

<学会記録>25. スナネズミp53遺伝子の単離と酵母を用いたその機能的変異検出法の確立(東日本歯学会第18回学術大会一般講演抄録)

著者名(日)	青山 哲也, 小林 徳栄, 中田 大地, 永易 裕樹, 河野 峰, 中田 敏之, 有末 眞
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	19
号	1
ページ	130-131
発行年	2000-06-30
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00008520/

24. 北海道医療大学歯学部保存科において研修医が行った 歯内治療の成績について

○塚越 慎, 川上 智史, 原口 克博,
尾立 達治, 荆木 裕司, 高橋 美晴,
矢吹 恵美, 藤井 博志, 島袋 智広,
松田 浩一

(北海道医療大学歯学部歯科保存学第二講座)

臨床研修医がスタートして2年が経過したが, これまでの臨床研修医の研修カリキュラムを基礎として完全義務化に向けその改善を目的として, 今回, 臨床研修医が行った歯内治療の成績について調査を行った。

【材料と方法】臨床研修医4名が行った歯内治療症例に18項目について調査を行い臨床研修医, 指導医が考察を行った。

【結果】抜髄症例91歯, 感染根管症例62歯であり, 平均年齢は, 抜髄症例で30.6歳, 感染根管症例で34.0歳であった。治療回数は, 抜髄症例で平均4.1回, 治療期間の平均が32.2日, 感染根管症例では平均5.3回, 治療期間の平均が35.6日であった。抜髄症例の治療回数4回以下のは66症例, 5回以上のは25症例であった。感染根管症例の治療回数5回以下のは40症例, 6回以上のも

のは22症例であった。診断名では, 抜髄症例で慢性潰瘍性歯髄炎が多く, 感染根管症例で慢性根尖性歯周炎が多かった。

【考察】抜髄症例, 感染根管症例の患者の平均年齢がそれぞれ30.6歳, 34.0歳と低年齢である。これは全学の学生の歯科診療に対するシステムの中で臨床研修医に担当を行ったためだと思われる。治療回数が抜髄症例で4.1回, 感染根管症例で5.3回と, 両者に1.2回の差しかみられなかったのは術者が臨床研修医であり技術的未熟さによると思われる。抜髄症例で治療回数5回以上, 感染根管症例6回以上のは術者位, 患者位など臨床経験の不足, 根管形態など治療難易度により治療回数が多くなったと思われる。

25. スナネズミ p53遺伝子の単離と酵母を用いたその機能的変異検出法の確立

○青山 哲也, 小林 徳栄, 中田 大地,
永易 裕樹, 河野 峰, 柴田 敏之,
有末 眞

(北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座)

近年, 発癌と炎症との関連が注目されている。その中でスナネズミは, H pylori感染させることにより胃炎, 胃癌生じる動物実験モデルとして知られている。そこで, 今回この炎症による発癌機序を解明するためにスナネズミ p53機能異常を検出する酵母アッセイ法の開発を目的として実験を行った。

【方法・結果】p53の種間保存領域にプライマーを設定し, 肝由来RNAを用いてRT-PCR法により, DNA結合領域を含む約900bpを単離した。これを元にしてRACE法を行い1173bpからなるスナネズミ p53のcDNA全長配列を決定した。一方, 酵母内ヒト p53発現ベクター-pLS76の野生型p53のcDNA部分をHindIIIとEagIで完全消化して削除し, これにスナネズミ p53のcDNAをT4リカーゼにより組込みスナネズミ p53発現ベクターを作製し

た。このスナネズミ p53発現ベクターのスナネズミ p53 cDNAの塩基配列を調べたところコーティング領域の塩基配列は全て野生型のそれと一致した。このスナネズミ p53cDNAのDNA結合ドメインを中心とするギャップを入れたベクターを検体由来のp53RT-PCR産物とともに酵母yIG397に導入し相同組換えをおこさせた。本法ではp53蛋白がレポーター遺伝子ADE2の転写をon/offすることにより酵母コロニーの色が赤(変異型)または白(野生型)となる。変異型と野生型p53を種々の比率で混ぜ合わせ本アッセイを行った所, 赤コロニー比率と変異型p53の比率との間に定量的直線関係が得られた。また, 7週齢のスナネズミの種々の正常組織由来のPCR産物について酵母アッセイを行ったところ, 約2.2~10%の赤コロニーが出現した。この値は, ヒトやラットのハックク

