

氏 名（本籍）： ^{おう}王 ^{えい}鋭

学 位 の 種 類： 博 士 （ 歯 学 ） 学 位 記 番 号： 歯 博 第 7 0 2 号

学位授与年月日： 平成27年3月25日 学位授与の要件： 学位規則第4条第1項該当

研究科・専攻： 東北大学大学院歯学研究科（博士課程）歯科学専攻

学位論文題目： 上皮－間葉細胞間相互作用による培養ヒトマラッセの上皮遺残細胞の細胞増殖とアポトーシス

論文審査委員：（主査）教授 熊 本 裕 行
教授 市 川 博 之 教授 菊 池 雅 彦

論文内容要旨

我々は、上皮細胞－線維芽細胞間相互作用によってエナメルマトリックスタンパク質およびそれらを分解するプロテアーゼがマラッセの上皮遺残細胞に強く発現し、セメント質の石灰化に關与する可能性を示唆してきた。これまでマラッセの上皮遺残が歯根膜中でアポトーシスを起こしているという報告がなされてきたが、セメント質形成におけるマラッセの上皮遺残の細胞増殖とアポトーシスに關する關係に關してはいまだ不明な点が多い。本研究では、マラッセの上皮遺残由来上皮細胞と歯根膜由来線維芽細胞を同一シャーレ内で共培養し、その細胞間相互作用による細胞増殖とアポトーシスの発現に關する検討を行った。抜歯した第三大臼歯より歯根膜組織片を採取し、無血清混合培地により同一組織片より上皮細胞および線維芽細胞を培養した。上皮細胞および線維芽細胞を回収し、同じディッシュ内に混培養した後、サンプルとして実験に用いた。細胞は、アポトーシスに關する Bcl-2 ファミリータンパクの Bax（アポトーシス誘導タンパク）と Bcl-2（アポトーシス抑制タンパク）の発現を免疫染色法および PCR 法で解析した。さらに、BrdU の核内取り込みによって細胞増殖を起こす細胞を確認するとともに、TUNEL 法にてアポトーシスを起こす細胞も確認した。免疫染色による解析では、アポトーシス抑制性タンパクの Bcl-2 は上皮細胞および線維芽細胞で弱く発現した。アポトーシス促進性タンパク Bax は上皮細胞で強く発現し、線維芽細胞で発現はみられなかった。エナメルマトリックスタンパクの Amelogenin と Ameloblastin は上皮細胞のみ培養したコントロールに比べ混培養したサンプルの方が強く染まった。また、PCR 法による解析では、Bax mRNA の発現は上皮細胞のみ培養したコントロールと比較して混培養したサンプルで有意に高かった（ $p < 0.01$ ）。その一方で、Bcl-2 mRNA の発現については、有意な差は認められなかった。混培養したサンプルの上皮細胞は線維芽細胞に比べ BrdU の取り込みが多くみられ、上皮細胞が強く増殖していることが確認された。また、上皮細胞のみのサンプルに比べ、混培養したサンプルの上皮細胞は BrdU の取り込

みが多く、上皮細胞がより強く増殖していることが確認された。混培養したサンプルの上皮細胞は TUNEL 陽性核を示す細胞が観察された。一方、線維芽細胞に TUNEL 陽性核を示す細胞は観察されなかった。また、TUNEL 法において混培養したサンプルの上皮細胞は上皮のみのサンプルと比較して強く染まった。これらの結果から、マラッセの上皮細胞は細胞増殖とともにアポトーシスを起こすことによって、ある一定の細胞集団を維持しつつセメント質の恒常性に関与することが示唆された。

審査結果要旨

著者は、上皮細胞—線維芽細胞間相互作用によってエナメルマトリックスタンパク質およびそれらを分解するプロテアーゼがマラッセの上皮遺残細胞に強く発現し、セメント質の石灰化に関与する可能性を示唆してきた。これまでマラッセの上皮遺残が歯根膜中でアポトーシスを起こしているという報告がなされてきたが、セメント質形成におけるマラッセの上皮遺残の細胞増殖とアポトーシスに関する関係に関してはいまだ不明な点が多い。本研究では、マラッセの上皮遺残由来上皮細胞と歯根膜由来線維芽細胞を同一シャーレ内で共培養し、その細胞間相互作用による細胞増殖とアポトーシスの発現に関する検討を行った。抜歯した第三大臼歯より歯根膜組織片を採取し、無血清混合培地により同一組織片より上皮細胞および線維芽細胞を培養した。上皮細胞および線維芽細胞を回収し、同じディッシュ内に混培養した後、サンプルとして実験に用いた。細胞は、Bax と Bcl-2 の発現を免疫染色法および PCR 法で解析した。さらに、BrdU の核内取り込みによって細胞増殖を起こす細胞を確認するとともに、TUNEL 法にてアポトーシスを起こす細胞も確認した。免疫染色による解析では、アポトーシス抑制性タンパクの Bcl-2 は上皮細胞および線維芽細胞で弱く発現した。アポトーシス促進性タンパク Bax は上皮細胞で強く発現し、線維芽細胞で発現はみられなかった。Amelogenin と Ameloblastin は上皮細胞のみ培養したコントロールに比べ混培養したサンプルの方が強く染まった。また、PCR 法による解析では、Bax mRNA の発現は上皮細胞のみ培養したコントロールと比較して混培養したサンプルで有意に高かった ($p < 0.01$)。その一方で、Bcl-2 mRNA の発現については、有意な差は認められなかった。混培養したサンプルの上皮細胞は線維芽細胞に比べ BrdU の取り込みが多くみられ、上皮細胞が強く増殖していることが確認された。また、上皮細胞のみのサンプルに比べ、混培養したサンプルの上皮細胞は BrdU の取り込みが多く、上皮細胞がより強く増殖していることが確認された。混培養したサンプルの上皮細胞は TUNEL 陽性核を示す細胞が観察された。一方、線維芽細胞に TUNEL 陽性核を示す細胞は観察されなかった。また、TUNEL 法において混培養したサンプルの上皮細胞は上皮のみのサンプルと比較して強く染まった。これらの結果から、マラッセの上皮細胞は細胞増殖とともにアポトーシスを起こすことによって、ある一定の細胞集団を維持しつつセメント質の恒常性に関与することが示唆された。

以上の研究結果により、本論文は、博士（歯学）の学位授与に値するものと判定された。