

氏名 ^{みなみ}南 ^{じゅん}順 ^こ子
学位の種類 博士(歯学)
学位授与番号 岩医大院歯博第221号
学位授与の日付 平成18年3月25日
学位論文題目 コラーゲンスポンジを用いた三次元培養におけるヒト顎下腺由来腺癌細胞株の遺伝子発現

論文内容の要旨

I. 研究目的

再生医学において細胞、細胞増殖の足場および増殖因子が重要な要素であり、これらを組み合わせて比較的単純な組織構造と生理的機能の再現が可能となってきた。しかしながら、本来異物である生体材料と細胞との相互作用については、まだ不明な点が残っている。そこで本研究ではコラーゲンスポンジを足場としてヒト顎下腺由来腺癌細胞株(HSG)を *in vitro* で三次元培養した際の細胞の応答性を分子レベルで検索することを目的とした。

II. 研究方法

HSG細胞をコラーゲンスポンジ(COL-S, $\phi 15\text{mm} \times 2\text{mm}$)に播種し、37°Cで20時間振とう後、1, 3, 6日間静置状態で三次元培養を行った。対照としてポリスチレンディッシュ(PS)およびコラーゲンコートディッシュ(COL-C)での単層培養を行った。形態観察を行った後、二次元電気泳動法によりCOL-S三次元培養と単層培養におけるタンパク質発現パターンを比較した。さらに各細胞のサイトケラチン(CK)のmRNAおよびタンパク質発現についてRT-PCR法、ウェスタンブロット法により検討した。

III. 研究成績

1. HSG細胞は、単層培養では接着、伸展するのに対し、COL-S培養では球形を呈した。また、この形態の変化は振とうによるものではないことが確認された。
2. 二次元電気泳動法によるタンパク質発現パターンを単層培養とCOL-S培養間で比較すると、全体としての発現パターンはほぼ同じで顕著な差は認められなかった。
3. 細胞骨格に関係するタンパク質であるCKのmRNA発現をRT-PCR法で調べた。単層培養に比べCOL-S培養では通常HSG細胞で発現しているCK8およびCK18の発現量が減少した。また、粘膜上皮や扁平上皮化生に特有なCK13の発現が単層培養ではみられなかったのに対し、COL-S培養後では認められた。一方、CK7およびCK17については発現量に変化はみられなかった。
4. ウェスタンブロット法を用いてCKのタンパク質発現を調べたところ、COL-S培養後のCK8およびCK18はmRNA発現と同様に減少が認められたが、CK13の発現は確認できなかった。
5. CKの発現変化のメカニズムを探るために細胞内シグナル伝達系の関与を調べた。その結果、癌転移抑制遺伝子Nm23-H1のmRNA発現はCOL-S培養後に減少した。

IV. 考察及び結論

コラーゲンの単層培養ではCOL-S三次元培養のような形態やCK発現パターンの変化が認められないことから、コラーゲンがスポンジという三次元的空間構造をとることにより、細胞の形質の変化に関係する遺伝子の発現を制御していることが示唆された。さらにNm23は、ERK/MAPKシグナル伝達系を介して細胞の増殖や分化を制御することから、この系がCOL-S三次元培養後の細胞応答性に関与していることが示され、CKの発現変化との関連性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 佐藤 詔子 (口腔生化学講座)

副査 教授 木村 重信 (口腔微生物講座)

副査 教授 佐藤 方信 (口腔病理学講座)

近年、生体の種々の組織を再生する研究が進んできており、その際には増殖・分化のポテンシャルの高い細胞と足場を与えることが必要である。しかし、足場材料の中で細胞が増殖・分化していく過程において、細胞がどのような応答すなわち遺伝子発現を行うかに関しては未だ不明の点が多い。本論文はヒト顎下腺由来腺癌細胞 (HSG) をコラーゲンスポンジと培養した際の細胞応答性を検討した。

足場としての材料は重要であり、本研究ではコラーゲンスポンジを用いた。また、細胞応答性分子として細胞の骨格形成、形状維持に関わる細胞骨格系タンパク質、とくにサイトケラチン (CK) について検討した。CK はタイプ I と II がペアのヘテロダイマーで存在しているが、その中でタイプ II の CK 7, CK 8 とタイプ I の CK 17, CK 18 について RT-PCR 法による mRNA 発現ならびにウェスタンブロッティング法によるタンパク質発現を調べた。また、CK の分子種は細胞により発現が異なることから、粘膜上皮細胞に特有のタイプ I の CK 13 について検討した。さらに、増殖・分化のシグナル系への関与や細胞接着タンパク質複合体との相互作用が知られている転移抑制遺伝子 Nm23 についても mRNA 発現を調べた。その結果、CK 8 と CK 18 は単層培養に比べ、コラーゲンスポンジ培養では mRNA ならびにタンパク質発現がともに減少傾向を示した。CK 13 は、コラーゲンスポンジ培養で mRNA を検出したが、タンパク質の発現は認められなかった。また、Nm23 の mRNA レベルはコラーゲンスポンジ培養で減少した。

以上のことから、足場として機能をもつコラーゲンスポンジの三次元的構造が細胞の骨格に関わる遺伝子発現に深く関与することが示唆された。

本研究で得られた知見は再生研究を進める上で重要な生体側の微小環境における細胞の応答性を把握する手がかりと成りうることから、学位論文に値すると認められる。今後の発展を期待するところが大きい。

試験・試問の結果の要旨

本論文の内容ならびに関連事項について試問したところ、的確かつ十分な解答を得た。また、生化学、口腔生化学全般に対する知識を十分に有し、学位授与に値する学識と研究指導能力を備えていることを認めた。