

から角化嚢胞性歯原性腫瘍および含歯性嚢胞の病理診断が可能であった。歯根嚢胞では摘出材料の病理組織診断で嚢胞壁に慢性炎症を伴っていても、内容液中には好中球が目立つなど所見が異なる場合があった。

結論：顎関節洗浄液の CBTA 標本を用いた病理検査は、顎関節症患者に対するより詳細な診断や関節内部の病態把握に有用であることが示唆された。また、嚢胞内容液では全ての嚢胞性疾患の診断に有効ではないものの、症例によっては生検時の外科的侵襲を軽減する病理診断法となることが示唆された。

本研究の内容は、第 31 回日本顎咬合学会学術大会（特別講演，2013 年 6 月）、第 24 回日本臨床口腔病理学会学術大会（一般演題，2013 年 8 月）、第 25 回日本臨床口腔病理学会学術大会（一般演題，2014 年 8 月）、第 40 回岩手医科大学歯学会（一般演題，2014 年 12 月）、Diag Cytopathol.（原著論文，42 巻，2014 年）で報告した。

## 2. ファイブロサイト（線維細胞 fibrocytes） に注目した顎関節病変発症機構の解明

○衣斐 美歩

### 分子細胞薬理学講座

顎関節部の疼痛や顎運動異常は食事や会話など日常生活にも大きく支障をきたす。顎関節・咀嚼筋の疾患あるいは障害の程度は症例によってさまざまであるが、重症症例では外科的処置の適応となることもある。従って早期に行うことのできる患者に大きな負担のかからない新規治療方法を探索していくことは重要である。

本研究では炎症に関与する細胞を治療標的の対象とし、そのなかで線維細胞（fibrocytes）と呼ばれる細胞に着目した。fibrocytes は CD45 陽性、CD34 陽性かつ I 型コラーゲン陽性の骨髄由来白血球系細胞であり（Bucala et al, 1994）、そのため線維芽細胞とマクロファージの両方の性質をもつことが報告されている（Reilkoff et al, Nature. Rev. Immunol, 2011）。これまでに肺や腎臓など比較的大きな組織において疾患の原因細胞のひとつとして報告されている（Phillips et al, 2004, and Sakai et al,

2006）が、顎関節では報告がない。そこで我々は fibrocytes が血行性に顎関節に到達した際の顎関節周囲組織と fibrocytes の相互作用について検討を行った。

まず初めに、fibrocytes の単離・培養をこれまで報告されている方法（骨髄、末梢血または脾臓から採取する方法）を参考として試みた。成体マウス（8 週齢から 12 週齢）より心採血、脾臓摘出または骨髄を採取し Ficoll-Paque PREMIUM (GEヘルスケア・ジャパン株式会社) を加えて遠心力により密度勾配媒体中を沈降させる方法で単核細胞を分離した。その後培養を行い fibrocytes の単離に努めたが、本研究期間中に必要十分量の純度の高い fibrocytes を単離・培養することができなかったため、代替としてマウス単球/マクロファージ系細胞 (RAW264.7 cells) を使用し以後実験を行った。in vitro 系での解析を行うためマウス顎関節周囲組織を採取し outgrowth 法にて顎関節周囲組織由来細胞 (TMJSCs) を獲得した。TMJSCs は他の報告と同様に I 型コラーゲンやビメンチンの発現量が高く細胞形態からも線維芽細胞様の性質を有していた。この細胞に代表的な炎症性サイトカインである IL-1beta を添加し顎関節に炎症が起こった場合の TMJSCs と RAW264.7 cells との関係について観察した。その結果、IL-1beta 刺激を行った TMJSCs 培養上清中への RAW264.7 cells の遊走能が促進された。また単球/マクロファージ系細胞が炎症部位に到達してからの相互作用に着目したところ、TMJSCs に炎症性刺激を加えると TMJSCs に接着する RAW264.7 cells の数が増えることもわかった。さらに TMJSCs と RAW264.7 cells を一定期間直接共培養すると培養上清中の monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の産生量が間接的共培養の場合と比較して増加することが明らかとなった。従って顎関節での炎症時、顎関節周囲組織細胞は単球/マクロファージを患部に遊走し、MCP-1 の産生を増大させるためさらに同細胞の浸潤を助長することでその後の慢性炎症への移行に関与していることが考えられた。本研究結果では、炎症性刺激から非常に初期の段階 (IL-1beta 添加から 4 時間後) に MCP-1 の mRNA 発現量が大きく増加しており 24 時間後では培養上清中のタンパク量も増加していた。

