

指導教授氏名	指導役割
印	研究の総括
印	
印	

## 学位論文要旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野	小児歯科学分野	身分	大学院生	氏名	角田 陽子
論文題名 マウス歯胚の発育に対する抗がん剤の影響についての組織学的および分子生物学的検討					
論文内容の要旨 (2000 字程度)					
<p><b>【目的】</b></p> <p>近年、医学の進歩により小児がん患者の約 8 割が治癒し、多くが青年期を迎えている。しかしながら、様々な晩期合併症が生じることがあり、代表的なものとして、低身長などの成長発達障害、内分泌器や消化器、循環器、生殖器の機能異常などが報告されている。一方、口腔内では、永久歯胚の欠損、歯根あるいは歯冠の形態異常を起こす頻度が高いことが知られている。これらは、がん治療に用いられる抗がん剤、アルキル化剤の投与や放射線照射が原因であることが示唆されているが、発症機序については十分に解明されていない。今回我々は、歯の形成に対する抗がん剤の影響についてマウス歯胚を用いて組織学的および分子生物学的検討を行ったのでこれを報告する。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>(1) 動物モデル  マウス実験は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科動物実験委員会の承認を得て行った。妊娠 16 日齢の ICR マウス雌より、実体顕微鏡下において胎児の下顎第一臼歯を採取し、実験に供試した。</p> <p>(2) 器官培養  胎生 16 日齢のマウスより下顎第一臼歯の歯胚を採取後、0.5%アスコルビン酸および 0.5%ペニシリン-ストレプトマイシン含有 BGJb Medium を用いて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下にて器官培養を行った。培養 1 日目にシクロフォスファミド製剤を 0.11 mg/ml, 0.21 mg/ml, 0.42 mg/ml の濃度に分けて添加した。培養液の交換は隔日で行い、培養 7 日目、14 日目および 21 日目における歯胚を実験に供試した。</p> <p>(3) 病理組織学的解析  下顎第一臼歯歯胚を 10%中性ホルマリンにて固定し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、エタノールを用いて脱水およびクロロホルムを用いて脱アルコールを行い、パラフィン包埋を行った。パラフィン包埋ブロックより薄さ 5 μm の連続切片を作製し、切片のヘマトキシリンエオジン (Haematoxylin-Eosin; HE) 染色による病理組織学的検討を行った。</p> <p>(4) 蛍光免疫組織学的解析  サイトケラチン 14, ビメンチン, I 型コラーゲン, フィブロネクチンの各タンパク発現の確認のため、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光二重染色法による蛍光免疫組織学的解析を行った。上記の方法で作製したパラフィン切片を用いて、一次抗体を使用し、4°C で一晩反応させた。翌日、各標識の二次抗体を用いて室温で遮光下にて各 40 分静置後、Hoechst 33342 solution により核染色を行った。蛍光免疫染色を行った切片を、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。</p>					

(5) 全 RNA の抽出

歯胚の RNA 抽出は Acid-guanidinium-phenol-chloroform 法に基づいておこなった。RNAagents®Denaturing Solution に歯胚を懸濁し、Sodium acetate, 2 M, pH 4.2 およびフェノール:クロロホルム 5:1 を添加し遠心分離を行った。この上清を採取し、3 M Sodium acetate および Ethachinmate, 100% Ethanol を添加した。さらに遠心分離を行い、得られた沈殿を 70% Ethanol にて洗浄して乾燥後、Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水に溶解させた。

(6) cDNA の合成

回収した全 RNA に、Oligo dt, dNTP mix, DEPC 処理水を添加し、65°C で 5 分間反応させた。1 分間氷上で静置した後、5×First-Strand Buffer, 0.1M DTT, RNase out, Super ScriptIII を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。

(7) リアルタイム PCR による定量的遺伝子解析

得られた cDNA を鋳型として、サイトケラチン 14, ビメンチン, I 型コラーゲン, フィブロネクチンの各タンパクをコードする遺伝子の発現量を SYBR green を用いた Real-time Quantitative Reverse transcription-PCR (Real-time qRT-PCR) 法により調べた。遺伝子増幅反応ならびに蛍光強度の測定には StepOnePlus™ を使用した。Real-time qRT-PCR の条件は添付の指し書に従い設定した。目的遺伝子の発現量は、 $\beta$ -actin を内部標準として補正した。

【結果および考察】

HE 染色の結果から、シクロフォスファミド製剤による歯胚形成への影響は、0.21 mg/ml 添加群ではエナメル芽細胞や象牙芽細胞の配列の乱れなど局所の細胞において認められ、0.42 mg/ml 添加群では歯胚の形態異常など歯胚の広範囲に影響が認められた。蛍光免疫染色の結果より、シクロフォスファミド製剤の添加により、サイトケラチン 14 と I 型コラーゲンは、培養 14 日目において発現の低下が認められ、また、ビメンチンとフィブロネクチンは、培養 21 日目において発現の低下が認められた。qRT-PCR の結果から、サイトケラチン 14 は、発現に有意な増加が認められた。ビメンチンは、培養 21 日目で発現に有意な低下が認められた。I 型コラーゲンは、培養 7 日目、14 日目で発現に有意な低下が認められたが、21 日目では有意な低下は認められなかった。フィブロネクチンは、培養 21 日目で、発現に有意な低下が認められた。

以上の結果より、シクロフォスファミド製剤により、エナメル芽細胞や象牙芽細胞が傷害されることで、配列に乱れが生じ、歯冠の形態異常、象牙質の形成量の低下などの組織学的な影響が現れることが示唆された。また、シクロフォスファミド製剤により、サイトケラチン 14 と I 型コラーゲンは鐘状期前期に影響が現れ、ビメンチンとフィブロネクチンは、鐘状期後期に影響が現れることが示唆された。

本研究から、歯胚形成期における抗がん剤の投与により、上皮組織と間葉組織の双方に影響を与え、抗がん剤の投与がマウスの歯胚の形成における歯冠の形成および歯根の形成に関与することが示唆された。