

22. 歯周炎におけるfilm gelatinase法によるin situ gelatinase活性解析(一般講演)(東日本歯学会第15回学術大会(平成9年度総会))

| | |
|--------|---|
| 著者名(日) | 沓澤 政幸, 安彦 善裕, 加藤 賀史, 小鷲 悠典, 賀来 亨 |
| 雑誌名 | 東日本歯学雑誌 |
| 巻 | 16 |
| 号 | 1 |
| ページ | 158-159 |
| 発行年 | 1997-06-30 |
| URL | http://id.nii.ac.jp/1145/00008236/ |

た。

〈結論および考察〉 ヒト骨芽細胞において細胞外カルシウムの上昇は、細胞増殖作用促進に働き、細胞分化を促進する効果はほとんど認められないが、BMP-2, -4, -5のmRNAレベルを上昇させる作用は有する。これらの

結果は骨吸収後あるいは合成ハイドロキシアパタイト埋入後の骨形成促進作用にカルシウム濃度上昇が関与し、その作用のメカニズムの一つとして骨芽細胞におけるBMP-2, -4, -5の産生上昇が関与する可能性が示唆された。

21. 歯肉線維芽細胞に対するPorphyromonas gingivalis由来プロテアーゼの影響

○森 修二¹⁾, 大井戸真理¹⁾, 河合 治¹⁾,
加藤 幸紀¹⁾, 上原いずみ¹⁾, 澤田 圭子¹⁾,
王 宝禮²⁾, 小鷲 悠典¹⁾

(歯科保存学第一講座¹⁾, 大阪歯科大学 薬理学講座²⁾)

これまで我々は、歯周組織の主要な構成細胞である歯肉線維芽細胞が*Porphyromonas gingivalis* (*P g*) 由来LPS刺激によりInterleukin-6 (IL-6) を産生することを報告した(日歯保誌 38: 1280-1289, 1995)。さらに我々は、歯周病原性因子として重要と考えられる*P g* プロテアーゼがこのLPS刺激によるIL-6の産生を抑制し、それは*P g* プロテアーゼが歯肉線維芽細胞膜上のLPSレセプターと考えられるCD14分子を破壊するためであることを明らかにした(J Dent Res, 75: 274, 1996)。今回我々は、歯周病発症における*P g* プロテアーゼの病原性発現のメカニズムを解明するために、ヒト歯肉線維芽細胞の細胞間マトリックスであるフィブロネクチン、および接着分子であるICAM-1, VCAM-1, VLA-4の発現に対する*P g* プロテアーゼの影響について検討した。*P g* 381株培養上清からアセトン分画・ゲル濾過し、分子量44kDaのプロテアーゼを抽出精製した。無血清条件下にて*P g*

プロテアーゼでヒト歯肉線維芽細胞を刺激する実験系を確立した。細胞の形態観察は位相差顕微鏡により行い、生細胞数はMTT発色試薬を用い測定した。さらにフィブロネクチン量はELISA法にて測定した。線維芽細胞膜上のICAM-1, VCAM-1, VLA-4の発現は、フローサイトメーターを用い調べた。

その結果、*P g* プロテアーゼはフィブロネクチンを急速に破壊し、細胞を死に至らせた。しかし細胞死に至る過程において、ある一定期間細胞膜上の接着分子の発現が亢進した。この理由として、生存を維持しようとする細胞自身の防御機能が働いていることも考えられた。

P g プロテアーゼは、少なくとも感染初期においては、細胞膜上の生体防御に重要なレセプターや細胞接着分子を早期に破壊することによりその病原性を発現し、歯周病発症の関与している可能性が示唆された。

22. 歯周炎におけるfilm gelatinase法によるin situ gelatinase活性解析

沓澤 政幸¹⁾, 安彦 善裕²⁾, 加藤 賀史¹⁾,
小鷲 悠典¹⁾, 賀来 亨²⁾

(歯科保存学第一講座¹⁾, 口腔病理学講座²⁾)

細胞外matrix成分の分解酵素であるmatrix metalloproteinases (MMPs) の存在は、歯周疾患の進行に大きく関わっていると考えられる。特にgelatinase(MMP-2, MMP-9) は、歯周組織の構成成分であるtypeIV-collagen, laminin, fibronectinおよびproteoglycanなどを破壊する作用を有し、歯周疾患の進行において重要な役割を担っていると考えられる。歯周組織におけるgelatinaseの同定は、これまで主に生化学的にgelatinase

