

2. 間葉系幹細胞が有する抗炎症作用ならびに骨芽細胞分化能は歯根膜線維芽細胞との細胞間接着によって増強される

○鈴木 啓太, 帖佐 直幸*, 澤田 俊輔**, 滝沢 尚希, 石崎 明*, 八重柏 隆

歯科保存学講座歯周療法学分野, 生化学講座細胞情報科学分野*, 関西医科大学耳鼻咽喉科頭頸部外科学講座歯科・口腔外科**

背景・目的: 組織破壊を伴う重篤な炎症は, 主として局所に浸潤したマクロファージから分泌される IL-1 β , IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインの作用による過剰な炎症反応が要因とされている。歯周組織の炎症も例外ではなく, 我々はこれまでに歯肉線維芽細胞への種々の炎症性サイトカインによる相乗的作用や細胞外マトリックス分解酵素の発現促進効果を報告している。一方, 組織破壊を伴う炎症の治療には, 結合組織構成細胞への分化能を有する間葉系幹細胞 (MSC) が関与する。MSC はケモカインの作用により炎症部位に集積し, 抗炎症作用や組織修復に働くと考えられる。しかしながら, 線維芽細胞などの歯周組織構成細胞が MSC の抗炎症作用や組織修復能力に与える影響は明らかではない。本研究では歯根膜線維芽細胞 (PDL-F) と MSC の相互作用を解明し, 歯周炎症部位における MSC の役割を検討した。

方法: 本研究では, 我々が樹立したラット PDL-F (SCDC2) 及び GFP マウス骨髄由来 MSC 株の SG2 を使用した。SCDC2 を IL-1 β , IL-6, TNF- α で処理し, ケモカイン MCP-1 と SDF-1 α の発現を調査した。発現誘導が確認された MCP-1 については SG2 と SCDC2 における細胞遊走促進効果を検討した。さらに, SG2 と SCDC2 の接触共培養系と, Trans-well system を用いた非接触共培養系における SG2 の炎症関連因子の発現を調査するとともに, SCDC2 との共培養における SG2 の性状について MSC マーカーの発現, 骨芽細胞分化能, 細胞増殖能, ならびに細胞遊走能について比較検討した。

結果: SCDC2 を IL-1 β , IL-6, TNF- α で処理したところ, MCP-1 の mRNA 発現及びタンバ

ク分泌が促進した。MCP-1 は SG2 の細胞遊走能を促進する一方, SCDC2 の遊走能は促進しなかった。また接触共培養系では, SG2 における抗炎症性サイトカイン IL-10 ならびに TGF- β の発現が促進されたが, 炎症性サイトカインの IL-6 の発現は抑制された。一方で非接触共培養系では, IL-6 の発現抑制及び IL-10, TGF- β の発現促進は認められなかった。さらに共培養後の SG2 の性状においては, MSC マーカー Sca-1, CD44, CD90 の発現増強ならびに細胞遊走能・骨芽細胞分化能が促進され, 細胞増殖能は抑制された。

考察及びまとめ: 炎症性サイトカイン刺激によって PDL-F から分泌されたケモカイン MCP-1 は, MSC にパラクリンに作用することで炎症部位への遊走を促進する。また, 炎症部位にホーミングした MSC は PDL-F との細胞間接着を介した相互作用により炎症性サイトカインの分泌を抑制し, 抗炎症性サイトカインの分泌を促進する。さらに, この相互作用により MSC の遊走活性の促進ならびに細胞増殖能の抑制が認められ, また, 骨形成能が促進されることが明らかになった。すなわち, 歯周組織炎症部位に集積した MSC は周囲の歯周組織構成細胞と相互作用することで, 抗炎症作用及び骨形成能力が増強されることが示された。これらの機能増強は, 歯槽骨吸収を伴った歯周炎の治療, すなわち炎症の終息ならびに歯槽骨再生に関与する可能性が示唆される。

3. 歯周病原細菌の上皮バリア突破能

○高橋 晋平, 下山 佑*, 石河 太知*, 佐々木大輔, 木村 重信**, 八重柏 隆

歯科保存学講座歯周療法学分野, 微生物学講座分子微生物学分野*, 関西女子短期大学歯科衛生学科**

背景・目的: 歯周病原細菌が上皮バリアを通過し歯周炎患者の病巣歯肉組織内に侵入することは明らかにされているが, その詳細な侵入機構については未だ不明な点が残されている。歯周病原細菌の組織内侵入に関わる上皮バリア突破経路は, 細胞内を通過する transcellular ルートと, 細胞間隙を通過する paracellular ルートが

