

細胞の検索を Smad6 及び標的遺伝子 ID1 の発現、及び Smad1/5/9 のリン酸化により調べた。その結果、HSC-4 細胞のみで有意な応答が見られたので、以下では HSC-4 細胞を用いた。BMP-2 は、間葉系マーカーである N-cadherin の発現を抑制するのに対し、上皮系マーカーの cytokeratin 9 の発現を上昇させた。一方、両サイトカインで同時刺激した場合には、BMP-2 による上皮系マーカー発現上昇及び間葉系マーカーの発現抑制が、TGF- β 1 により濃度依存的に打ち消された。また BMP による EMT 関連転写因子 Snail の発現抑制及び MET 関連因子である ID1 の発現増大も同様に TGF- β 1 により打ち消された。さらに TGF- β 1 は、BMP シグナル経路の因子である Smad1/9 の発現及びそのリン酸化を抑制した。細胞機能に対しては、BMP-2 は TGF- β 1 とは逆に、HSC-4 細胞の細胞遊走能には影響を与えないが細胞増殖を増大させた。

考察及びまとめ：HSC-4 細胞は BMP-2 と TGF- β 1 の両者に応答する hOSCC 細胞として初めて見出した。さらに、BMP-2 は、TGF- β 1 と異なり、上皮系マーカーの発現を促進させ、間葉系マーカーの発現を抑制したことから、EMT ではなくむしろ MET を誘導することが示唆された。この BMP-2 の作用が TGF- β 1 により濃度依存的に阻害されること、また TGF- β 1 は BMP-Smad1/5/9 シグナルを減弱させたことから、TGF- β 1 は BMP-2 による MET を抑制することが示された。BMP-2 が遊走能を低下させ、且つ細胞増殖を増大させたことは、転移先での癌細胞のコロニー形成を BMP-2 が誘導する可能性を示すものと考えられる。この研究を発展させることにより、TGF- β 1 と BMP-2 シグナル経路のクロストークが明確になり、EMT/MET の機構が理解されれば、口腔癌治療のための浸潤・転移に関わる新たな標的分子が見出される可能性は高いと考えられる。

5. 血小板活性化能を有するペプチドで修飾したチタン表面は上皮細胞の基底膜を介した接着を誘導する

○菅原 志帆, 近藤 尚知, 前野 雅彦*, 永井 成美*, 永井 雅純*

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：天然歯では、接合上皮細胞が基底膜を介して歯面に結合する強固な上皮封鎖が存在する。しかし、現行のインプラントアバットメントでは上皮細胞の基底膜は結合組織側を向いており、天然歯のような強固な封鎖は認められない。したがって、アバットメント周囲の脆弱な上皮封鎖は、細菌の侵入増殖を許し、インプラント周囲炎の一因となる。一方、活性化された血小板は、上皮細胞の遊走、付着および増殖活性因子の分泌によって上皮の再生を促すことが報告されている。本研究では、血小板活性化能を有するペプチドを応用し、チタン表面に基底膜を介した上皮細胞の接着を誘導することを目的とした。

方法：

1. 血小板活性化能を有するペプチドのチタン表面への固定

血小板活性化能を有するペプチド (protease activated receptor-4 activating peptide: PAR4-AP) をホスホン酸リンカーを介してチタン (0.05mm 厚) 表面に固定した。

2. チタン表面上で活性化された血小板が分泌する上皮誘導因子の分析

PAR4-AP を固定したチタン表面上に platelet-rich plasma を播種し、血小板の凝集を経時的に total ATP レベルで測定した。1 時間の培養後、走査型電子顕微鏡 (SEM) で血小板凝集塊の形成を観察し、ELISA にて活性化された血小板から分泌された上皮誘導因子 (EGF, IGF-I, TGF- β , VEGF) を分析した。

3. チタン表面に対する上皮細胞接着の分析

不死化ヒト歯肉上皮細胞 OBA9 を、血小板凝集塊を形成したチタン表面上に播種し、DNA 染色を用いて、接着細胞数を経時的に測定した。48 時間の培養後、SEM にて上皮細胞

