

化能力を持つ MSC 株 SG2, SG3 ならびに SG5 を得た。興味深いことに, SG2 は TGF- $\beta$ 1 に応答性が強く, SG3 は BMP-2 に対する応答性が強いが, SG5 はこれらのいずれの刺激に対しても応答性が低かった。今後, これらの MSC 株を用いて *in vivo* 移植実験を行い, GFP の緑色蛍光でトレースすることで体内動態を確認しつつ, TGF- $\beta$  や BMP が各細胞の増殖や分化にどのように影響するかについて調査を進める予定である。また現在, 各 MSC 株特異的にその増殖・分化能力を調節するシグナル伝達系の存在についてより詳細に明らかにすべく, 各 MSC 株の成長因子 / 受容体の発現頻度差についてプライマーアレイ等で網羅的に解析中である。

## 2. ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-4 細胞における浸潤能発現機構の解明

○樋野 雅文, 客本 齊子\*, 帖佐 直幸\*, 水城 春美, 石崎 明\*, 加茂 政晴\*

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, 生化学講座細胞情報科学分野\*

背景・目的: 近年, 癌の浸潤および転移には, 上皮間葉転換 (EMT) が関与することが数多く報告されている。一方, 口腔領域において扁平上皮癌は最も発生頻度の高い癌である。我々はこれまでにヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-4 細胞において transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 刺激が転写関連因子 Slug を介し EMT を誘導し高い遊走能を獲得することを報告した (J Biochem, 153:303, 2013)。そこで本研究は HSC-4 細胞の EMT における浸潤能に関わる因子について解析を行い, その浸潤のメカニズムについて検討する。

方法: 浸潤に関する遺伝子とタンパク質の発現は quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR) およびウェスタンブロットによりそれぞれ解析した。また, 浸潤能の解析 (invasion assay) には細胞を invasion chamber (Matrigel コーティング) 上で 24 時間培養した後, culture insert 下面に浸潤した細胞をマイヤーヘマトキシリン溶液で染色することで観察した。プロテオーム

解析には, SDS-PAGE によりタンパク質を分離した後, LC-MS/MS により同定した。

結果: TGF- $\beta$ 1 は, HSC-4 細胞の浸潤能を亢進した。この浸潤能に関与する因子を検索するために, 培養上清をプロテオーム解析したところ, TGF- $\beta$ 1 刺激により MMP-10 の発現が上昇することが判明した。加えて, この TGF- $\beta$ 1 刺激による MMP-10 の発現量の増大は, qRT-PCR を用いても確認された。次に, siRNA を用いて MMP-10 の発現をノックダウンし同様に invasion assay を行ったところ, TGF- $\beta$ 1 刺激細胞の浸潤能は抑制された。さらに, EMT に重要な働きをする Slug と MMP-10 の発現との関連性について検討した。siRNA を用いて Slug をノックダウンし MMP-10 の発現量を調べたところ, TGF- $\beta$ 1 の刺激にも関わらず MMP-10 の有意な減少を示した。一方, MMP-10 の発現に重要な働きをする Wnt タンパク質の発現について調べたところ, TGF- $\beta$ 1 刺激により Wnt5b の発現が増大した。興味深いことに, Wnt 経路をそのシグナル伝達分子 Dvl の阻害剤などで不活性化すると, TGF- $\beta$ 1 刺激により誘導された MMP-10 の発現は抑制された。さらに, Wnt5b の発現は Slug に依存することが siRNA を用いて示された。

考察及びまとめ: TGF- $\beta$ 1 処理により MMP-10 の発現は増大し, HSC-4 細胞の浸潤能を上昇させることを見出した。また, この TGF- $\beta$ 1 による MMP-10 の発現誘導は, Slug を介した Wnt5b の発現誘導の後に, この Wnt5b がオートクラインあるいはパラクライン的にこの細胞に作用して起こるものであることが示唆された。

## 3. 口腔軟組織における Bisphosphonate 製剤の作用に着目した BRONJ 発症機序の探究

○小松 祐子, 衣斐 美歩\*, 星 秀樹, 帖佐 直幸\*\*, 客本 齊子\*\*, 加茂 政晴\*\*, 杉山 芳樹, 石崎 明\*\*

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, 医歯薬総合研究所腫瘍生物学部門\*, 生化学講座細胞情報科学分野\*\*

