

を解明する。初期審査では細胞間接着による platelet-derived growth factor 受容体の発現抑制を報告したが、今回は MSC が分泌する液性因子にも着目して解析を実施した。

【方法】マウス M ϕ 様細胞 Raw264.7 を GFP マウス 骨 髄 由 来 MSC SG2 (Sawada et al., 2016) ならびに線維芽細胞様細胞 SG6 と接着共培養後、単球/M ϕ 分離カラムで Raw264.7 のみを単離し RNA を抽出した。得られた RNA をサイトカイン-サイトカイン受容体アレイに供することで、SG2 との共培養時のみで特異的に発現する遺伝子を網羅的に解析した。同定された遺伝子についてはリアルタイム RT-PCR で発現量を確認した。

【結果】SG2 と接着共培養された Raw264.7 は、SG6 との共培養と比較してケモカイン受容体 C-C chemokine receptor type 7 (CCR7) の mRNA 発現が有意に増加した。一方、Raw264.7 をパラホルムアルデヒドやメタノールで固定した SG2 と共培養しても、CCR7 の mRNA 発現は変化しなかった。この結果は、SG2 によって分泌された因子がパラクリンに作用することで CCR7 の発現を誘導することを示唆している。そこで、我々によって免疫抑制効果が期待できると同定された MSC 由来サイトカイン様ペプチド scrapie responsive gene 1 (SCRG1) で Raw264.7 を処理すると CCR7 の発現が増加した。すなわち、SG2 によって分泌された SCRG1 がパラクリンに Raw264.7 に作用することで CCR7 の発現が増加すると考えられた。

【考察及びまとめ】SCRG1 は、我々によって同定された受容体 bone marrow stromal cell antigen -1/integrin 複合体を介してオートクリンに MSC の stemness を維持する (Aomatsu et al., 2014)。加えて、M ϕ にパラクリンに作用することで LPS 誘導性ケモカイン C-C motif chemokine ligand (CCL) 22 の発現を抑制する (Inoue et al., 2017)。CCL22 は受容体 CCR4 を発現する単球や Th 細胞を炎症の場に誘引する。一方、本研究では SCRG1 が M ϕ の CCR7 の発現を促進することが示された。CCR7 は 7 回膜貫通レセプターを有した G タンパク共役受容体で、ケモカイン CCL19 や CCL21 と結合することで T 細胞や樹状細胞の炎症巣からの退出やリンパ組織へのリクルートに必須な因子として知られている。M ϕ における CCR7 の発現

の意義は明らかになっていないが、炎症の収束に伴って M ϕ が消失するメカニズムに関与する可能性は高い。以上の結果から、炎症部位に集積した MSC から分泌された SCRG1 は、オートクリンに MSC の stemness 維持に寄与するとともに、パラクリンに M ϕ に作用して炎症を調節する可能性が示唆された。今後は、M ϕ における CCR7 の発現誘導メカニズムやリガンド感受性を詳細に解析することで、SCRG1 による炎症調節のメカニズムを明らかにする。

3. ヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-4 の上皮間葉転換における Sox9 および Hippo 経路の関与について

Effects of Hippo pathway and Sox9 on epithelial-to-mesenchymal transition of human oral squamous cell carcinoma cells HSC-4

○平野 大輔, 加茂 政晴*, 石崎 明*,
宮本 郁也, 山田 浩之

岩手医科大学歯学部口腔顎顔面再建学講座
口腔外科学分野, 岩手医科大学生化学
講座細胞情報科学分野*

【背景・目的】

癌細胞の悪性化において、上皮間葉転換 (EMT) によって誘導される細胞間接着因子としての cadherin の質的・量的変化である cadherin switch が重要であることが知られている。我々はこれまでに、EMT 関連転写因子の Slug は、TGF- β 1 刺激で発現が上昇し、E-cadherin の発現を抑制するが、N-cadherin の発現には関与しないことを見出している。しかしながら、口腔領域において最も発生頻度の高いヒト口腔扁平上皮癌 (hOSCC) 細胞において、EMT 誘導性転写因子による cadherin switch の調節機構の詳細は明らかにされていない。一方、癌細胞培養時の密度変化に伴う遺伝子の発現変化は、Hippo 経路により制御されることが知られている。しかし、hOSCC 細胞表面に存在する細胞接着因子による Hippo 経路を介した EMT の制御機構は明らかでない。そこで我々は、hOSCC 細胞の cadherin switch における細胞内シグナル伝達機構について、

EMT 誘導性転写因子, 細胞接着因子並びに Hippo 経路に注目して調べた.