MCP-1 は fibrocytes を標的組織に遊走させる代表的な因子のひとつであることから、顎関節病変において fibrocytes が患部に遊走され炎症の増大または拡大に関与している可能性が示唆された。

<発表論文>

Komatsu Y., Ibi M., Chosa N., Kyakumoto S., Kamo M., Shibata T., Sugiyama Y., Ishisaki A., Zoledronic acid suppresses transforming growth factor- $\beta$ -induced fibrogenesis by human gingival fibroblasts possibly through the down-regulation of its type I receptor expression. *Int. J. Mol. Med.* 38(1):139-47, 2016 Jul.

Saito D., Kyakumoto S., Chosa N., Ibi M., Takahashi N., Okubo N., Sawada S., Ishisaki A., and Kamo M. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces epithelial-mesenchymal transition and integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-mediated cell migration of HSC-4 human squamous cell carcinoma cells through Slug. *J. Biochem.* 153(3), 303-315, 2013.

<学会発表>

衣斐美歩、堀江沙和、帖佐直幸、吉田茉莉子、加茂政晴、客本斉子、大塚正人、佐原資謹、藤村 朗、石崎 明、弘瀬雅教 顎関節部での炎症発症時における周囲組織細胞と血球系細胞との相互作用 第54回 日本薬学会東北支部大会(岩手医科大学 岩手) 2015年9月26日(ポスター発表)

衣斐美歩、堀江沙和、帖佐直幸、吉田茉莉子、加茂政晴、客本斉子、大塚正人、佐原資謹、藤村 朗、石崎 明、弘瀬雅教 顎関節炎症部位における顎関節周囲組織細胞と血球系細胞との相互作用 第658回 岩手医学会(岩手医科大学 岩手) 2015年5月20日(口頭発表)

衣斐美歩、堀江沙和、帖佐直幸、吉田茉莉子、加茂政晴、客本斉子、大塚正人、佐原資謹、藤村 朗、石崎 明 ファイブロサイトに注目した顎関節領域疾患発症機構の解明 第56回 歯科基礎医学学会学術大会・総会(福岡国際会議場 福岡) 2014年9月25-27日(ポスター発表)

大学院歯学研究科第3学年研究発表会

1. 血小板活性化による基底膜を介した歯肉上皮細胞のチタン表面への接着

○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, Harvard School of Dental Medicine\*

背景・目的: インプラント補綴の長期的安定のためには、骨とインプラント体のオッセオインテグレーションのみならず、アバットメントへの軟組織の機能的かつ強固な接着が重要と考えられている。しかしながら現状では、アバットメント上に基底膜を介した上皮接着は獲得されておらず、課題となっている。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を介し、上皮の再生を促すことが報告されている。本研究においては、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. チタン表面への血小板活性化機能を有するペプチドの固定

チタン片(10×10×0.05mm)表面にホスホン酸リンカーを介して血小板活性化能を持つペプチド(protease activated receptor-4 activating peptide: PAR4-AP)を固定した(処理群)。

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

ペプチドを固定したチタン表面上に platelet-rich plasma (PRP) を播種し、血小板の凝集動態を経時的に total ATP で測定した。1時間の培養後、platelet fibrin clot (PFC) 形成を走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて観察し、活性化された血小板から分泌された上皮誘導因子(EGF, IGF-1, TGF- $\beta$ , VEGF)をELISAで分析した。

3. チタン表面への上皮細胞接着の分析

不死化ヒト歯肉上皮細胞 OBA-9 をチタン-PFC 上に播種し、48時間培養した。接着細胞数を、DNA染色を用いて経時的に測定した。上皮細胞の超微細構造をSEMにて観察し、免疫組織化学染色により基底膜の接着タンパク質