

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861606

研究課題名(和文) マラッセ上皮遺残アポトーシス誘導による歯根嚢胞の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatments for radicular cyst by inducing apoptosis in cultured porcine epithelial cell rests of Malassez

研究代表者

間 奈津子(AIDA, NATSUKO)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90615379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：Jasplakinolideをマラッセ上皮遺残由来細胞に作用させた際の細胞活性、アポトーシス、細胞形態の変化を検討した。ブタマラッセ上皮遺残細胞を使用し、10%FBS, 1%Penicillin-streptomycin添加したD-MEMにて培養した。

細胞活性とアポトーシスの検索のために吸光度の測定を行った結果、ブタマラッセ上皮遺残細胞にJasplakinolideを反応させると、アクチン重合安定化が起こり、細胞活性の低下、アポトーシスの促進が起こった。このことより裏装上皮のアポトーシスを標的とした歯根嚢胞の治療への発展が見込まれた。

研究成果の概要(英文)：Cell activity, apoptosis and change in cell shape applying Jasplakinolide on porcine epithelial cell rests of Malassez, apoptosis were researched. ERM derived from porcine were spread in a 96-well dish using Dulbecco's modified Eagle's medium. The actin-specific stabilization reagent, jasplakinolide, was incorporated into the culture medium and incubated for 24 h. To evaluate cell viability, the WST-1 assay was carried out and absorption (450 nm) was measured. To detect apoptotic cells, monoclonal antibody to single-strand DNA was used and absorption (405 nm) was measured.

Cell viability decreased in a concentration dependent manner, and cell viability in the jasplakinolide-treated ERM was lower than that in nontreated ERM. Apoptotic cells in the jasplakinolide-treated ERM were more frequently detected compared to that in nontreated ERM. Actin stabilization by jasplakinolide inhibited cell viability and induced apoptosis in epithelial cell rests of Malassez.

研究分野：歯内療法学

キーワード：歯内療法学 マラッセ上皮遺残 アポトーシス jasplakinolide

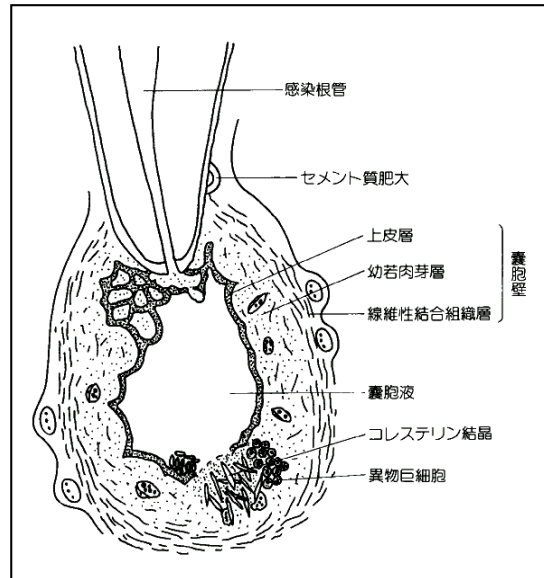
1. 研究開始当初の背景

根尖孔外に炎症が波及し、通常の根管治療を行っても治療が奏功しない難治性根尖性歯周炎は、日常臨床においてしばしば遭遇するが、歯根尖切除術や抜歯に至る症例も少なくない。難治性根尖性歯周炎の多くは原因が除去されず、いつまでも残っているために炎症が持続していると想定されるが、そこには様々な要因が関係してくる。これらの原因として根尖孔外における細菌感染が考えられる。すなわち根尖孔にバイオフィーム形成がみられる症例は通常の歯内療法による根管形成や根管洗浄では除去が難しく、治癒しないため、根尖部外科処置の必要がある。従来は細菌や真菌は根尖病変内では生育できないと言われていたが、現在では根尖病変内において菌塊を形成することも確認されている。根尖孔外バイオフィームの解析は行われつつあるが、未解明の部分が多い。難治性根尖性歯周炎罹患歯の根尖孔外バイオフィーム構成細菌には、*Actinomyces israelii* や *Propionibacterium propionicum*, *Fusobacterium nucleatum* があげられるが、これ以外にも *Candida albicans* などの真菌が検出されたとの報告があり (Sen et al., *Endod Dent Traumatol* 1995; Molander et al., *Int Endod J* 1998; Pinheiro et al, *Int Endod J* 2003) 性質的に強アルカリ環境下でも生存可能であることから真菌感染は難治性となることが推測される。