【方法】

hOSCC 細胞として, HSC-4 細胞株を用いた. Cadherin switch に関与する遺伝子とタンパク質は qRT-PCR 及びウェスタンブロット法, 蛍光免疫染色法により解析した.

【結果】

TGF- β 1 刺激で誘導される EMT において, N-cadherin の発現に関与する転写因子として Sox9 を見出した. また Sox9 の遺伝子ノックダウンにより N-cadherin の発現が抑制されたことから, Sox9 は N-cadherin の発現を正に制御することが示された. さらに, Sox9 を遺伝子ノックダウンした HSC-4 細胞の遊走能を migration chamber にて調べたところ, 有意に低下した. 次に, 細胞密度変化に伴う Sox9 の発現変化を調べた結果, 細胞密度の低下に伴い Sox9 発現の上昇が認められると共に, 蛍光免疫染色法により Sox9 の核内移行が確認された. また, 細胞密度の低下に伴い, E-cadherin から N-cadherin への cadherin switch が認められた. さらに, E-cadherin 間の結合を阻害する中和抗体を投与したところ, N-cadherin の発現増大が認められた. また, Hippo 経路のシグナル伝達分子である YAP/TAZ の遺伝子ノックダウンを行ったところ, N-cadherin から E-cadherin への cadherin switch が認められた.

【考察及びまとめ】

1) Sox9 は Slug と同様に EMT を誘導し, 細胞遊走に関与すること, 2) 細胞密度の低下に伴う Sox9 の発現上昇とその核内移行により EMT を誘導すること, 3) E-cadherin の細胞間接着は Hippo 経路の活性化を介して EMT を阻害することが明らかとなった. これらの結果から, hOSCC の悪性化の過程では, E-cadherin による細胞接着が解除されると Hippo 経路を介し YAP が活性化して EMT が誘導されるものと予測している. 現在我々は, この仮説を立証すべく, Hippo 経路が Sox9 の発現にどのように関与するのか更なる調査を実施している.

4. I 型コラーゲンによる抗上皮細胞付着性を有する生体模倣インプラント表面の開発

Development of biomimetic implant surface modification with type I collagen possessing anti-epithelial cell adhesion

○野尻 俊樹, 近藤 尚知, 鬼原 英道,
永井 雅純*

岩手医科大学歯学部補綴・インプラント学講座補綴・インプラント学分野,
Harvard School of Dental Medicine*

【背景・目的】

口腔インプラント治療における合併症の一つに, インプラント周囲炎がある. その原因として, インプラントと軟組織の界面構造における天然歯との違いが挙げられる. 天然歯では, コラーゲン線維の一部がセメント質に垂直に入り込んだ結合組織性の付着により, 上皮のダウングロースを防止している. しかし, インプラント周囲粘膜のコラーゲン線維はインプラント表面と平行に走行しているため, インプラント表面に結合組織性付着は存在せず, 封鎖性に乏しい. 現在までも, インプラント表面における天然歯類似付着構造の獲得に関する多くの報告がなされているが, 不明な部分も多い. 天然歯におけるコラーゲン線維の走行を模して, インプラント表面に I 型コラーゲンを垂直に配向することが可能になれば, 天然歯類似の強固な付着構造が形成され, 臨床的にも有用であると予測される. 本研究の目的は, ①チタンナノチューブアレイ製作条件の最適化と I 型コラーゲンを垂直配向させる手技の開発, ②新規表面修飾の安定性評価, および③新規表面修飾チタンへの上皮細胞の付着動態の検討である.

【方法】

① I 型コラーゲン垂直配向のため, 初めにチタン試験片に陽極酸化処理を施すことにより, 表面にナノチューブアレイを形成した. 次に, I 型コラーゲンをナノチューブアレイ表面ヘポリアクリルアミドゲルを介して電気泳動した. 走査型電子顕微鏡 (SEM) および原子間力顕微鏡 (AFM) により, I 型コラーゲンのナノチューブアレイ表面への付着様式を評価した.