, 1984.
- 29) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.: *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed., P.8.60–8.61, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- 30) Wang, A. M., Doyle, M. V. and Mark, D. F.: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 9717–9721, 1989.
- 31) Murphy, L. D., Herzog, C. E., Rudick, J. B., Fojo, A. T. and Bates, S. E.: Use of polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr-1* gene expression. *Biochemistry*, **29**: 10351–10356, 1990.
- 32) Kawasaki, E. S. and Wang, A. M.: Detection of gene expression. In: Erlich, H. A., ed. *PCR technology.*, P.89–97, Stockton Press, New York, 1989.
- 33) Larjava, H., Sandberg, M. and Vuorio, E.: Altered distribution of type I collagen mRNA in periodontal disease. *J. periodont. Res.*, **24**: 171–177, 1989.
- 34) McCachren, S. S.: Expression of metalloproteinases and metalloproteinase inhibitor in human arthritic synovium. *Arthritis Rheum.*, **34**: 1085–1093, 1991.
- 35) Hayakawa, T., Yamashita, K., Kodama, S., Iwata, H. and Iwata, K.: Tissue inhibitor of metalloproteinases and collagenase activity in synovial fluid of human rheumatoid arthritis. *Biomed. Res.*, **12**:

- 169-173, 1991.
- 36) Stetler-Stevenson, W. G., Brown, P. D., Onisto, M., Levy, A. T. and Liotta, L. A.: Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. *J. Biol. Chem.*, **265**: 13933-13938, 1990.
- 37) Kossakowska, A. E., Urbanski, S. J. and Edwards, D. R.: Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNA is expressed at elevated levels in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*, **77**: 2475-2481, 1991.
- 38) Kowashi, Y., Cimasoni, G. and Matter, J.: Collagen breakdown by gingival collagenase and elastase. *Experientia*, **36**: 395-396, 1980.
- 39) Eley, B. M. and Cox, S. W.: Cathepsin B/L-, elastase-, tryptase-, trypsin and dipeptidyl peptidase IV-like activities in gingival crevicular fluid: Correlation with clinical parameters in untreated chronic periodontitis patients. *J. Periodont. Res.*, **27**: 62-69, 1992.
- 40) Giannopoulou, C., Andersen, E., Demeurisse, C. and Cimasoni, G.: Neutrophil elastase and its inhibitors in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *J. Dent. Res.*, **71**: 359-363, 1992.
- 41) Narayanan, A. S., Page, R. C. and Swanson, J.: Collagen synthesis by human fibroblasts. Regulation by transforming growth factor- β in the presence of other inflammatory mediators. *Biochem. J.*, **260**: 463-469, 1989.
- 42) Overall, C. M., Wrana, J. L. and Sodek, J.: Independent regulation of collagenase, 72-KDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.*, **264**: 1860-1869, 1989.
- 43) Sorsa, T., Uitto, V-J., Suomalainen, K., Vauhkonen, M. and Lindy, S.: Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. *J. Periodont. Res.*, **23**: 386-393, 1988.
- 44) Sorsa, T., Suomalainen, K. and Uitto, V-J.: The role of gingival crevicular fluid and salivary interstitial collagenases in human periodontal diseases. *Archs. Oral. Biol.*, **35**: 193S-196S, 1990.
- 45) Suomalainen, K., Sorsa, T., Saxén, L., Vauhkonen, M. and Uitto, V-J.: Collagenase activity in gingival crevicular fluid of patients with juvenile periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.*, **6**: 24-29, 1991.
- 46) Devarajan, P., Mookhtiar, K., Wart, H. V. and Berliner, N.: Structure and expression of the cDNA encoding human neutrophil collagenase. *Blood*, **77**: 2731-2738, 1991.