

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  $\mu$  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 (OD<sub>600</sub>=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- $\beta$ 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<sup>\*</sup>、  
武田 泰典<sup>\*\*</sup>

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<sup>\*</sup>、病理学  
講座病態解析学分野<sup>\*\*</sup>

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- $\beta$  (TGF- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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

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- $\beta$  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- $\beta$  1 により打ち消された。さらに TGF- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  1 により濃度依存的に阻害されること、また TGF- $\beta$  1 は BMP-Smad1/5/9 シグナルを減弱させたことから、TGF- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$ , 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