

## 29. PSK(免疫賦活剤)によるMn-SODの誘導と癌細胞の悪性化進展の抑制(東日本歯学会第17回学術大会)

著者名(日)	小林 徳栄, 柴田 敏之, 中井 一元, 永易 裕樹, 河野 峰, 青山 哲也, 中田 大地, 有末 眞
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	18
号	1
ページ	242-243
発行年	1999-06-30
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1145/00008427/">http://id.nii.ac.jp/1145/00008427/</a>

発現状態を検討した。

**【方法と結果】**北海道医療大学歯学部附属病院に来院した歯周炎患者からインフォームドコンセントを得た後、歯周外科処置時に歯周ポケット内上皮を含む歯肉片を採取し-80°Cにて保存した。その後、歯肉片からtotal RNAを抽出しOligo(dT)による逆転写後、5種のプライマー(GAPDH, hBD-1, hBD-2, IL-1 $\beta$ , IL-8)を用いてRT-PCR法を行った。2%アガロースゲルにて電気泳動後、ゲルをポラロイドカメラで撮影した。また、ゲルを撮影したポラロイド写真をコンピュータに取り込み画像解析を行った。

16のサンプルの大部分においてhBD-1, hBD-2, IL-1 $\beta$ , IL-8各mRNAの発現が認められた。各サンプルのGAPDHのバンド量が均一ではなかったため、画像解析によりGAPDHのバンド量当たりの各サンプルのバンド量を算出した。その結果、hBD-1発現量とIL-1 $\beta$ およびIL-8の発現量との間には有意な正の相関関係が認められた。しかし、hBD-2と発現量とこれらサイトカイン発現量の間には相関関係は認められなかった。

**【結語】**歯周炎患者から分離した歯肉組織は、hBD-1, hBD-2を発現しており歯肉局所の防御機構に関わっていることが示唆された。

## 28. 口腔扁平上皮癌における $\beta$ -ディフェンシンの発現

○安彦 善裕, 三田村治朗, 西村 学子,  
賀来 亨  
(北海道医療大学歯学部口腔病理学講座)

**【目的】**細菌感染から生体を防御する抗細菌性の蛋白にディフェンシン(hBD)がある。hBDには $\alpha$ と $\beta$ があるが、 $\beta$ の一部は正常上皮細胞で発現していることが知られてきている。近年、ウイルス感染のみならず、細菌感染も癌の発生進展に関与しているとの報告がなされてきており、生体の細菌感染からの防御機構の発癌への係わりも議論されてきている。本研究では、hBDがこれらに大きく関わっているものと考え、口腔由来扁平上皮癌(OSCC)におけるhBDの発現様式を検索した。

**【材料および方法】**OSCC細胞株(SCC-9, SAS, Ca-9, HSC-4, KB), および扁平上皮癌と診断された手術材料を用い、いずれもtotal RNAを抽出した後、hBD-1 mRNAおよびhBD-2 mRNAの発現をRT-PCR法によって半定量的に検索した。一部の細胞には炎症性の刺激としてLPS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ を添加し12時間後に、total

RNAを抽出して、同様にhBD-1および-2の発現を検索した。

**【結果】**OSCCでは、いずれにもBD-2の発現は観察されたが、SAS, KBではhBD-1の発現は認められなかった。SCC-9ではLPS, TNF- $\alpha$ の添加でhBD-2のup-regulationがみられたが、SASにはhBD-2の発現の変化はみられなかった。手術材料では、発現のレベルは様々であったが、いずれもhBD-1およびhBD-2の発現が確認された。

**【考察】**OSCCの中にはBD-1の発現の減弱しているものや、hBD-2の発現が炎症性刺激によるregulationされないものがあり、細菌感染に対するリスクの高いことが示唆された。

**【結語】**口腔扁平上皮癌のhBD-1および-2の発現様式を実証した。

## 29. PSK (免疫賦活剤) によるMn-SODの誘導と癌細胞の悪性化進展の抑制

○小林 徳栄, 柴田 敏之, 中井 一元,  
永易 裕樹, 河野 峰, 青山 哲也,  
中田 大地, 有末 眞  
(北海道医療大学・歯・口腔外科第二講座)