根尖性歯周炎では生体の防御反応として、病変部にマラッセの上皮遺残に由来する上皮に由来する上皮が進展し、経過が長くなると膿瘍部分や病変部を上皮が取囲み、組織が壊死に陥ることで歯根嚢胞が形成される。歯根嚢胞は通常の根管治療では予後が悪く、その治療法としては外科的歯内療法である歯根尖切除術が選択されることが多いが、抜歯に至ることも多く、患者にとっては侵襲が大きいだけでなく、抜歯となった場合、全身状態や QOL に大きく影響することが想定され、嚢胞の治療法を開発することは急務である。歯根嚢胞が通常の根管治療で予後不良となる理由のひとつは裏装上皮の存在があげられる。上皮は生体の外部環境と内部環境を分ける組織であり、根尖病変の場合、生体内で形成された壊死物質、膿瘍、感染巣などを外部環境と同様の状態にしようとして出てくるものと推測され、これも生体の防御反応であることは言うまでもないが、その一方で根管治療薬でアプローチしようとしても上皮や嚢胞腔内の内溶液の存在により薬剤の効果が妨げられていることも事実である。これらの研究背景から申請者は難治性根尖性歯周炎に対して、1) 抗真菌薬の奏功、2) 裏装上皮の除去、が可能になれば治癒の促すことができると着想した。

一方、Jasplakinolide は当初、抗真菌薬として開発されたが、種々の組織をアポトーシスに誘導することが報告されている (Okada et al., *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000; Matsuki-FukushimaM et al., *Arch Oral Biol.* 2012) によるアクチンの重合阻害をマラッセ上皮遺残に応用し裏装上皮にアポトーシスを誘導することで歯根嚢胞形成メカニズムさらにはそれを阻止する処置法の解明を行う。

上皮組織の浸潤した根尖性歯周炎である本研究では歯根嚢胞を想定し、上皮細胞への真菌の与える影響を解析し、さらにはマラッセの上皮遺残に由来する裏装上皮にアポトーシスを誘導することで、歯根嚢胞形成メカニズムさらにはそれを阻止する新規処置法の解明を目指す。



研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか。難治性根尖性歯周炎、特に歯根嚢胞を想定した研究とする。根尖孔外に感染が確認される細菌は多岐に渡り歯周病原性細菌を多く認めるが、真菌も原因の一つである。また歯根嚢胞ではマラッセ上皮遺残に由来する裏装上皮の存在も原因と考えられる。それらを考察し、本研究では抗真菌薬を使用し真菌を抑制、なおかつ Jasplakinolide によるアクチンの重合阻害をマラッセ上皮遺残に応用し裏装上皮にアポトーシスを誘導することで歯根嚢胞形成メカニズムさらにはそれを阻止する処置法の解明を行う。

当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点は、歯根嚢胞形成メカニズムさらにはそれを阻止する処置法の解明のために、原因菌の抑制と裏装上皮のアポトーシ

ス誘導による破壊の 2 つの側面から研究を進める。歯根嚢胞の原因の一つである歯周病原性菌には様々な細菌が存在するが、本研究では真菌である *Candida albicans* の抑制について検討する。また、マラッセ上皮遺残細胞のアポトーシス誘導が確実に行われているか様々な側面から検討を行う。しかし、根尖周囲組織の治癒も同時に行うことが理想であり、マラッセ上皮遺残細胞を特異的にアポトーシス誘導することが必須となる。そのため、裏装上皮のアポトーシス誘導を検討した後、その他の細胞、特に線維芽細胞でのアポトーシス誘導が起きないことを確認検討する必要がある。このことから、本研究を大きく分けて 3 つのステージで進める。