報告されている。しかし、歯周病原細菌により保有するビルレンス因子が異なることから、菌種による上皮バリア突破能、突破経路が異なる可能性が推測されるものの未だ明らかではない。本研究では、歯周病原細菌の組織内侵入機構の詳細を明らかにすることを目的として、重度歯周炎に関連の強い 'red complex species' 3 菌種および侵襲性歯周炎との関連があるとされる *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の上皮バリア突破能、突破経路について検討を行った。

方法：歯周病原細菌としては *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株、*Tannerella forsythia* ATCC 43037 株、*Treponema denticola* ATCC 33520 株 および *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 株を用いた。これら歯周病原細菌の上皮バリア突破能、突破経路については、株化歯肉上皮細胞 (Ca9-22) を用いた double-chamber culture 法を用いて検討した。すなわち、pore-size 3 μ m の上部チャンバーに Ca9-22 を播種し、3 日間培養後、抗菌薬を含まない無血清培地に交換した。歯周病原細菌の上皮バリア突破能は、上部チャンバーに各歯周病原細菌の菌液 (OD₆₀₀=0.2) を添加し、継時的に下部チャンバーに通過した菌量を菌種特異的 real-time PCR 法による定量解析から検討した。Paracellular ルートの上皮バリア突破能については、FITC-dextran の細胞間隙通過量から検討した。

結果：下部チャンバーへの通過菌数から *P. gingivalis*、*T. forsythia* および *A. actinomycetemcomitans* は培養 6 時間で上皮バリアを突破することが明らかになったが、*Trep. denticola* は有意な上皮バリア突破能を認めなかった。FITC-dextran の細胞間隙通過量からは、*P. gingivalis* のみ有意な上皮細胞間隙の破壊を認めた。

考察及びまとめ：*P. gingivalis* は上皮バリア突破能を有し、その突破経路としては transcellular, paracellular の両ルートを通じて突破することが示唆された。また、*T. forsythia*、*A. actinomycetemcomitans* も *P. gingivalis* 同様に上皮バリア突破能を有しているものの、これら 2 菌種の上皮バリア突破経路は transcellular ルートのみであることが明らかとなった。一方、*Trep. denticola* は他の 3 菌種と

比較して単独では上皮バリア突破能が弱いことが示唆された。以上のことから、歯周病原細菌により上皮バリア突破能、および突破経路が異なることが強く示唆された。

4. ヒト口腔扁平上皮癌細胞において TGF- β 1 は BMP-2 により誘導された間葉上皮転換を Smad1/5/9 経路の抑制を介して制御する

○千葉 高大、山田 浩之、石崎 明^{*}、
武田 泰典^{**}

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^{*}、病理学
講座病態解析学分野^{**}

背景・目的：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。癌細胞の転移において、上皮間葉転換 (EMT) は重要な働きを示すことが知られている。Transforming growth factor- β (TGF- β 1) がヒト口腔扁平上皮癌 (hOSCC) 細胞の EMT を促進することをこれまでに見出している。一方、癌細胞の転移においては、EMT により移動が可能になった後、転移先での癌細胞の定着と再増殖が重要であり、再び上皮様細胞の性質を獲得する間葉上皮転換 (MET) の関与が考えられている。Bone morphogenetic protein (BMP) は、MET に関与することが示唆されているが、その機構は明らかではない。さらに、hOSCC における BMP に対する応答の研究は少なく、またその作用も明らかとされていない。そこで、BMP-2 及び TGF- β 1 が hOSCC の EMT/MET 関連遺伝子の発現に対してどのように影響するのかについて研究を行った。

方法：hOSCC 細胞として、HSC-2、HSC-3、HSC-4 及び SAS 細胞株を用いた。BMP-2 と TGF- β 1 の応答に関与する遺伝子とタンパク質は qRT-PCR 及びウエスタンブロット法により解析した。遊走能の解析は、TGF- β 1 あるいは BMP-2 処理した HSC-4 細胞をチャンバーの上部に播種し、24 時間後にチャンバーを通過した細胞を Mayer's hematoxylin 溶液で染色することで観察した。細胞増殖能は alamar Blue 法により調べた。

結果：各 hOSCC において BMP-2 に応答する