

<学会記録>2. マラッセ上皮細胞が発現する炎症性サイトカインに関する研究(東日本歯学会第19回学術大会 一般講演抄録)

著者名(日)	劉 芳, 西村 学子, 草野 薫, 安彦 善裕, 賀来 亨
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	20
号	1
ページ	105-106
発行年	2001-06-30
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00008607/

〔学会記録II〕

東日本歯学会第19回学術大会 一般講演抄録

1. Percoll遠心分離法によるラット顎下腺導管細胞の単離

○根津 顕弘, 谷村 明彦, 東城 庸介
(北海道医療大学歯学部歯科薬理学講座)

【目的】精製された唾液腺導管細胞標本を得ることは、導管系における分泌調節機構や情報伝達機構を解明する上で極めて有用である。本研究では、Percoll遠心分離法によるラット顎下腺導管細胞の単離を試み、本分離法の有効性を確かめるとともに調製された導管細胞の受容体アゴニストに対する反応性を検討した。

【方法】1) 単離顎下腺導管細胞の調製：ラットの顎下腺組織を十分に細断し、コラゲナーゼPを用い顎下腺細胞を分散化した。次に、40%Percollを含む等張化した緩衝液を用いて遠心分離を行った。2) カリクレイン活性測定：細胞のホモジネート上清に発色基質であるN α -ベンゾイル-DL-アルギニン-p-ニトロアニリド塩酸塩を加え、直ちに分光光度計にて405nmの吸光度を経時的に測定した。3) 細胞内遊離Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 測定：Ca²⁺蛍光指示薬であるfura-2/AMを調製した細胞に取り込ませ、蛍光光度計を用いて測定した。

【結果および考察】Percoll遠心分離により、顎下腺細胞は遠心管の上部と底部の2つの細胞群に分離された。光学顕微鏡観察において、上部細胞群には特徴的な管状構造を有する導管様の細胞が多く見られ、腺房様の細胞はほとんど観察されなかった。また導管細胞のマーカー酵素であるカリクレイン活性を測定したところ、上部細胞群のカリクレイン活性は底部細胞群の約4.5倍であった。さらに上部細胞群をカルバコール、フェニレフリンおよびイソプロテレノールで刺激したところ、全ての受容体アゴニストで有意な[Ca²⁺]_i上昇が認められた。

本方法によって調製された上部細胞群は、大部分が導管細胞であることが示された。得られた導管細胞は受容体刺激に対して十分な反応性を保持していた。以上の結果から、Percoll遠心分離法は導管細胞の調製方法として非常に有用である事が確かめられた。

2. マラッセ上皮細胞が発現する炎症性サイトカインに関する研究

○劉 芳***, 西村 学子***, 草野 薫*,
安彦 善裕*, 賀来 亨*

(*北海道医療大学歯学部口腔病理学講座・**同済大学 児童口腔医学研究所・
***北海道医療大学歯学部中央検査部)

【目的】歯根嚢胞は感染根管に伴う生体の防御反応として形成され、裏装上皮による歯根膜や歯槽骨などの内部環境の保護と、炎症による細菌への抵抗を行っている。様々な上皮細胞自身もある種のサイトカインを分泌し、炎症へ関与していることが明らかになってきているが、歯根嚢胞裏装上皮のサイトカインの発現様式については

不明である。この裏装上皮がマラッセ上皮遺残由来であることから、本研究では、in vitroでのマラッセ上皮細胞の炎症性サイトカインの発現様式について検索し、歯根嚢胞裏装上皮の炎症における役割について議論することを目的とした。

【材料および方法】細胞には、ブタ歯根膜より単離した

マラッセ上皮細胞を用いた。細菌感染を想定して、Lipopolysaccharide (LPS)を1,10,100,1000ng/ml培養液に添加したものと、添加していないものをコントロールとして用いた。炎症性サイトカインとして、IL-6,IL-8, GM-CSFのmRNAの発現を観察するために、RT-PCR法を行った。各々の細胞からtotal RNAを抽出し、Oligo (dT)プライマーによりcDNAを作製した後、各々に特異的なプライマーを用い、一部は通常のThermal cyclerによる増幅を行い、他はLightCyclerにより定量的

PCR法を行った。いずれも、internal controlとしてG3 PDHを用いたものも合わせて行った。

【結果および考察】LPSを添加しない、通常の培養条件で、いずれのサイトカインの発現も観察された。LPSを添加し、各々の発現の変化を定量的に観察すると、IL-8とGM-CSFの発現の上昇がLPS濃度依存性に観察された。以上の結果から、歯根嚢胞の裏装上皮となりうるマラッセ上皮から炎症性サイトカインが分泌され、その一部は細菌感染によって刺激されることが示唆された。

3. 口腔上皮性疾患におけるβディフェンシン2のタンパクおよびmRNAの発現

○草野 薫, 安彦 善裕, 荒川 俊哉*,
西村 学子**, 田隈 泰信*, 溝口 到***,
賀来 亨

(北海道医療大学歯学部口腔病理学講座・*北海道医療大学歯学部口腔生化学講座・
北海道医療大学歯学部附属病院中央検査部・*北海道医療大学歯学部矯正歯科学講座)

【目的】βディフェンシン2 (hBD-2)は、口腔上皮細胞でも発現している抗細菌性ペプチドであり、in vitroでの実験で、細菌や炎症性サイトカインにより発現の変動することが明らかになってきている。しかしながら、in vivoでの局在様式は明らかにされていない。本研究では、角化の程度が違う様々な部位の正常口腔上皮および様々な口腔上皮性疾患におけるhBD-2の発現をタンパクおよびmRNAレベルで明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】材料には、口腔原発の扁平上皮癌(SCC)、白板症、扁平苔癬、およびそれらの周囲の正常組織を用いた。hBD-2のタンパクの局在を明らかにするため、抗ヒトhBD-2抗体を1次抗体とした免疫組織化学染色を行った。また、hBD-2 mRNAの局在を明らかにす

るため、hBD-2 cDNAからDIG標識RNAプローブを作製し、in situ hybridizationを行った。

【結果と考察】hBD-2のタンパクの局在は、正常口腔上皮では口蓋部などの角化したところの角質層では弱陽性、SCCの角質球や白板症の過角化の部分では強陽性を示していた。これに対して、hBD-2 mRNAは口腔底や頬粘膜などの非角化上皮では上皮層上層に著明な発現がみられたが、正常の角化上皮および白板症の過角化上皮では発現がわずかであった。以上のことから、hBD-2タンパクは角質層に貯留することによってその機能を発揮し、非角化部では貯留する場がないことから、mRNAの発現強くなっているものと考えられた。

4. 口腔扁平上皮癌の浸潤転移関連遺伝子の探索

○木下 隆二, 奥村 一彦, 萩野 司,
荒川 俊哉*, 岡崎 有志, 田隈 泰信*,
金澤 正昭

(北海道医療大学歯学部口腔外科第一講座・*北海道医療大学歯学部口腔生化学講座)

【目的】口腔癌の治療は近年の治療技術により局所制御率は向上したが、一方、舌癌をはじめとして所属リンパ節転移や遠隔転移により予後不良となる例もみられ、治療に苦慮することがある。そこで、早期に浸潤転移が予測できるようなマーカー、および転移制御に向けての治

療の確立が急務と考えられる。そこで、舌原発扁平上皮癌細胞を用いて、Differential Display法により浸潤性に差のある癌細胞間で発現しているmRNAの差異を検索し、浸潤転移を制御する遺伝子の探索を試みた。

【材料と方法】ヒト舌原発癌から樹立されたSAS細胞か