

Title	20 : Jasplakinolide がMalassez 上皮遺残細胞に及ぼす影響
Author(s)	小林, 史枝; 村松, 敬; 佐古, 亮; 佐野, 陽祐; 杉内, 亜紀奈; 月野和, 隆; 間, 奈津子; 末原, 正崇; 古澤, 成博
Journal	歯科学報, 114(5): 511-511
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/3445">http://hdl.handle.net/10130/3445</a>
Right	

## No.19: 骨格筋由来幹細胞を用いた低栄養性分化誘導による成長因子の発現について

浅川幸子, 山根茂樹, 梅澤貴志, 阿部伸一 (東歯大・解剖)

**目的:** 近年, 未分化な筋芽細胞を用いた筋管までの分化誘導について, 一度コンフルエントにしてからの低栄養性培地による分化誘導が試みられるようになった。その結果, 低栄養により分化誘導が促進され, その活性化についていくつかの面からの報告がなされている。我々の講座では, 筋の発育過程において発現する成長因子についてこれまで報告を行い, 筋芽細胞の分化に重要な関連をもつ因子を特定してきた。しかしながら, 低栄養下における成長因子の発現については報告も少なく不明な点が残されている。そこで今回, 当講座で作製した日本家兎頰粘膜筋層より採取した多分化能のある未分化な骨格筋筋芽細胞を用い, 栄養価の違いで培養条件を分け, それぞれにおいて, 筋芽細胞の分化程度の違い, 経時的な成長因子の発現について検索を行った。

**方法:** 試料として, 日本家兎頰粘膜から採取した多分化能のある未分化な骨格筋筋芽細胞を用いた。一度通常培地にてコンフルエントになるまで培養し

た。その後, 培養条件を2%ウマ血清による低栄養性培地0.3%による超低栄養性培地, コントロールとして通常培地にて培養した。筋の分化過程で発現するデスミンとコラーゲンタイプIVを観察するため免疫組織化学的染色, さらに成長因子の発現を確認するため, RT-PCR法を行った。

**結果および考察:** すべての条件において, デスミン, コラーゲンタイプIVの発現が確認された。成長因子は低栄養性, 超低栄養性培地では発現を確認できたが通常培地においては発現は僅かであった。今回の結果から筋芽細胞の分化において, 細胞増殖を促しコンフルエントにし, 飢餓状態になると分化期が始まると考えられた。また, 低栄養の状態を持続することで, 成長因子が増殖し, 分化を促進していると思われた。今回行ったウマ血清による超低栄養性培養は, 筋芽細胞の分化促進において非常に有効的であることも明らかとなった。今後は, さらに培養条件を検討し, 成長因子や細胞骨格タンパクなどの量的変化も検索していく予定である。

## No.20: Jasplakinolide が Malassez 上皮遺残細胞に及ぼす影響

小林史枝, 村松 敬, 佐古 亮, 佐野陽祐, 杉内亜紀奈, 月野和 隆, 間 奈津子, 末原正崇, 古澤成博 (東歯大・保存)

**目的:** 根尖性歯周炎の原因として根管内外の微生物感染及びその産生物が挙げられる。この原因に対する生体の防御反応として, Malassez 上皮遺残が増殖し, 歯根嚢胞の裏装上皮が形成されると, 難治性の一因となることがある。そこで本研究では抗真菌作用と actin の重合安定化による apoptosis 誘導作用を合わせもつ Jasplakinolide (以下, Jasp) を Malassez 上皮遺残細胞に作用させた際の細胞活性, apoptosis, 細胞形態の変化を検討した。

**方法:** 実験にはブタ由来 Malassez 上皮遺残細胞 (北海道医療大学・安彦教授より供与) を用いた。培地には DMEM (10% fetal bovine serum 添加) を使用し, 96well dish に  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 濃度の環境下で培養した。その後, Jasp (Calbiochem 社) を 1 μM の濃度で添加した。細胞活性の検討のためには, 24時間後 WST-1 試薬 (Roche 社) を添加し, 1時間インキュベートの後, マイクロプレートリーダー (450 nm) にて測定した。Apoptosis の検討のためには, 添加24時間後に4%パラホルムアルデヒド溶液

で固定し, ApoStrand ELISA Apoptosis Detection Kit (ENZO 社) を用いて検出した。細胞形態の変化を観察するためには Jasp を添加後, 24時間後に固定し, phalloidin 染色により, F-actin の観察, DAPI 染色により核の観察を蛍光顕微鏡にて行った。なお対照群には DMSO を添加したのものを用いた。

**結果および考察:** WST-1 assay では Jasp 添加群は対照群と比較して, 24時間後に有意に細胞活性が低下していた ( $P < 0.01$ )。また Apoptosis assay においては, Jasp 添加群は対照群と比較して, apoptosis を起こした細胞が多く検出された ( $P < 0.01$ )。細胞形態に関しては対照群では細胞突起や F-actin の伸長がみられたものの, 添加群では細胞が縮小し, F-actin の走行も断続的となっていた。また核の縮小と断片化がみられた。以上の結果から Malassez 上皮遺残細胞は Jasp 添加により F-actin の重合安定化が誘発され, 細胞活性の低下と apoptosis を生じることが明らかとなった。