

## 論文の内容の要旨

氏名：石 井 美 穂

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Inhibition of PDGF-AA in human oral squamous cell carcinoma by static magnetic fields

(ヒト口腔扁平上皮癌細胞の静磁場曝露による PDGF-AA の抑制)

近年、磁場を利用した様々な医療機器が開発され、磁場の生体への応用は広がっている。特に補綴歯科治療においては、磁性アタッチメントが数多く用いられている。磁性アタッチメントは義歯に磁石構造体とよばれる永久磁石を用いることにより吸引力を発揮する維持装置である。この磁性アタッチメントは、口腔内でキーパーに吸着することで外部漏洩磁場を極力減少させているが、条件によっては、外部漏洩磁場が発生し、歯周組織が磁場に曝される可能性を否定できない。そのため、恒久的に磁場を発生させる永久磁石の口腔内での使用には、生体への影響を考慮する必要がある。そのため、磁場の生体への影響については、これまでも様々な報告がされているが未だ不明な点が多い。

そこで本研究は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) に対する磁場の影響について検討した。まず、実際に臨床で用いられている磁性アタッチメント GIGAUSS D1000 磁石構造体 (GC) とインキュベータ内で使用可能な磁石プレートである Super Magnet Plate (Oz Bioscience) の磁束密度の測定、比較検討を行い、培養条件の設定を行った。GIGAUSS D1000 磁石構造体直上の磁束密度は約 150mT であり、実験に用いた Super Magnet Plate 表面より 4mm の距離で同等の磁束密度が得られたため、この条件で以後の細胞培養実験を行った。なお、OSCC には HSC-3 を用いた。細胞は 10% 牛胎児血清加 RPMI1640 培地により、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養した。細胞を Super Magnet Plate 上で培養したものを磁気曝露群、磁場非存在下で培養したものを非曝露群として比較検討した。磁気曝露群および非曝露群の増殖速度の違いは細胞を 1×10<sup>5</sup> cell/35 mm dish で播種し、6 日間培養を行い、経目的な細胞数を計測することにより検討した。また、cytokine 分泌の変化については細胞を 24 時間培養し、培養上清中の cytokine 濃度の変化を Cytokine array (R&D systems) にて検討した。さらに、cytokine の分泌の違いについては HSC-3 を 4 日間培養後、培養上清を用いた Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法) および細胞溶解液を用いた Western blot 法により確認した。一方、遺伝子発現の変化は、培養 24 時間の mRNA を用いて real-time PCR を用い検討した。

従前より OSCC は、nuclear factor-kappa B (NF-κB) などの転写因子を恒常的に活性化しているとの報告がある。そこで磁場の作用部位を検討するため、転写因子 NF-κB や activator protein-1 (AP-1) の関与について確認を行った。実験には NF-κB が Platelet-derived growth factor-AA (PDGF-AA) の産生に関与しているかを検討するため、NF-κB の特異的阻害剤である L-1-4'-tosylamino-phenylethyl-chloromethyl ketone (TPCK) を添加した TPCK 添加群、および何も添加していないコントロール群を用いた。まず、TPCK 添加群、コントロール群ともに磁場を曝露することなく培養を行い、ELISA を用いて PDGF-AA の産生について確認を行った。次いで 磁気曝露群、非曝露群を用意し、NF-κB と AP-1 への磁場の影響を受けるか否かを Luciferase assay により検討した。

細胞の増殖速度を観察することにより細胞に対する磁場の影響を検討した結果、磁気曝露群および非曝露群間に有意差は認められなかった。cytokine 分泌の変化について Cytokine array によって検討した結果、PDGF-AA および Suppression of tumorigenicity 2 (ST2) の分泌量が非曝露群と比較し、磁気曝露群において減弱した。この PDGF-AA は血小板や平滑筋から分泌される間葉系細胞の遊走および増殖などの調節に関与する増殖因子であり、PDGF-AA は血管新生因子 Vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現を制御する可能性が示唆されている。そのため、以後の実験では PDGF-AA に着目し、分析を行った。Cytokine array の結果を確認するため、ELISA 法にて PDGF-AA の発現を測定したところ、培養 4 日目に磁気曝露群は非曝露群と比較して PDGF-AA の発現が有意に抑制されており、Western blot 法によるタンパク質レベルでの PDGF-AA の発現でも同様の結果が得られた。さらに real-time PCR においても、24 時間後の時点において磁気曝露群の mRNA 発現が有意に抑制されていた。

次に磁場の作用部位の検索を行うため、NF- $\kappa$ B の特異的阻害剤である TPCK を添加したのち、PDGF-AA の発現を ELISA 法にて測定したところ、TPCK を添加しなかったコントロール群に比べ、TPCK 添加群は PDGF-AA 分泌が有意に抑制されていた。さらに、この現象が転写レベルで調節されているのか否かについて Luciferase assay により検討したところ、磁気曝露群において NF- $\kappa$ B 活性の低下および AP-1 活性の増強がみられた。このことから、磁気曝露は OSCC における PDGF-AA の産生を転写レベルで抑制することが明らかとなった。

以上より、磁気曝露は OSCC における転写因子 NF- $\kappa$ B の活性を低下させることにより、PDGF-AA 産生を抑制し、癌の増殖進展にとって極めて重要な VEGF 産生を間接的に抑制する可能性が示唆された。しかしながら、磁気曝露は AP-1 活性を増強するという報告もあり、これら転写因子に対する磁気曝露の影響については、今後さらなる検討が必要である。

本研究の結果より、磁場が OSCC に与える影響を検討し、以下の結論を得た。

1. OSCC への磁気曝露によりタンパク質および遺伝子発現において PDGF-AA が抑制された。
2. NF- $\kappa$ B の活性が低下することにより PDGF-AA が抑制されることが確認された。
3. 磁気曝露により AP-1 の活性上昇が確認された。