

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 竹内 亮祐
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第414号
学位授与の日付 平成31年3月25日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Immunohistochemical and gene expression analysis of Glut1 and Runx2 in reparative dentin formation during dental pulp wound healing
(歯髄創傷台癒時の修復象牙質形成における Glut1 と Runx2 の免疫組織化学的および遺伝子発現解析)
論文審査委員 主査 教授 吉羽 邦彦
副査 教授 野杵 由一郎
副査 教授 大島 勇人

博士論文の要旨

【目的】露髄した場合の多くは根管治療が施され、その結果、歯根破折の発生率が高まるが、それを避けるために近年、歯髄保存療法が選択されている。Mineral trioxide aggregate (MTA)は、覆髄材料の一つであり、細菌感染を抑制し修復象牙質形成を促進させるが、ヒトではその形成に約3か月の期間が必要なことから感染のリスクに晒されるため、歯髄保存療法の成功率低下に繋がる。したがって、短期間で硬組織再生を目指した新しい歯髄保存療法の開発が必要であると考えられる。

エネルギー源であるグルコースは、グルコーストランスポーター(Glut)と呼ばれる膜貫通型タンパク質を介して輸送される。そのうちのGlut1は骨芽細胞で発現し、runt related transcription factor (Runx) 2との相互作用によって分化促進に関与する。Runx2は骨芽細胞や象牙芽細胞の分化を制御し、骨形成や象牙質形成に関与する。以上の知見から、歯髄創傷台癒過程において歯髄細胞から象牙芽細胞系細胞への分化とその後の修復象牙質形成の制御には、Glut1とRunx2との相互作用が関与していると予想されるが、未だ不明である。そこで本研究では、歯髄創傷台癒過程で展開される象牙芽細胞系細胞への分化と修復象牙質形成にGlut1-Runx2連関が関与していると仮説を立て、免疫組織化学染色および遺伝子発現解析を用いて、MTA断髄後の修復象牙質形成におけるGlut1およびRunx2の発現様式を時空間的に検証することを目的とした。

【材料と方法】本研究は新潟大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号: SA00212)。8週齢雄Wistar系ラットの左側上顎第一臼歯に対して、ラウンドバーで近心の根管口部まで窩洞形成し、次亜塩素酸ナトリウムと過酸化水素、さらに滅菌生理食塩水で洗浄後にMTA断髄を行った。処置後1-14日後のモデルラットに対して灌流固定を行い、パラフィン切片を作製し以下の実験を行った。反対側の右側上顎第一臼歯を対照群として用いた。

・免疫組織化学染色：正常歯髄でのGlut1の局在解析を行うために、血管内皮細胞のマーカーであるRECA-1、シュワン細胞のマーカーであるS-100 β -subunit、さらに象牙芽細胞のマーカーであるNestinに対する抗体を用いた蛍光抗体二重染色を行った。続いてGlut1、Runx2およびmTORの歯髄創傷台癒過程における時空間的な変化を解析するために酵素抗体法、あるいはNestin特異的抗体を用いた蛍光抗体二重染色を行った。

・遺伝子発現解析：Slc2a1 (Glut1の遺伝子)、Runx2、Nestin、およびMtorに対する歯髄創傷台癒時のmRNA発現量について、モデルラットの処置歯を試料としたリアルタイムPCR法を用いて解析した。正常歯髄との経時的変化を β -actinを内部標準としてDunnett's test(有意水準1%以下)による統計学的比較解析を行った。

【結果および考察】正常歯髄におけるGlut1の免疫染色では、RECA-1、S-100およびNestinの陽性部位と一部一致する所見を示し、Glut1を介したグルコースの輸送経路が血管内皮細胞、シュワン細胞および象牙芽細胞に備わっていることが示された。

MTA断髄1日後では、Glut1の陽性細胞は創傷部直下には認められなかったが、3日後にはその発現を認め、5-7日後では修復象牙質直下に整列する象牙芽細胞系細胞に対してGlut1陽性反応がみられた。Runx2は断髄3-7日後にかき、歯髄細胞の核内に陽性反応を認めた。また、象牙芽細胞系細胞への分化が終了する断髄5日後の創傷部にお

