

論文審査の結果の要旨

氏名：楠 正文

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：酸性電解機能水は EMMPRIN 分泌を誘導する

審査委員：(主査) 教授 鈴木直人

(副査) 教授 佐藤秀一

教授 浅野正岳

教授 川戸貴行

酸性電解機能水 (acid-electrolyzed functional water : FW) は、食塩水を電気分解することにより生成され、殺菌作用が強く皮膚や粘膜に対する為害性がないことから臨床で広く用いられている。また、熱傷モデルにおいては、受傷後の感染が FW によって防止されることにより、創傷治癒を促進することが報告されている。しかし、FW の創傷治癒促進作用についてのメカニズムは解明されていない。

創傷治癒の促進作用を有するタンパク質として、extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) が挙げられる。EMMPRIN は、膜貫通型の糖タンパク質で matrix metalloproteinase (MMP) の発現を誘導することによって、組織のリモデリングを活性化し、創傷治癒を促進させることが報告されている。

そこで本研究では、FW が創傷治癒を促進するメカニズムの解明を目的とし、上皮細胞と線維芽細胞の EMMPRIN 発現に及ぼす FW の影響を検討した。また上皮細胞が分泌する EMMPRIN が単球細胞の MMP と vascular endothelial growth factor (VEGF) 発現に及ぼす影響についても調べた。

実験には、口腔扁平上皮癌由来株化細胞 (HSC3)、ヒト子宮頸がん由来線維芽細胞 (HeLa)、ヒト単球性白血病由来株化細胞 (THP-1) を用いた。細胞に対する FW の刺激は、播種した細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline : PBS) で 2 回洗浄した後、FW (pH 2.7, 酸化還元電位 1,100 mV 以上、遊離有効塩素濃度 30 ppm ; 三浦電子社製) で 30 秒間刺激することで行った。刺激後は、直ちに培地を添加することにより作用を停止させ、溶液を吸引除去後、新しい培地に交換し、さらに一定時間培養した。サイトカインアレイは、HSC3 を刺激後 18 時間培養し、培養上清を回収し実験に供した。ELISA は、HSC3 ならびに HeLa に対して、刺激後 1, 6 および 12 時間の培養上清および細胞溶解液を用いて行った。細胞溶解液の調整は、細胞を PBS で洗浄後、細胞溶解用緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100) で懸濁し、4 °C、15,000 × g で 3 分間遠心分離を行い、上清を回収することで行った。Real-time PCR は、FW 刺激後の HSC3 を、0.5, 1, 6 および 12 時間培養し、細胞溶解液から total RNA を抽出し、complementary DNA を作製することで行った。このようにして得られた FW 刺激後の HSC3 の培養上清を conditioned medium (CM)+、また未刺激の培養上清を CM- とした。これらのサンプルを用いて THP-1 を 24 時間培養し、精製した total RNA を用いて、MMP1, 2, 8, 9, 13, 14 および VEGF の発現を real-time PCR で調べた。

その結果以下の結論を得た。

1. HSC3 および HeLa では FW 刺激により培養上清中の EMMPRIN 分泌は有意に増加し、細胞溶解液中の EMMPRIN 濃度は有意に減少した。
2. EMMPRIN の発現増強は転写非依存的であった。
3. FW 刺激によって HSC3 から分泌された EMMPRIN は THP-1 の MMP1, 2, 8, 9, 13 および 14 の発現を有意に増強させ、VEGF の発現を有意に減少させた。

以上のことから、FW 刺激は上皮および線維芽細胞から EMMPRIN を放出させ、さらに単球に対し MMP 発現を誘導することにより、創傷治癒促進に関与する可能性が明らかとなり、創傷治癒研究ならびに関連歯科領域分野に貢献することが大であると考えられた。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成30年3月7日