

氏名	角田 陽子		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5947号		
学位授与の日付	平成31年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	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		
論文審査委員	沢 禎彦 教授	岡元 邦彰 教授	中野 敬介 准教授

## 学位論文内容の要旨

### 論文内容の要旨（2000字程度）

#### 【目的】

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。

#### 【方法】

##### (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。

##### (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。

##### (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。

##### (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。

#### (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-Stand 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 の条件は添付の指示書に従い設定した。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。

## 論文審査結果の要旨

化学療法を経験した小児がんの長期生存者における永久歯の形成障害が問題となっている。化学療法プロトコルでも特に増殖細胞のDNA鎖にクロスリンクを発生させるアルキル化剤が原因とされるが、歯胚に対する作用機序は十分に解明されていない。今回我々は、アルキル化剤の一つであるシクロフォスファミドが歯の形成に与える影響について、マウス歯胚を用いて組織学および生化学的検討を行った。

本実験は、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。胎生16日齢のマウスより下顎第1臼歯の歯胚を180個採取後、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を0.11mg/ml, 0.21mg/ml, 0.42mg/mlの濃度でそれぞれ添加し、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。培養1日目、14日目、21日目における歯胚のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色を行った。その結果、0.21mg/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が認められ、0.42mg/ml添加群では、歯胚全体の発育不全が認められ、基底膜の破壊、エナメル芽細胞および象牙芽細胞の極性の低下や配列の乱れが顕著に認められた。この結果から、0.42mg/ml添加群では歯胚への影響が大きすぎると判断し、今後の実験は、シクロフォスファミドの濃度を0.21mg/mlに設定して行った。CK14, ビメンチン, I型コラーゲン, フィブロネクチンの発現を確認するため、蛍光免疫染色を行った。その結果、添加群におけるCK14とI型コラーゲンの発現は、非添加群と比較して、培養14日目で低下が認められ、ビメンチンとフィブロネクチンの発現は、培養21日目において低下が認められた。次に、歯胚の全RNAを抽出し、定量PCRを行った。その結果、非添加群と比較して、添加群におけるCK14の発現量は、培養7日目、14日目、21日目において有意な増加が認められ、ビメンチンおよびフィブロネクチンの発現は、培養21日目で有意な低下が認められた。I型コラーゲンの発現は、培養7日目、14日目で有意な低下が認められたが、21日目では認められなかった。CK14が、定量PCRでは有意な差が認められなかったことは、RNA抽出の際に周囲組織が混在したためと考えられた。また、フィブロネクチンの発現は、免疫染色では有意な差が認められなかったことは、歯胚におけるフィブロネクチンの発現が、内エナメル上皮直下の基底膜に限局しているため、検出できなかった可能性が高いと考えられた。これらの結果から、シクロフォスファミドが培養初期に作用することにより、I型コラーゲンとビメンチンの発現に影響を与えることが示唆された。

本研究から、シクロフォスファミドはおそらく内エナメル上皮細胞と歯乳頭細胞の正常な増殖と分化を阻害するため、そこから分化するエナメル芽細胞と象牙芽細胞の規則的配列とタンパク産生の障害を引き起す可能性が示唆された。

本論文は、アルキル化剤による永久歯形成障害のメカニズムを解明する上で重要な知見を示している。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。