ラウンドにほぼ等しく、赤コロニーはギャップベクターの再結合またはPCRのエラーであることが確認された。これらの結果、スナネズミp53遺伝子を単離し、酵母を

用いたその機能的変異検出法が有効であることが証明された。今後、このアッセイ法を用いて発癌実験に応用していくことを検討している。

26. マウス線維肉腫のサイモシン β 4の発現増強に伴う炎症依存性悪性化進展

○小林 徳栄, 柴田 敏之, 永易 裕樹,
河野 峰, 中田 大地, 青山 哲也,
有末 眞

(北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座)

【目的】我々は、癌細胞が炎症により悪性化進展することをマウス線維肉腫細胞を用いて、明らかにしてきた。今回、この悪性化進展機序を明らかにするために、悪性化進展に伴い発現増強する遺伝子の解析を行った。

【方法と結果】C57/BL6マウス線維肉腫細胞由来のQR癌細胞は、正常同系宿主での造腫瘍性・転移能の極端に低下している細胞であり単独で皮下移植及び尾静脈内移植しても腫瘍形成を起こさない。また、肺への転移も認められない。しかし、QR癌細胞は炎症の存在下で増殖能・転移能を獲得し悪性化進展を引き起こすことがこれまでに明らかとなっている。そこで、両者のQR癌細胞をdifferential display法を用いて、発現増強する遺伝子を検索した。その結果、サイモシン β 4、カルサイクリン、ヴィメンチンの発現増強が観察された。特にこの3つの中でアクチン重合を調節するサイモシン β 4の発現変化

がこの炎症によって悪性化した細胞株で著明であった。しかし、カルサイクリン、ヴィメンチンには、発現変化は見られなかった。そこで、サイモシン β 4を悪性化の低いQR-32癌細胞にセンスを、最も悪性化の高いQRsP-41癌細胞にアンチセンスをトランスフェクションし動物実験を行ったところ、センストランスフェクタントでは肺への転移が増強し、アンチセンストランスフェクタントでは皮下増殖能および肺への転移が有意に減弱した。

【総括】サイモシン β 4は、炎症により悪性化進展したQR癌細胞において発現増強する遺伝子であることが示された。また、サイモシン β 4の発現増強が悪性化進展を起こすひとつの因子となると考えられた。今後は、in vitroにおいてサイモシン β 4が癌細胞に対する影響を検討していく。

27. PI3-Kは口腔扁平上皮癌細胞の浸潤突起形成を制御している

○萩野 司, 奥村 一彦, 中村 公則,
木下 隆二, 茂尾 公晴, 金澤 正昭

(北海道医療大学歯学部口腔外科学第一講座)

口腔扁平上皮癌細胞の初期浸潤過程を検討するために、基質分解・浸潤アッセイを用いた。この際に観察される浸潤突起の形成に、脂質キナーゼであるPI3-Kが関与していることを明らかにしたので報告した。

【方法と結果】ヒト舌扁平上皮癌細胞SASから得られた高浸潤性クローンSAS-H1を用いた。1)血清刺激によって局所の基質分解能が促進し、浸潤突起が観察されたが、PI3-K阻害剤であるwortmannin, LY294002の処理により、浸潤突起形成が抑制された。2)抗PI3-Kp85抗

体による蛍光免疫染色による観察では、未刺激時で細胞質にび漫性の局在を示すが、刺激時ではPI3-Kが浸潤突起に局在を示すようになった。3)血清刺激時のPI3-K活性を検討したところ、浸潤突起分画に高い活性を認めた。

【結論】初期浸潤過程で観察される癌細胞の浸潤突起の形成には、PI3-Kによる制御機構が示唆され、さらに、浸潤突起はPI3-Kをはじめとするシグナル分子にとって効率のよいmolecular frameworkを提供していることが推測された。