

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しう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

も高感受性のT T細胞のそれ (3.9U/mg protein) に比べ高値を示した。(2)T T細胞にpTNF Δ proを遺伝子導入した結果、得られたクローンのMnSOD活性は上昇し、

TNFに抵抗性となった。【結語】口腔癌細胞株において、細胞内TNFの発現およびMnSOD活性が、TNF感受性規定因子として働くことが示唆された。

25. 内皮細胞間の機能装飾はヒト口腔癌細胞の浸潤を抑制する

○永易 裕樹, 河野 峰, 北所 弘行,
加藤 元康, 柴田 敏之, 有末 眞
(口腔外科学第二講座)

癌の転移成立過程において、癌細胞が内皮細胞下に浸潤することは、重要な段階の一つと考えられている。これまで、我々は、肝臓疾患用剤Malotilate (MT) が内皮細胞に作用し、転移抑制効果を示すことを動物実験において明らかにしてきた。そこで、今回、ヒト口腔扁平上皮癌細胞における浸潤抑制効果とその作用機序について検討した。

その結果、MTは、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株5系の増殖能には変化を及ぼさなかった。ラット肺由来血管内皮細胞 (RLE) を用いたin vitro invasion assayにおいて、癌細胞側をMT処理した場合、浸潤能に変化を認めなかったが、内皮細胞側をMT処理したとき、癌細胞株3系で有意な浸潤抑制効果が認められ、他の2系でも抑制傾

向が認められた。MT処理RLEにおいて、Permeabilityの有為な低下ならびにDye transfer法で細胞間色素移行率の増大が観察された。また、ウエスタンブロッティング法によりギャップ構成タンパクであるコネキシン43の発現を検索したところ、MT処理時間に依存して6時間以降よりコネキシン43の発現の増加が認められた。さらにMT処理濃度に応じ、濃度の増大に伴いRLEにおけるコネキシン43の発現が増強されていた。

以上のことよりMTは、内皮細胞間の細胞間結合装置の発達を促し、細胞間結合力を上昇させ、癌細胞の内皮細胞間の通過を妨げることにより、浸潤抑制効果を発揮すると考えられた。

26. ラットにおける癌抑制遺伝子p53の機能的変異検出法の開発

○中田 大地, 柴田 敏之, 中井 一元,
永易 裕樹, 加藤 元康, 河野 峰,
有末 眞
(口腔外科学第二講座)

【目的】癌抑制遺伝子p53はヒト口腔癌をはじめ、各種癌で高頻度に変異を起し、その悪性化進展に関与することが知られている。この遺伝子の変異を塩基配列を決定することなしに酵母を用いて簡単・迅速・多数の試料を検出する方法 (Yeast functional assay) が開発された。この方法は従来の化学的な変異検出法や免疫化学的方法に比べ生物学的に意味のある機能的変異を検出できる優れた方法である。現在この方法はヒトの系においてのみ使用可能である。今回、我々はこれを応用し実験動物で発癌および悪性化進展の解析等を行うためラットp53遺伝子のYeast functional assayの開発とその有用性について検討を行った。

【方法と結果】正常ラット (WKA) の肝臓からRNAを

抽出し、RT-PCR法により得られたp53cDNAを酵母内ヒトp53発現ベクターpLS72のヒトp53cDNAと置換し、ラットp53発現ベクターpLSRP53を作製した。このベクターからp53のDNA結合ドメインをコードする部分を除去し線状化した後、これをラット各種細胞よりRT-PCR法により得られたp53cDNAとともに酵母に導入し、相同組換えを起こさせた。この結果、発現するp53蛋白が酵母染色体上のp53確認DNA配列に結合し下流のADE2遺伝子の転写を活性化するかどうかをコロニー色 (赤：変異型p53／白：野生型p53) で判定するシステムを確立した。この方法により、ラットの正常組織のp53の変異を検定したところ90%以上が、白コロニーを呈した。一方、癌細胞および人為的変異を導入したp53PCR産物