

Title	Actin stabilization induces apoptosis in cultured porcine epithelial cell rests of Malassez
Author(s)	牛窪, 敏博
Journal	歯科学報, 117(2): 158-159
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/4224">http://hdl.handle.net/10130/4224</a>
Right	
Description	

氏名(本籍)	牛 窪 敏 博 (大阪府)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第 2118 号(乙第 792 号)
学位授与の日付	平成27年10月21日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Actin stabilization induces apoptosis in cultured porcine epithelial cell rests of Malassez
掲載雑誌名	International Endodontic Journal 第49巻 7号 663-669頁 2016年7月 doi: 10.1111/iej.12494
論文審査委員	(主査) 古澤 成博教授 (副査) 齋藤 淳教授 村松 敬教授 東 俊文教授 橋本 貞充教授

### 論文内容の要旨

#### 1. 研究目的

Malassez 上皮遺残は歯根形成時の Hertwig 上皮鞘に由来する細胞で、歯根膜のセメント質寄りの部位に存在している。刺激がなければ生涯、その位置にとどまるとされているが、根尖部に炎症が生じ、歯根嚢胞が形成される際にはその裏装上皮になることが知られている。裏装上皮の存在は歯根嚢胞の難治性につながるため外科的処置が対象となっているのが現状である。そこで本研究ではアクチンフィラメントを安定化させる jasplakinolide を Malassez 上皮遺残細胞に作用させた際の細胞活性の抑制とアポトーシスの誘導を検索した。

#### 2. 研究方法

実験にはブタ由来の Malassez 上皮遺残細胞(北海道医療大学 安彦善裕教授より供与)を用いた。細胞を96-well のディッシュに  $1 \times 10^4$  個ずつ播種した。細胞活性を検索するためには jasplakinolide を24時間作用させた後、WST-1 assay を行った。アポトーシスの検索のためには single strand DNA に対するモノクローナル抗体を用いた apoptosis assay により検出した。形態学的検索のためには jasplakinolide を24時間作用させた後、4%パラホルムアルデヒド溶液にて固定し、Alexa Fluor568 phalloidin と DAPI を用いて染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

#### 3. 研究成績および考察

細胞活性については jasplakinolide 添加群では濃度依存性に有意に低下しており ( $P < 0.01$ )、 $1 \mu\text{M}$  の濃度では低下が顕著となった。この結果をうけて  $1 \mu\text{M}$  で jasplakinolide の影響を検索した。アポトーシスについては jasplakinolide 処理群ではアポトーシスを生じた細胞が対照群と比較して有意に多く検出された ( $P < 0.01$ )。形態学的には対照群ではアクチンフィラメントが伸展する像が認められたが、jasplakinolide 添加群では細胞質の収縮と核の断片化が認められ、アポトーシスが生じたことが確認された。これらの結果からアクチンフィラメントの重合安定化により細胞活性の低下とアポトーシスの誘導が生じたと考えられた。

#### 4. 結論

Malassez 上皮遺残細胞において jasplakinolide によるアクチンフィラメントの安定化は細胞活性の抑制とアポトーシスを誘導した。

## 論文審査の要旨

本研究では Malassez 上皮遺残細胞に対してアクチンフィラメントを安定化(再構成の阻害)させる jasplakinolide を作用させた際の細胞活性とアポトーシスを検索したものである。その結果, jasplakinolide により, 細胞活性の低下とアポトーシスの誘導が示唆された。

本審査委員会は平成27年9月24日に行われ, 牛窪専攻生から論文内容の説明があり, その後, 各委員会からは以下の質問がされた。

1) プタとヒトとでは Malassez 上皮遺残細胞は同じ性質か, 2) Jasplakinolide は他の細胞にも作用するが大丈夫か, 3) アポトーシスの証明法について, 4) 臨床応用の可能性について, 5) Jasplakinolide を作用させた後のアクチンフィラメントの部位, などについて質問があった。

これらの質問に対して

1) ヒトの細胞との類似性は不明であるが, 先行論文で菌原性上皮に特有なタンパクを発現することが確認されており, ある程度の類似性を有していると考ええる。2) 他の細胞にもアクチンフィラメントはあるので作用するが, 病変を想定した時にはその部分がアポトーシスを起こせば後は生体が治癒に導いてくれると考えられる。3) 今回は形態学的変化と single strand DNA しかみていないが, DNA ラダーの確認やカスパーゼ活性といったアポトーシスをサポートする結果を出したほうが良いと考える。4) Jasplakinolide は作用が強いこともあり, 実際の臨床では使えないが, ジェネリック薬のように同様にアクチンを安定化させる作用をもつ薬剤が開発されれば, 水酸化カルシウムに代わる治療につながると考える。5) Jasplakinolide を作用させた細胞では突起はみられるものの, そこにはアクチンはなく, 核周囲にアクチンが集まっている。など概ね妥当な回答が得られた。また, さらには論文の構成, 図の構成, 用語の使い方, 次の論文につながる実験の要望が出された。

本論文は歯根嚢胞の新規治療法の可能性へつながる基礎研究と評価され, 本研究で得られた結果は, 今後の歯学の進歩, 発展に寄与するものであり, 学位授与に値すると判定された。