

1) Ectodinがラット象牙芽細胞様細胞の分化に及ぼす影響について

○中島 宗隆

(奥羽大・歯・保存修復学)

【目 的】 Ectodin は SOST ドメインを有する分泌型糖蛋白質であり、Wnt シグナルを阻害するアンタゴニストとして知られている。歯の発生において歯冠の形態形成や咬頭の数、歯の数を決定する因子として重要な働きをしている。一方、Wnt シグナルは象牙芽細胞の分化調節に重要な役割を果たしていることが報告されており、dentinogenesis の調節因子として注目されている。

この Wnt シグナルのアンタゴニストである ectodin が Wnt シグナルに作用して dentinogenesis に関与することは十分に考えられるが、これまでに象牙芽細胞の分化や機能に対して ectodin と Wnt シグナルの関係を調べた報告はみられないのが現状である。本研究ではラット切歯から分離した培養歯髄細胞を利用して ectodin と Wnt シグナルの関係が dentinogenesis に対してどのように作用しているかを調べることを目的とした。

【材料と方法】 SD ラットの顎切歯から酵素分離法によって歯髄培養細胞を分離した。これらの細胞を 5, 10, 15, 20 日間培養し実験に使用した。これらの培養細胞に LiCl を添加し Wnt シグナル活性化状態にし、象牙芽細胞への分化への影響を調べた。また、ectodin の siRNA を作成しノックダウンを行い分化、機能に対する影響を調べた。象牙芽細胞の分化指標として、ALP, Osteocalcin, DSPP の mRNA 発現をリアルタイム PCR にて調べた。また、ectodin の mRNA 発現も合わせて調べた。形態的には ALP 染色と von Kossa 染色を行い象牙質様石灰化結節の形成を調べた。

【結果と考察】 培養歯髄細胞に LiCl を添加するとその分化が抑制され、ALP, Osteocalcin, DSPP の mRNA の発現が抑制され、象牙質様石灰化結節の形成も抑制された。しかし、ectodin の mRNA 発現が促進され、Wnt シグナルに対するネガティブフィードバック機構があることが示唆された。さらに ectodin の siRNA によるノック

ダウンの結果、培養歯髄細胞の DSPP の mRNA 発現が抑制され象牙質様石灰化結節の形成が抑制された。これらの結果から Wnt シグナルは象牙芽細胞の分化を抑制しており、このシグナルを ectodin が阻害することによって象牙芽細胞の分化を調節していることが示唆された。

【結 論】 Ectodin は象牙芽細胞の分化調節因子である。

2) 酸性細胞外pHは、ルイス肺癌モデルにおける上皮間葉系移行を促進する

○鈴木 厚子

(奥羽大・大学院・口腔生理・生化)

【緒 言】 近年、がん細胞の浸潤や転移の過程には、上皮の性質から間葉系の性質に変化するという上皮間葉系移行 (EMT) が注目されている。これまでに Kato ら (JBC, 1992) は、酸性細胞外 pH によりメラノーマ細胞が EMT 様に変化することを見いだしている。本研究では、carcinoma モデルとしてマウスルイス肺癌 (LLC) 細胞株を用いて、酸性細胞外 pH が EMT を誘導することを検証した。

【方 法】 LLC 細胞より実験的転移を繰り返すことにより樹立した低転移株と高転移株を本研究に用いた。細胞は通法に従い、DMEM と F12 を 1 対 1 に混合した培地に 15mM HEPES と 4mM リン酸を添加し、重炭酸ナトリウム 1g/L と通常より添加量を減らして加えさらに 10% 牛胎児血清を添加し 37℃ 5% CO₂ 条件下で培養した。pH の調整は塩酸と水酸化ナトリウムにて行った。EMT マーカー遺伝子の発現は、定量的 PCR により決定し、遊走および浸潤活性はそれぞれ、wound healing assay および Matrigel® を介し Boyden chamber assay により分析した。

【結 果】

- (1) pH6.8 で LLCm1 細胞, LLCm4 細胞を培養することで、以下が確認できた。
 - 1) LLCm1 細胞の形態は線維芽細胞様に変化し、高転移株と類似の形態を示した。
 - 2) 細胞運動能が向上した。
 - 3) E-cadherin 発現が減少し、Vimentin の発現を誘導した。

