

氏名	澤 木 康 一
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与の番号	博 甲 第 2 4 8 6 号
学位授与の日付	平 成 1 5 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Mortality of human epidermal keratinocytes in co-culture with oral squamous cell carcinoma cells. (口腔扁平上皮癌細胞との混合培養系を用いた表皮角化細胞の細胞死のメカニズムとデフェンシンの関係の解析)
論文審査委員	教授 岸 幹二教授 永井 教之 教授 菅原 利夫

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

[緒言]

デフェンシンはbiophylaxis因子として昆虫を含む動物相で広く認められ、分子量3~5kdaの分子内にジスルフィド結合をもつ塩基性ペプチド群である。また、デフェンシンはジスルフィド結合の結合形式に基づき、 α 型、 β 型に分類される。 β -デフェンシンは1~3型に分類され、主に表皮、鼻腔、気管、口腔粘膜、腎臓、生殖器などの上皮細胞に発現が認められる。粘膜上皮における発現は、白血球依存の免疫防衛機構から独立した微生物に対する即時的な抗菌反応を有している。われわれは、いままでに口腔癌、前癌病変患者における唾液中の α -デフェンシン(HNPs)が正常個体より高濃度に存在していることを確認したことから、デフェンシンの作用や反応性を分析する目的で発現パターンを解析した。その結果、口腔癌組織におけるHNP-1および β -デフェンシン-2(HBD-2)の存在が明らかになり、また口腔癌組織中におけるHBD-2濃度が正常口腔粘膜に比べて高値に存在することが明らかになった。しかしながら、癌細胞におけるHBD-2の役割、および正常口腔粘膜中HBD-2の影響は、いまだ明らかにされていない。そこで本研究では、HBD-2の作用機序について、主として培養系を用いて分析を試みた。

[材料および方法]

1. 供切組織と細胞およびその培養：培養細胞は、ヒト口腔扁平上皮癌由来のHSC-4細胞(HSRRB)および正常成人ヒト表皮角化細胞(NHEK)(クラボウ)を用いた。培養には無血清培地(HuMedia-KG, クラボウ)を用いた。
2. 合成ペプチド：Human β -defensin-2(HBD-2)は、ペプチド研のものを使用した。
3. Conditioned mediumの調整：NHEK/HSC-4を3日間combination cultureした培養上清をConditioned mediumとした。また、HPLCを用いてConditioned medium中のHBD-2濃度を計測したところ、0.01mMであり以後の実験では、この濃度にて培養液中にHBD-2を添加した。

4. *in vitro*におけるHBD-2およびanti-HBD-2抗体の添加：NHEKを10,000cells/cm²の細胞密度で播種し、24時間培養をおこなった後、以下に示す培養液に交換した。
①HBD-2添加培養液(最終濃度0.01mM)、②conditioned medium、③HBD-2抗体添加 conditioned medium(1:300)
5. 細胞増殖のパラメーター：NHEK・HSC-4の増殖活動を測定するために、mitotic index(MI:mitosis数 / 全細胞数)およびlabeling index(LI: BrdU標識細胞数 / 全細胞数)を計測した。
- 1)mitotic index(MI)：細胞は4%中性ホルマリンにて固定しHematoxylinで染色後計測した。
 - 2)labeling index(LI)：標識は、BrdU(Roche)で1時間行い、固定にはEt-OH fixative(100%Et-OH、50mMglycine溶液、pH2.0)を用い、-20°Cで1時間行った。
6. 統計学的方法：統計分析は、Student's t-test・Welch's t-testにて各群間を比較した。

[結果および考察]

HBD-2の細胞増殖活性に対する効果

HBD-2存在下における両細胞の増殖活性の違いを比較すると、培養3日後のHBD-2存在群ではNHEKの細胞密度が減少したが、HSC-4群では変化は認められなかった。このことをもとに以下の分析を行った。

- 1)細胞分裂活性に対するHBD-2の影響：conditioned mediumにanti-HBD-2抗体を添加したものと、無添加のものについて、5日間MIの分析を行ったところ、培養1日後より、抗体を添加したconditioned medium群のMIが、normal medium・HBD-2添加mediumおよび抗体無添加のconditioned mediumのMIに比べて急速に減少した。
- 2)DNA合成活性に対するHBD-2の影響：normal medium(HBD-2不添加)およびHBD-2(0.01mM)添加mediumを用い、BrdU標識によるLIを5日間に渡って比較した。LIは、両細胞ともに変化が認められず、DNA合成活性に対する影響は認められなかった。

以上より、HBD-2はHSC-4の分裂活性には影響を与えないが、NHEKの分裂活性を減少させることが明らかになった。しかし両細胞のDNA合成活性には影響しないことが判明した。更に、HBD-2によって、両細胞の形態には変化が認められなかったことから、HBD-2がNHEKの増殖活性を減少させた原因がアポトーシスやネクローシスではない、いわゆる増殖死による可能性が示唆された。また、NHEKと比較してHSC-4はHBD-2に対して耐性が高く、同様の作用を示さないことが明らかになった。このことは、HSC-4とNHEKは共存下では、HBD-2の作用によって、NHEKが先に死滅し、HSC-4が生存する結果を引き起こす。つまり、HBD-2が癌の増殖において重要な役割を持ち、癌の増殖を補助している可能性が推測された。

論文審査結果の要旨

デフェンシンはbiophylaxis因子として昆虫を含む動物相で広く認められる塩基性ペプチド群である。近年、口腔癌組織中におけるhuman β defensin-2 (HBD-2)濃度が正常口腔粘膜に比べて高値に存在することが明らかになった。しかしながら、癌細胞におけるHBD-2の役割、および正常口腔粘膜中のHBD-2の影響は、いまだ明らかにされていない。そこで、HBD-2の作用機序について、主として培養系<ヒト口腔扁平上皮癌由来のHSC-4細胞および正常成人ヒト表皮角化細胞(NHEK)>を用いて細胞増殖活性に対する検討を試みた。

本研究において、得られた結果は以下のとおりであった。

①培養3日後のHBD-2存在群ではNHEKの細胞密度が減少したが、HSC-4群では変化は認められなかった。②細胞分裂活性に対するHBD-2の影響：HBD-2存在下または非存在下において、5日間Mitotic Index(MI)の分析を行ったところ、培養1日後より、HBD-2存在群のMIが、非存在群に比べて急速に減少した。③DNA合成活性に対するHBD-2の影響：HBD-2存在下または非存在下において、BrdU標識によるLabeling Index(LI)を5日間に渡って比較したところ、LIは、両細胞ともに変化が認められず、DNA合成活性に対する影響は認められなかった。

以上より、HBD-2によって、両細胞の形態には変化が認められなかったことから、HBD-2がNHEKの増殖活性を減少させた原因がアポトーシスやネクローシスではない、いわゆる増殖死による可能性が示唆された。また、NHEKと比較してHSC-4はHBD-2に対して耐性が高く、同様の作用を示さないことが明らかになった。このことは、HSC-4とNHEKは共存下では、HBD-2の作用によって、NHEKが先に死滅し、HSC-4が生存する結果を引き起こす。つまり、HBD-2が癌の増殖において重要な役割を持ち、癌の増殖を補助している可能性が推測された。

これらの知見は、HBD-2と口腔癌の増殖に関する新知見を示した重要な研究と考えられる。

したがって、本論文は博士(歯学)の学位の授与に値すると判断した。