いて、Glut1 と Nestin との二重陽性反応が認められた。さらに mTOR の免疫染色では象牙芽細胞様細胞と歯髄細胞の両方に陽性反応を認めた。 *Slc2a1*、 *Runx2*、 *Nestin* および *Mtor* の mRNA 発現レベルは対照群と比較して、断髄 3 日後あるいは 5 日後をピークに有意に上昇した。以上の結果から歯髄創傷治癒過程において Glut1 と Runx2 との相互作用によって歯髄細胞から象牙芽細胞様細胞への分化と、その後の修復象牙質形成に関与していることが示唆された。さらに、歯髄細胞の分化や石灰化に関与している mTOR も Glut1 を介して相互作用していることが示唆され、歯髄創傷治癒への関与が考えられる。

【結論】象牙芽細胞、血管内皮細胞、およびシュワン細胞において Glut1 の発現を認めた。また、修復象牙質直下に整列する象牙芽細胞様細胞には Glut1、Runx2 および mTOR の局在が認められた。さらに、*Slc2a1*、*Runx2*、*Nestin* および *Mtor* の mRNA 発現は MTA 断髄後の歯髄において有意に上昇した。

審査結果の要旨

深在性の齦蝕虫や外傷によって歯髄が傷害されると修復機構が自動的に、歯髄細胞から象牙芽細胞様細胞へと分化し、修復象牙質形成が誘導される。しかしその詳細なメカニズム、特に象牙芽細胞様細胞への分化に関連するシグナル伝達とその制御機構については不明のままである。Glucose transporter (Glut) 1 は、グルコースを輸送する輸送担体の 1 つであり、骨芽細胞の主要栄養素であるグルコースの取り込みに関与している。このグルコースの取り込みが分化に必須の転写因子である runt-related transcription factor (Runx) 2 を介して骨芽細胞の分化を促進させるとともに、mammalian target of rapamycin (mTOR) を介した別のメカニズムによって骨形成も促進させることが報告されている。

骨芽細胞と類似の分化過程を有する象牙芽細胞様細胞においても、Glut1 と Runx2 との相互作用による分化機構が存在する可能性が推測されるが、これまで報告はなく明らかとされていない。そこで本研究では、歯髄創傷治癒過程における細胞分化と修復象牙質形成のメカニズムの解明の一端として、歯髄創傷治癒モデルラットにおける、Glut1 と Runx2 ならびに関連因子の発現を免疫組織化学染色および遺伝子発現解析により検索した。

MTA 断髄 1 日後では、Glut1 陽性細胞は創傷部直下には認められなかったが、3 日後、歯髄組織内の細胞が Glut1 陽性反応を示した。5-7 日後、断髄部直下で Glut1 と Runx2 の二重陽性を示す象牙芽細胞様細胞が確認されるとともに、Glut1 と Nestin (象牙芽細胞マーカー) との二重陽性反応が認められた。遺伝子発現解析において *Slc2a1* (Glut1 の遺伝子) の mRNA 発現レベルは対照群と比較して 3 日後に、また *Runx2*、*Nestin* および *Mtor* は 5 日後をピークに有意に上昇した。以上の結果は、歯髄創傷治癒において Glut1 の発現増加によるグルコース供給量の増加が、Runx2 との相互作用による象牙芽細胞様細胞への分化や、mTOR を介したコラーゲンの合成を抑制している可能性を示唆している。

以上、本研究は、歯髄創傷治癒における細胞分化と修復象牙質形成のメカニズムの一端をグルコースの輸送担体である Glut1 に着目し、その解明を試みたものである。その結果、歯髄創傷治癒時において、創傷部での Glut1、Runx2 および mTOR の発現の上昇が遺伝子およびタンパク質で確認され、Glut1 を介した細胞へのグルコースの取り込みが修復象牙質形成において非常に重要であるという新たな知見を提示している。さらに、歯髄創傷部直下の Glut1 をターゲットとしたグルコース輸送を制御することによって、歯髄創傷治癒を促進させる新たな歯髄保存療法の開発への足掛かりとなると期待されることから、学位論文としての価値を認める。