4) MMP9, MMP3の遺伝子発現が促進した。

これらの現象は、EMTの特徴と一致した。

(2) E-cadherinの遺伝子発現減少は、Twist1, Twist2, Zeb2の関与が示唆された。

【結 論】細胞外の酸性pHeは、EMTに関する微小細胞外環境因子であることが示唆された。

3) 再現性が高い口腔カンジダ症マウスモデルの作成

○菊池 直宏¹, 玉井利代子^{1,2}, 清浦 有祐^{1,2}

(奥羽大・大学院・口腔感染症学¹,

奥羽大・歯・口腔病態解析制御²)

【目 的】ヒト口腔内には、さまざまな微生物が常在して口腔微生物叢を形成している。その中には真菌である *Candida albicans* (*C. albicans*) も含まれる。通常、*C. albicans* が病原性を発揮して感染症を生ずることはない。しかし、高齢者、免疫不全患者、担癌患者、重度の糖尿病患者のような易感染性宿主では、口腔カンジダ症を起こすことがある。口腔カンジダ症の研究では、実験動物を用いてヒトの口腔カンジダ症に類似した病変を起こさせる試みが行われている。現在までのところ、マウスが最も適した実験動物だが、その再現性には多くの問題がある。さらに、マウスの実験的口腔カンジダ症の実験方法は報告者によってさまざまであり、使用するマウスの系統や薬剤の種類や投与量も異なる。そのため、普遍的に再現性のある結果を得るためには実験条件の再検討が必要となっている。本研究では再現性のあるマウスモデルの作成を試みることを目的として実験を行った。

【方 法】*C. albicans* は OH-1株を使用し、RPMI1640培養液中に浮遊させたものを菌液として用いた。テトラサイクリン含有水道水を飲用させて、プレドニゾロンを投与したマウスの舌に *C. albicans* は綿棒で接種した。その後、経日的に舌を切断し、舌組織中の *C. albicans* 菌数と各種サイトカイン含有量を測定した。

【結果と考察】感染3日後の舌表面は、ヒトの口腔カンジダ症に類似した白苔で覆われた。

また、舌組織中の菌数も感染3日後が最多であった。サイトカインは MIP-1 α と IL-1 α の有

意に高い産生が認められた。しかし、*in vitro* のマウスマクロファージ様細胞株を使用した時とは大きく異なり、MCP-1の産生が認められなかった。この相違は、マウスの舌組織全体のサイトカイン産生をみていることと生菌の *C. albicans* 菌を使用したためと考えられる。

今回の *in vivo* の感染実験において、サイトカインの選択的な産生が認められたことは、カンジダ症の発症にこのような特定のサイトカイン産生が関与することを示唆している。今後は、カンジダ症の治癒過程における炎症性サイトカインの産生動態について検討する予定である。

4) アジスロマイシンの免疫修飾作用

○寺本 育司¹, 玉井利代子^{1,2}, 清浦 有祐^{1,2}

(奥羽大・大学院・口腔感染症学¹,

奥羽大・歯・口腔病態解析制御²)

【目 的】歯周炎は、歯周病原性細菌と呼ばれるグラム陰性嫌気性菌を主体とした細菌集団を原因とする感染症である。

したがって、歯周組織における歯周病原性細菌を死滅させることが歯周治療には有効とも考えられる。しかし、通常の細菌感染症の治療で広く行われている抗菌薬の投与は歯周治療では限定された方法で、抗菌薬の投与のみで歯周炎が治癒されることは難しいと考えられている。

最近、マクロライド系抗菌薬のアジスロマイシンの投与が歯周炎治療に有効であるとの報告が国内外でなされている。

その理由の1つにアジスロマイシンが炎症性サイトカイン産生を亢進、あるいは抑制するとの報告がある。宿主の免疫応答の増強は貪食殺菌にプラスに働くが、炎症反応の増強は宿主組織の傷害を招くことが考えられる。逆に抑制される場合は感染が持続し、慢性炎症が継続する。したがって、アジスロマイシンの免疫修飾作用を正しく把握することは、アジスロマイシンを使用する際に必須のことである。

本研究ではアジスロマイシンの免疫修飾作用の一端を明らかにするために、*P. gingivalis* 生菌に対する宿主の免疫応答に及ぼすアジスロマイシンの影響を調べた。