**【目的】**口腔癌を含む癌の悪性化進展に炎症が深く関与することが知られている。我々は、これまで、マウス線維肉腫BMT-11より得られた退縮型QR癌細胞を用いて炎

症と癌悪性化進展の関連を検討してきた。その結果、癌細胞の悪性化進展が、免疫賦活剤のPSKによって抑制されること、この悪性化進展には炎症細胞の産生する活性

酸素が関与することが明らかになった。そこで、今回、PSKが腫瘍増殖局所において誘導する活性酸素中和酵素Mn-SODの観察とその誘導機序を解析した。

**〔方法〕** 炎症を惹起させる異物となるゼラチンスポンジ(10×5×3 mm)をC57BL/6マウス皮下に移入し、この移入部位に退縮型QR癌細胞(1×10<sup>6</sup>個)を移植した。PSKは腫瘍移植5日前より毎日、移植後は一日おきに腫瘍摘出まで連続投与した。移植後21日目の腫瘍組織中のMn-SOD量をWestern blotting法にて検索した。腫瘍移植後7・14・21日目にPSK投与群と非投与群の腫瘍組織よりRNAを抽出し、RT-PCR法にてTNF- $\alpha$ 、IL-1- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6、TGF- $\beta$ の炎症性サイトカインの発現を検索した。また、培養QR癌細胞を用いてサイトカイン添加

によるMn-SOD誘導を検索した。

**〔結果〕** PSK投与によって腫瘍組織中のMn-SOD量が約3倍に増加していた。TNF- $\alpha$ 、IL-1- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ のmRNA発現が腫瘍組織中に認められ、PSK投与によってIFN- $\gamma$ の発現増強とTGF- $\beta$ の発現減弱が観察された。培養QR癌細胞にIFN- $\gamma$ とTNF- $\alpha$ を添加するとMn-SODが誘導され、逆にTGF- $\beta$ の添加によって抑制された。培養QR癌細胞に直接PSKを添加してもMn-SODは誘導されなかった。

**〔結語〕** 免疫賦活剤PSKは、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ などのサイトカイン産生を調節することによって腫瘍組織中にMn-SODを誘導し、炎症によって促進される癌細胞の悪性化進展を抑制するものと考えられた。

### 30. RhBMP-2/アテロコラーゲンによる成熟ラット頭部骨増生

#### —骨膜下、骨膜上、骨膜切除下において—

○村田 勝, 佐藤 大介, 平 博彦,  
柴田 敏之, 有末 眞

(北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座)

**〔目的〕** 骨形成タンパク質(BMP)の標的細胞は、骨芽細胞ではなく、血管周囲の未分化間葉細胞であると一般的に考えられている。そこで、骨原性組織である骨膜を切除し、帽状腱膜下でもrhBMP-2により骨増生は可能であるという仮説を基に、BMP/アテロコラーゲンをを用いたOnlay implantを3種の異なる埋入局条件下で試みた。そして埋入部の骨形成過程と骨膜の役割を形態学的に評価した。

#### 〔材料と方法〕

**1. RhBMP-2と担体の複合化** RhBMP-2(10 $\mu$ g; 山之内製薬供与)を含むPBS溶液と0.3% I型アテロコラーゲン酸性溶液(3.3ml)を滅菌チューブ内に加えて混和後凍結乾燥し、ステンレス棒を用いて円錐台状に加圧整形した。

**2. 埋入観察方法** 埋入局所条件により、実験群を3群(骨膜下群, 骨膜上群, 骨膜切除群)に分け、ウィスター系ラット(10カ月齢, 雄性)頭頂骨矢状縫合部に埋入物を挿入した。1, 2, 3週後に頭蓋骨とともに一塊と

して摘出し、固定脱灰後、ヘマトキシリン-エオジン染色とエラスチカーワンギーソン染色を施して光学顕微鏡で観察した。

**〔結果〕** 骨膜下群; 1週後挙上骨膜側から線維性骨形成が進行し、3週後には骨梁の連続性が増加して頭蓋骨と結合していた。骨膜下の骨表面は比較的平坦であった。担体コラーゲン線維は大部分吸収されたが、新生骨基質内にエオジン好染性で線維状の担体コラーゲンが封入されていた。骨膜上群; 埋入周囲から骨形成が進行し、3週後には管状に骨が形成された。新生骨と既存骨は骨膜で明瞭に区分されていた。骨膜切除群; 帽状腱膜下から骨形成が進行し、増生骨は頭蓋骨と連続していた。帽状腱膜下の骨表面は波状を呈していた。

**〔結論〕** RhBMP-2の標的細胞が骨膜構成細胞外にも存在し、rhBMP-2/コラーゲン複合物により骨膜切除下でも骨増生が可能であることが示された。骨膜は骨原性細胞の供給のみならず、組織境界膜として存在し、骨の外形形態に関与している可能性が示唆された。