

Title	20 : 米ペプチドCL はAggregatibacter actinomycetemcomitans LPS によるヒト大動脈内皮細胞からのIL-6 産生を抑制する
Author(s)	高山, 沙織; 今村, 健太郎; 喜田, 大智; 加藤, 哲男; 齋藤, 淳
Journal	歯科学報, 113(4): 432-432
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/3143">http://hdl.handle.net/10130/3143</a>
Right	

## No.19: 骨格筋細胞シートの解析

芹川雅光<sup>1)</sup>, 梅澤貴志<sup>1)</sup>, 山根茂樹<sup>1)</sup>, 井出吉信<sup>1)</sup>, 阿部伸一<sup>1)</sup>, 比嘉一成<sup>2)</sup>, 島崎 潤<sup>2)</sup>  
 (東歯大・解剖)<sup>1)</sup> (東歯大・市病・角膜センター)<sup>2)</sup>

**目的:** 頬粘膜癌や咽頭癌などによって、広範な粘膜摘出後に、自己細胞による口腔粘膜細胞シートへの応用が試みられているが、直下の筋層の再構築までは困難なことから治癒後の咀嚼・嚥下機能障害という問題点が指摘されている。そこで、現在我々は培養移植片として上皮、結合組織、筋肉の細胞シートをハイブリットさせた3層積層シートの開発を試みている。移植後、移植片が生着し恒常性が維持されるためには、細胞の供給源としてシート内に未分化な細胞が必要だと考えられる。今回は、日本家兎の頬粘膜筋組織からの筋芽細胞分離法の確立と、その細胞の特性解析、さらに作製した3層積層シートの筋シートに着目し、解析を行った。

**方法:** 日本家兎頬粘膜組織から選択的に筋組織を採取し、酵素処理により筋芽細胞の分離を行った。筋芽細胞の低接着性を利用し、選択培養を行って、長期培養可能な細胞の検索を行った。この筋芽細胞の分化能を調べるため、2%ウマ血清を使用した低栄養性の筋管細胞への分化誘導を行った。それぞれの細胞に対して、免疫組織化学的染色を行い、筋芽細胞特有の構造タンパクである Desmin の局在を観察を行った。さらに筋芽細胞の未分化なマーカーを mRNA レベルで確認するために、RT-PCR を行った。

また、他組織への分化能を調べるため、骨芽細胞への分化誘導も行った。誘導後の細胞はアリザリンレッド染色ならびにオイルレッドO染色を行った。更にこの筋芽細胞を用いて筋シートを作成し、あらかじめ作成しておいた上皮間葉シートと積層した。出来上がった3層積層シートの筋シート部の解析のため、RT-PCR法を行った。

**結果および考察:** 選択的に培養された筋芽細胞は30継代以上培養が可能で、筋芽細胞特有の MyoD や Desmin の発現が維持されていた。未分化な筋芽細胞で発現する、PAX 7 や CD34 も確認できた。2%ウマ血清を用いた分化誘導では、筋管様構造がより多く確認できた。また、骨芽細胞への分化誘導ではアリザリンレッド陽性のカルシウム沈着を観察することができた。筋シートは積層後も、未分化な筋芽細胞のマーカーである PAX 7 や CD34 の発現を確認することができた。以上のことから筋組織から今回分離・増殖した筋芽細胞には、骨芽細胞へも分化可能な未分化な細胞が存在し、積層シート作製後の筋シート内に未分化な筋芽細胞が確認できたことから、移植後も細胞の供給源となりうる細胞が積層後も維持されていることが示唆された。

No.20: 米ペプチド CL は *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LPS によるヒト大動脈内皮細胞からの IL-6 産生を抑制する

高山沙織<sup>1)</sup>, 今村健太郎<sup>1)</sup>, 喜田大智<sup>1)</sup>, 加藤哲男<sup>2)</sup>, 齋藤 淳<sup>1)</sup> (東歯大・歯周)<sup>1)</sup>  
 (東歯大・化学)<sup>2)</sup>

**目的:** 歯周病原細菌の内毒素は宿主の炎症反応を引き起こし、歯周病の発症や進行に深く関与している。近年、従来の薬剤の耐性菌に対する抗菌物質として、天然由来の抗菌タンパク質が関心を集めている。米タンパク質 Cyanate lyase 由来プロテアーゼ阻害ペプチド CL (14-25) は、これまでに歯周病原細菌の増殖阻害やバイオフィーム形成阻害効果をもつことが報告されてきた。

本研究では、CL (14-25) の抗炎症効果を評価する目的で、グラム陰性細菌内毒素がもつ炎症性サイトカイン誘導能に対する抑制効果を検討した。また、CL (14-25) のヒト培養細胞に対する毒性の有無を評価した。

**方法:** 歯周病原細菌内毒素として *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 LPS を用い、加えて *Escherichia coli* 3 菌株の LPS および lipid A も用いた。ヒト大動脈内皮細胞 (HAECs) の培養液に、CL (14-25) および各内毒素、もしくは各内毒素のみを添加し、17時間培養後の細胞上清中のサイトカイン IL-6 量を ELISA キットにより測定した。

また HAECs の培養液に CL (14-25) を添加し、

4時間後および24時間後に XTT assay にて細胞毒性を評価した。

**結果:** 供試した全ての内毒素の添加により HAECs 培養上清中の IL-6 量は増加したが、CL (14-25) を同時に、またはあらかじめ CL (14-25) と内毒素とを反応させてから添加することで有意な抑制がみられ、その抑制は濃度依存的であった。

また、CL (14-25) の HAECs に対する細胞毒性はみられなかった。

**考察:** 内毒素と CL (14-25) とを細胞培養液に添加する以前に反応させておくか、または両者を同時に添加しないと抑制効果がみられなかったことから、本 IL-6 産生抑制効果は CL (14-25) が内毒素に結合し、内毒素の細胞への結合を阻害することに起因すると考えられる。さらに、lipid A に対しても同様の効果がみられたことから、CL (14-25) が内毒素の活性中心に作用していることが示唆された。CL (14-25) は同様のタイプの lipid A を有する歯周病原細菌に対しても抑制効果を示すことが予想され、細胞毒性は無いと考えられることから、歯周治療・予防への応用を検討している。