背景・目的：近年、Bisphosphonate (BP) 製剤の投与歴のある患者が侵襲的歯科治療を契機に顎骨壊死 (Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the jaw ; BRONJ) を生じたとの報告が相次いでいる (米田俊之他：ビスフォスフォネート関連顎骨壊死に対するポジションペーパー, 日本骨代謝学会他)。BRONJ の臨床所見のひとつである骨壊死の発症機序は未だ不明で、有効な治療法も確立されていない。

我々は抜歯後の創傷治癒において血球細胞の遊走を促すとともに、創閉鎖に働く歯肉線維芽細胞に着目した。これまで、歯肉線維芽細胞を含む間葉系の細胞においては、BP 製剤の投与によって増殖能が抑制されたとの報告がある (Matthew J *et al*, Arch Oral Biol, 2011)。臨床適応時の最高血中濃度を上回る薬剤濃度での報告であり、その増殖抑制の機序は解明されていない。

そこで、本実験では最高血中濃度において、歯肉線維芽細胞への BP 製剤の影響を分子レベルで明らかにすることで、BRONJ 発症の一因を見つけることを目的とした。

方法：まず、初代培養したヒト歯肉線維芽細胞を限界希釈法により Single Cell-Derived Culture (SCDC) 細胞として単離・培養した。獲得した SCDC 細胞を形態ごとに分類し、実験に使用する細胞を選別した。次に、BP 製剤への反応性を探索するため、BP 製剤存在下で各 SCDC 細胞の増殖実験を行った。本実験には主に抗悪性腫瘍薬として臨床応用され、BRONJ 発症のリスクが高い BP 製剤のひとつであるゾレドロン酸水和物 (ゾメタ<sup>®</sup>) を用い、薬剤濃度はヒトの最高血中濃度 (Cmax) を基準とした。結果：1. 24 種類の SCDC 細胞を単離・培養し、実験に使用する 2 種類の細胞 (SCDC-1, 2) を獲得した。2. SCDC-2 に BP 製剤を 48 時間作用させた際に、Cmax での細胞増殖抑制を認めた。考察及びまとめ：本実験より、歯肉線維芽細胞には BP 製剤に強い反応性を示す細胞が存在し、このことが BRONJ 発症に関与している可能性が考えられた。今後、BP により引き起こされた増殖抑制の、分子レベルでの作用点を探っていくたい。将来的には口腔由来細胞を起点とした BRONJ 発症機序が解明されることで、創部細胞を標的とした新たな治療法の開発

に飛躍することが期待される。

#### 4. スンクス口蓋のリンパ管構築

○畠山 慧, 三浦 廣行, 藤村 朗\*, 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, 解剖学講座機能形態学  
分野\*

背景・目的：口腔領域において、歯周疾患のような炎症性疾患や口腔癌に対する薬剤投与経路、さらに組織からの排導路の観点からリンパ管の機能は無視できない。しかし、脈管系のうち血管系については既に様々な観点と方法で報告が行われているが、リンパ管系についての報告は少ない。さらに、それらの多くは齧歯類を用いたものである。本研究では、有胎盤哺乳類の原型を保持していると言われているスンクス (*Suncus murinus*) を試料として用いる。スンクス口蓋粘膜下及び骨膜上のリンパ管の三次元的な構築を作成し、明確にする。そして、口蓋のリンパ管構築を検索することにより、薬剤の投与部位および経路の解明の基礎データとすることを目的とする。

方法：本研究には成体のスンクスを用いる。頸椎脱臼により屠殺後、頭頸部を採取する。組織構造精査のため、10%ホルマリンで固定、プランクリクロで脱灰し、アルコール上昇系列にて脱水、キシレンで透徹後、パラフィン包埋する。滑走式マイクロームを用いて前額方向および矢状方向の 5 $\mu$ m 厚のパラフィン切片を作製する。リンパ管構築の検索のため、同じく摘出した試料を液体窒素にて冷却されたヘキサン液中で 5%カルボキシメチルセルロースにて凍結包埋する。クリオスタットを用いて Film transfer 法 (川本法) により前額方向および矢状方向の 10 $\mu$ m 厚の非脱灰凍結連続切片を作製する。パラフィン切片には HE 染色、凍結切片には酵素組織化学染色 (5'-Nucleotidase) を施し、パラフィン切片は光学顕微鏡にて観察、撮影する。凍結切片は同じく光学顕微鏡にて観察、撮影した後、コンピューター上で切片画像の軸合わせ、リンパ管の抽出を行い、三次元再構築像の作成を行う。