



Title	歯科領域で使用される物質の神経幹細胞分化、増殖に対する作用
Author(s)	工藤, 千穂
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45154
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 工 藤 千 穂

博士の専攻分野の名称 博士 (歯 学)

学 位 記 番 号 第 1 8 5 9 4 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 16 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

歯学研究科統合機能口腔科学専攻

学 位 論 文 名 歯科領域で使用される物質の神経幹細胞分化、増殖に対する作用

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 丹 羽 均

(副査)

教 授 上 崎 善 規 助 教 授 岡 橋 暢 夫 講 師 渥 美 友 佳 子

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

神経幹細胞 (Neural Stem Cells, NSCs) は哺乳動物の胎児脳より単離され、中枢神経系を構成する細胞群の起源として注目されている細胞である。この細胞は、自己複製能、多分化能という特有の性質を有しており、これらの性質により、中枢神経系の発達に重要な役割を果たしていると考えられている。よって、この NSCs に対してさまざまな薬物や化学物質がどのような作用を及ぼすのかを検討することは、それらの中枢神経系発達に及ぼす影響を推測する上で有用であると考えられる。そこで本研究では、歯科領域を含め臨床において広く使用されている非ステロイド性抗炎症薬 (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, NSAIDs) や、歯科治療において窩洞充填等に多用されるレジン原料に含まれるビスフェノール等の内分泌攪乱物質 (Endocrine Disruptors, EDs) の NSC に対する影響について比較検討した。

実験 I. NSAIDs の NSCs に対する影響

【方法】

胎生期 14-16 日のマウス胎児脳より単離し、Neurosphere 法により継代培養した NSCs に、5 種類の NSAIDs (Diclofenac, Aspirin, Naproxen, Indomethacin, Ibuprofen) をそれぞれ処置し、poly-L-ornithine/laminin coated plate で培養したものを実験に使用した。NSAIDs の NSCs 増殖に対する影響は MTT assay にて検討した。ニューロンへの分化に対する作用については、特異的マーカーである抗 MAP2 (microtubule associated protein 2) 抗体で免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。また、Diclofenac によるアポトーシス誘導の検討は Hoechst33342 によるクロマチン染色、抗 cleaved caspase-3 抗体によるウェスタンブロッティング法にて行った。

【結果及び考察】

Diclofenac, Aspirin, Naproxen, Indomethacin, Ibuprofen 10 μ M をそれぞれ処置したところ、Diclofenac 処置群のみに細胞増殖の抑制が認められた。一方、他の NSAIDs では神経突起伸長、細胞増殖傾向が見られた。このような Diclofenac による増殖抑制は 3 μ M から濃度依存的に増加した。また免疫染色により、Diclofenac は濃度依存的に MAP2 の発現を抑制していることが確認された。さらに、Diclofenac を 6 時間処置したところ、30 μ M 以上で cleaved caspase-3 の発現が増加し、Diclofenac 60 μ M を 24 時間処置した NSCs においては核の凝縮が見られた。以上の結

果より、今回検討した5種類のNSAIDsのうち、Diclofenacは他のNSAIDsとは異なり、カスパーゼカスケード系を介してアポトーシスを誘導することにより、NSCsの増殖、ニューロンへの分化を抑制していることが示唆された。

実験Ⅱ. EDsのNSCsに対する影響

【方法】

実験Ⅰと同様に継代培養したマウスNSCsに、5種類のEDs(4-nonylphenol, bisphenol A, phthalic acid di-n-butyl ester、phthalic acid benzyl n-butyl ester、phthalic acid di (2-ethylhexyl) ester)をそれぞれ処置し、poly-L-ornithine/laminin coated plate上で培養したものを実験に使用した。EDsのNSCs細胞増殖に対する影響はMTT assayにて検討した。また、アポトーシス誘導の検討はHoechst33342によるクロマチン染色、TUNEL法によるDNA断片化の検出、抗cleaved caspase-3抗体によるウェスタンブロッティング法、DEVD-AMC法にて行った。さらに、細胞周期に対する作用の検討は抗cyclin抗体によるウェスタンブロッティング法、フローサイトメトリーにて行った。

【結果及び考察】

5種類のEDs 0.1~30 μ Mをそれぞれ処置したところ、どのEDsにおいても濃度依存的に細胞増殖抑制が認められた。このうち4-nonylphenolは他のEDsと比較して、低濃度から増殖抑制を引き起こした。4-nonylphenolについてさらに検討を行ったところ、濃度依存的にcleaved caspase-3の発現及び酵素活性の増加、核の凝縮、DNA断片化が観察された。さらに、細胞周期のG2/M期に関係するcyclin A, B1の発現の抑制、またG2/M期における細胞集積が認められた。以上の結果より、今回検討した5種類のEDsのうち、4-nonylphenolは低濃度でカスパーゼカスケード系を活性化し、また細胞周期を制御することによりアポトーシスを誘導し、NSCsの分化・増殖に影響を与えることが示唆された。

【結論】

今回検討したNSAIDs、EDsのうち、特にDiclofenac、4-nonylphenolがNSCsの分化・増殖・生存に影響を与えたことより、これらの薬物、化学物質は中枢神経系の発達の初期段階において、その分化・増殖に影響を及ぼす可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、現在注目されているマウス胎児脳より単離した神経幹細胞を用い、この細胞の分化・増殖・生存に対する非ステロイド性抗炎症薬や内分泌攪乱物質の作用について検討したものである。

その結果、検討した薬物や化学物質のうち、特にジクロフェナク、4-ノニルフェノールが神経幹細胞の分化・増殖に抑制的に作用し、またアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

神経幹細胞は中枢神経系を構成する細胞群の起源として重要な役割を果たしているといわれている。したがって、本研究の結果はこれらの薬物、化学物質が中枢神経系の発達段階に与える影響を推測する上で極めて重要な示唆を与えるものであり、博士(歯学)の学位申請に値するものである。