

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。

【方法】

細胞膜上のプリン作動性受容体(P2Y受容体)に対するリガンドとして働くADP、UTPならびにUDPをFLS細胞に投与し、投与後24時間での細胞代謝活性をalarmarBlue[®]法により測定した。

【結果】

P2Y受容体のリガンドとしてのADP(100 μ M)、UTP(100 μ M)ならびにUDP(100 μ M)刺激により有意な細胞代謝活性の低下が認められた。とくにUDP(100 μ M)刺激では、FLS細胞における細胞代謝活性が最も強く抑制された。

【考察及びまとめ】

P2Y受容体リガンド(ADP、UTPならびにUDP)がFLS細胞の代謝活性を低下させたことから、P2Y受容体を介したシグナルはFLS細胞の代謝活性を低下させる可能性が示唆された。また、これまでに我々はFLS細胞が、一般的な線維芽細胞として知られるNIH3T3細胞や、各種P2Y受容体を幅広く発現することが知られる間葉系幹細胞と比較して、P2Y1、P2Y4、P2Y12、P2Y13ならびにP2Y14受容体を有意に高発現していることを明らかとしている。これらのうち、ADPに結合する受容体はP2Y1、P2Y12ならびにP2Y13受容体であること、UTPに結合する受容体はP2Y4受容体であること、またUDPに結合する受容体は

P2Y14受容体であることが一般的に明らかとされているので、FLS細胞における細胞外ヌクレオチドによる代謝活性抑制効果は、P2Y1、P2Y4、P2Y12、P2Y13ならびにP2Y14受容体を介した刺激であることが示唆された。

現在、FLS細胞の代謝活性を最も強く抑制するUDP刺激に着目し、UDPが作用する受容体がP2Y14であることを特定するため、P2Y14のUDP以外のアゴニストが同様の効果を有するかどうか、あるいはP2Y14におけるUDPに対するアンタゴニストがこの代謝活性抑制効果を打ち消すかどうかについて調査を進めている。また興味深いことに、UDP結合後のP2Y14はアデニル酸シクラーゼの活性を抑制してcAMPを減少させprotein kinase A(PKA)の活性を低下させることが知られており、今回明らかとされたUDPによるFLS細胞の代謝抑制がPKA活性の低下によるものであるかどうかについても調査を進めている。一方、FLS細胞ではP2X受容体の発現が認められることから、P2X受容体リガンドであるATPがこの細胞の代謝活性にどのように影響するかについても調査を進めている。

本研究の実施により、DAMPSとしての細胞外ヌクレオチドによるFLS細胞の代謝活性抑制効果発現の根底にある分子メカニズムを明らかとし、顎関節痛障害の治療のためのターゲット分子を明らかとしたい。