

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.

コントロールとして、従来のコラーゲン処理で用いられる化学リンカーを使用して、試験片表面に I 型コラーゲンを付着させた。②安定性評価のため機械的洗浄試験を行い、ナノチューブアレイ表面に残存した I 型コラーゲンをフーリエ変換赤外分光法により検出し、その残存量を比較した。③新規表面修飾チタンへの不死化ヒト肉肉上皮細胞 (OBA9) の付着動態検討のため、細胞付着数および付着様式を、生細胞数測定キットおよび SEM により評価した。

【結果】

規則的なナノチューブアレイ形成には、30 V の印加電圧で、3 時間陽極酸化の条件が最も適していた。SEM および AFM により、新規表面修飾法において I 型コラーゲンが垂直に配向されていることが観察された。機械的洗浄試験後の、新規表面修飾チタン上の I 型コラーゲン残存量は、他の群と比較して有意に多く、従来の表面性状より安定性が高かった。また、新規表面修飾チタン上で、細胞は疎に付着しており、細胞膜の伸展は抑制されていた。新規表面修飾法により得られた複雑なマイクロサイズの表面構造は、上皮細胞の初期付着を抑制した。

【考察及びまとめ】

新規表面修飾法によりチタン表面に垂直に配向させた I 型コラーゲンは、従来の修飾法に比較して、高い結合力を有することが明らかとなった。また、その微小な表面構造は上皮細胞の初期付着を抑制する傾向があり、新規表面修飾法がインプラントに応用された場合、インプラントと軟組織との天然歯類似の封鎖構造を獲得が可能となり、インプラント周囲炎の防止に寄与できることが示唆された。

5. 細胞外ヌクレオチドが顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞に与える影響について

Effects of extracellular nucleotides on fibroblast-like synoviocytes derived from temporomandibular joint

○松本 識野, 横田 聖司*, 帖佐 直幸*, 石崎 明*, 佐藤 和朗

岩手医科大学歯学部口腔保健育成学講座
歯科矯正学分野, 岩手医科大学大学生化学講座
細胞情報科学分野*

【背景・目的】

顎関節痛障害は、顎関節痛とそれによる機能障害を主徴候とするものであり、顎関節円板障害、変形性顎関節症、顎関節への外来的外傷や内在性外傷によって顎運動時の顎関節痛や顎運動障害が惹起された病態である。また内在性外傷の原因の一つとして、重度の不正咬合やパラファンクションによる顎関節に加わる機械的ストレスが報告されている。これらの刺激により顎関節周囲組織中の細胞が傷害されネクロシスを起こすと、ヌクレオチドをはじめとした damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) が細胞外に漏出する。この DAMPS は、周囲に存在する細胞の膜にある種々の受容体を介してインフラマソームを活性化し、顎関節周囲組織に非感染性炎症反応を惹起するものと予測される。そこでまず、マウス顎関節由来の線維芽細胞様滑膜細胞 (fibroblast-like synoviocytes: FLSs) が、インフラマソーム依存的に非感染性炎症反応を引き起こす原因細胞となりうるかについて調査した。具体的には、インフラマソーム依存的にプロセッシングを受けて活性化する炎症性サイトカイン interleukin-1 beta (IL-1 β) の転写活性を促進すると知られている lipopolysaccharide (LPS) により FLS 細胞を刺激したが、IL-1 β 発現の上昇を認めなかった。そのため、FLS 細胞は、インフラマソーム依存的に非感染性炎症反応を引き起こす原因細胞となる可能性は低いと考えた。そこで新たな研究の方向性として、DAMPs が FLS 細胞自身に為害性を及ぼすかどうかについて調査した。