蛋白およびその活性化の程度の評価が行われ、組織学的には、その蛋白およびmRNAの発現部位についての検索が行われてきた。しかしながら、活性化の程度を組織切片上で解析した研究は未だ行われていない。そこで今回我々は、新たに開発されたgelatin filmを用い、歯周疾患罹患組織中の活性型gelatinaseの分布状況について検索を行い、興味ある知見が得られたので報告する。sampleは、当大学附属病院を受診し、成人性歯周炎または智歯

周囲炎と診断された患者の歯肉を歯周外科時または抜歯時に採取した。採取したsampleは、直ちに液体窒素にて凍結し、連続切片を作成した。切片は直ちに、gelatin film上に貼付し、37°C12時間incubationした。染色液で染色した後、検鏡を行った。その結果、基底細胞部、血管周囲部にgelatinase活性が観られた。

また、炎症の著名な部分では、染色像の弱いところが観察されgelatinase活性が強いことが示唆された。今後、臨床的データとTcell, Bcellなどの組織学的な歯周疾患の炎症の進行状況などを総合的に判定し、歯周疾患の進行過程における活性型gelatinaseの役割について詳細に検討していく予定である。

23. 口腔癌および正常上皮細胞のin vitroにおけるBMP遺伝子の発現について

○三田村治郎, 中畑 潜, 澤木 健,
永山 裕, 山田 幸宏, 岡本 智博,
安彦 善裕, 賀来 亨
(口腔病理学講座)

【目的】BMPは骨形成を誘導する因子として広く知られているが、骨芽細胞以外にも骨を誘導する様々な細胞で発現のあることが報告されてきている。しかしながら、type 2～8まで存在するBMPの詳細な発現様式については不明な点が多い。本研究では、口腔癌由来細胞株と正常上皮細胞のBMPの発現様式についてRT-PCR法により検索したので報告する。

【材料および方法】細胞には、ヒト口腔癌由来細胞株としてSAS(舌SCC由来), Ca9-22(歯肉SCC由来), HSC-4(SCC頸部リンパ節転移部由来), BS(口腔底Basaloid squamous Ca 由来), HSG(唾液腺癌由来), ヒト正常上皮由来細胞として, OE(口腔上皮由来細胞), NHEK(胎児表皮由来細胞)を, さらに骨芽細胞様細胞株K1ku(ヒト骨肉腫由来)を用いた。口腔癌由来細胞株と, 骨芽細胞様細胞株は10%PBS含有DMEMで培養を行い, 正

常上皮細胞は無血清培地(Ca²⁺濃度0.04mM)とこれに最終濃度1.8mMになるようにCa²⁺を添加したもので培養を行った。細胞からそれぞれtotal RNAを抽出し, oligo(dT)による逆転写の後, BMP 1～7のprimerを用いPCRによるcDNAの増幅を行った。

【結果および考察】骨芽細胞様細胞株K1kuはBMP 1～7すべてのmRNAの発現が確認された。BMP-1, 2, 4, 5はすべての上皮細胞で発現が認められたものの, BMP-3の発現はいずれにおいても確認されなかった。また, BMP-6はHSGでのみ発現が確認された。正常上皮細胞はCa²⁺濃度を上げることによりBMP-4, 5のup-regulationが観察された。以上のことからBMPは正常, 癌を問わず上皮細胞で広く発現していることが示唆された。

24 口腔癌細胞における細胞内TNFのTNF抵抗因子としての役割

○萩野 司, 金澤 正昭
(口腔外科学第一講座)

【目的】TNF(腫瘍壊死因子)は、標的細胞表面の受容体に結合し、腫瘍細胞障害性をはじめとした多彩な生物学的活性を発揮するサイトカインである。これまで各種培養細胞を用いた実験から、細胞内のTNF(endogenous TNF)が、TNFの細胞傷害作用に関与する活性酸素の消去系であるMnSODを誘導し、TNFの細胞傷害性に対する防御因子として働くことが報告されている。そこで本研究では、口腔癌細胞においてもendogenous TNF及びMnSODがTNF感受性規定因子として働いているか否

かについて検討した。【方法】対象として4種の口腔癌細胞株(T T, HSC-3, Ca 9-22, SAS細胞)を用いた。細胞傷害性はdye-uptake法で調べ、MnSOD活性はOberleyらの方法に準じ、NBT法により測定した。非分泌型TNF発現ベクター(pHNFΔpro)遺伝子導入はlipofection法で行った。【結果】(1)細胞のTNF感受性には細胞間で差異が認められ、T T>HSC-3>Ca9-22>SASの順に、TNFに対する感受性が高かった。最も低感受性であるSAS細胞のMnSOD活性(11.7U/mg protein)は、最