抗真菌薬を用いた真菌の抑制を検討する  
Jasplakinolide 処理後の裏装上皮アポトーシスの誘導を検討する

裏装上皮を特異的にアポトーシス誘導できるかどうか、線維芽細胞を用いて比較検討する

難治性根尖性歯周組織炎、特に歯根嚢胞の病態形成に関わるメカニズムは未だ未解明の部分が多い。従来通りの根管治療では治癒が見込めず、我々歯科医師にとっても治療困難な症例となる。

そのため、外科的歯内療法を行い歯根端切除することで治癒を目指すのが、患者にとって外科的な治療は侵襲も大きく、精神的、肉体的に負担がかかる。裏装上皮細胞への歯周病原性菌、真菌の与える影響を解析することで、歯根嚢胞形成メカニズム、さらにはそれを阻止する治療の解明につながる。すなわち外科的歯内療法を行わず、難治性根尖性歯周組織炎の治癒を期待できる治療法を構築することで、患者の満足度の高い歯科治療を行うことが可能であると共、患者の QOL を高めることが期待できる。

## 2. 研究の目的

根尖性歯周炎の中でも通常の歯内療法では治癒困難な症例は難治性根尖性歯周炎とよばれ、やむなく抜歯に至る症例も多く、その結果、全身状態や QOL に大きく影響することが想定される。その原因には種々のものがあるが、根管内外の細菌感染およびその産生物だけでなく、近年では真菌感染も一因であると報告されている。また原因に対する生体の防御反応として歯根嚢胞が形成されることがあるが、この際に出現する裏装上皮の存在も難治性の一因を担っていると考えられている。本研究では難治性根尖性歯周炎の原因となる真菌感染と裏装上皮に注目し、抗真菌薬の性質を利用した新規治療法の確立を目指すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

試料として、ブタマラッセ上皮遺残細胞を培養する。抗真菌性を検討するために OD 値 600 を確認し濁度から至適濃度を決定する。裏装上皮にアポトーシスを誘導するため Jasplakinolide の至適濃度を検討し、アポトーシスが起る濃度を確認する。WST-1 で細胞活性の減少を確認後、アポトーシスを Caspase-3、フローサイトメータ (PI 染色)、TUNNEL 染色で確認する。また裏装上皮を特異的にアポトーシス誘導できるか線維芽細胞での確認を行うことで、歯根嚢胞形成メカニズムさらには、それを阻止する処置法の解明を目指す。

歯根嚢胞形成メカニズムさらにはそれを阻止する処置法の解明のために、

抗真菌薬を用いた真菌の抑制を検討する  
Jasplakinolide 処理後の裏装上皮アポトーシスの誘導を検討する

裏装上皮を特異的にアポトーシス誘導できるかどうか、線維芽細胞を用いて比較検討する。

## 4. 研究成果

Jasplakinolide をマラッセ上皮遺残由来細胞に作用させた際の細胞活性、アポトーシス、細胞形態の変化を検討した。ブタマラッセ上皮遺残細胞を使用し、10% FBS, 1% Penicillin-streptomycin 添加した D-MEM にて培養した。

細胞活性とアポトーシスの検索のために吸光度の測定を行った結果、ブタマラッセ上皮遺残細胞に Jasplakinolide を反応させると、アクチン重合安定化が起こり、細胞活性の低下、アポトーシスの促進が起こった。このことより裏装上皮のアポトーシスを標的とした歯根嚢胞の治療への発展が見込まれた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Aida N., Ushikubo T., Kobayashi F., Sako R., Suehara M., Furusawa M., Muramatsu T.

Actin Stabilization Induces Apoptosis in Cultured Porcine Epithelial Cell Rests of Malassez.

IEJ 49(7):663-669, 2016.

DOI: 10.1111/iej.12494

〔学会発表〕(計 1 件)

Muramatsu T., Aida N., Ushikubo T., Kobayashi F., Sako R., Suehara M., Furusawa M.

Jasplakinolide induces apoptosis in epithelial cell rests of Malassez.

93<sup>rd</sup> International Association for Dental Research (IADR) General Session. Boston, USA, 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

間 奈津子 (AIDA, Natsuko)  
東京歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：90615379

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )