

論文名 : Immunohistochemical and gene expression analysis of Glut1 and Runx2 in reparative dentin formation during dental pulp wound healing

(歯髄創傷治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)

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 竹内亮祐

---

ここから記入

### 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連する。以上の知見から、歯髄創傷治癒過程において歯髄幹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、歯髄創傷治癒過程で展開される象牙芽細胞様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。

### 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: SA 00212)。8 週齢雄性 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  $\beta$ -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 の歯髄創傷治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* に対する歯髄創傷治癒時での 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  $\beta$ -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様細胞に対して *Glut1* 陽性反応がみられた。*Runx2* は断髄 3-7 日後にかけて、歯髄細胞の核内に陽性反応を認めた。また、象牙芽細胞様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幹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、歯髄幹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。