の超微細構造を観察し、共焦点顕微鏡にて基底膜の接着タンパク質である Laminin-5 およびタイトジャンクションの接着タンパク質である ZO-1 を免疫細胞化学的に観察した。さらに ELISA にて、培養上清中に分泌された抗菌ペプチドである LL37、および血小板凝集塊分解能を持つ線溶系プロテアーゼである tPA, uPA およびプラスミンを測定した。また、Laminin-5 と DAPI 陽性の核面積を Fiji (Image Processing Program) にて分析した。得られたデータは、t 検定または一元配置分散分析および Tukey の検定によって統計学的分析を行った。

結果：血小板の凝集は PAR4-AP 処理群で急速に進行し、SEM 像で密に凝集した血小板凝集塊が観察された。また、各種上皮誘導因子の有意な増加が確認された。接着細胞数は、PAR4-AP 処理群において経時的な増加が認められ、SEM 像にてチタン表面上への上皮細胞の接着が確認された。免疫細胞化学染色により、Laminin-5 陽性の伸展した基底膜および ZO-1 陽性のタイトジャンクションで連結している上皮シートが観察された。さらに、培養上清中の LL37 および tPA, uPA, プラスミンの有意な増加が確認された。未処理群では、チタン表面上に付着している上皮細胞は小さくラウンドアップしていたのに対し、PAR4-AP 処理群では Laminin-5 陽性面積が有意に増加し、チタン表面上への伸展した基底膜での接着を示した。

考察及びまとめ：血小板活性化能を有するペプチドの応用によって、タイトジャンクションで連結している上皮細胞が、基底膜を介してチタン表面へ接着可能であることが明らかとなった。PAR4-AP 処理群の培養上清中には高濃度の tPA, uPA およびプラスミンが検出されており、これは上皮細胞が血小板凝集塊を分解してチタン表面に接着したことを示唆している。また PAR4-AP 処理群より LL37 の分泌が確認されたことから、抗菌活性向上への寄与が期待される。血小板活性化能を有するペプチドの修飾をチタンカスタムアバットメントに施すことが可能となれば、基底膜を介した細胞接着による抗菌性の獲得が可能と考えられ、インプラントの長期安定への貢献が期待できる。

6. 骨置換性バイオマテリアルを用いた骨再生の試み

○池田 功司, 近藤 尚知, 平 雅之*, 鬼原 英道

補綴・インプラント学講座補綴・インプラント学分野, 医療工学講座*

背景・目的：インプラント治療による機能回復は、無菌顎患者等にとってクオリティ・オブ・ライフ向上に繋がる。しかし、埋入可能な骨量がない場合、インプラント治療が容易には適用出来ない。本研究の目的は、プレス加工したナノ・アパタイト/コラーゲン複合体を新規に自家作製し、*in vitro* 細胞培養と *in vivo* 動物実験の両面から骨伝導性を調べ、新規骨補填材としての有用性を評価することである。

方法：複合体調製：ナノサイズのアパタイトには (40 nm 径) (nHAP) を用いた。nHAP 粒子を中和した I 型コラーゲン (Col) に混練し、-80°C 3 時間の予備凍結後、12 時間凍結乾燥した。次に、ニュートンプレス装置 (3ton, 2 分) で加圧後、打ち抜きによって直径 6mm × 厚さ 1mm の試料 (P-nHAP/Col) とした。対照として Col のみの加圧試料も製作した (P-Col)。全試料にはエチレンオキシドガス滅菌を施した。

1. 細胞培養：両試料の上に骨芽細胞様細胞 SaOS-2 を播種し、5%CO₂/95% 空気、37°C 環境下で培養した。1, 2, 3, 4 週後、Total RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法による骨系分化マーカーの遺伝子発現解析を行った。また、1 週、4 週培養後の SaOS-2 の形態変化を走査型電子顕微鏡で観察した。

2. 動物実験：10 週齢の雄性 Wistar ラットの頭蓋骨に対し直径 6 mm のトレフィンバーを用いて骨欠損部を形成し、両試料を埋入した。術後 3 日、4 週および 8 週経過後、マイクロ CT によって骨欠損部における骨形成の程度を CT 不透過度より評価した。8 週飼育ラットについては、蛍光二重染色 (5 週での TC と術後 7 週の CL) を施し、安楽死後、欠損部を含むラット頭部をダイヤモンドバンドでブロック状に切り出し Villanueva 染色後、非脱灰薄切標本とし、蛍光顕微鏡によって組織像観察を行った。