

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 遠間 愛子
学位 博士(歯学)
学位記番号 新大院博(歯)第415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 Glucose Transporter-2 and 4 Are Involved in Glucose Supply During Pulpal Wound Healing Following Pulpotomy with Mineral Trioxide Aggregate in Rat Molars (グルコーストランスポーター-2 および 4 はラット臼歯の Mineral Trioxide Aggregate による断髄後の歯髄創傷治癒過程においてグルコース供給に関与する)
論文審査委員 主査 教授 大島 勇人
副査 教授 野杵 由一郎
副査 教授 吉羽 邦彦

博士論文の要旨

【目的】

非感染性歯髄が露出されると、歯髄神経細胞から分化した象牙芽細胞系細胞が創傷部直下に修復象牙質を形成することで歯髄を保護する。Mineral trioxide aggregate (MTA) は封鎖性に優れ、覆髄材料として使用すると修復象牙質形成を促進させるが、ヒトでは約3ヶ月の治療期間を必要とし、その間に細菌感染のリスクが懸念される。MTAによる覆髄の成功率を高めるためには、修復象牙質を早期かつ効率的に形成させ、露髄部を堅牢に封鎖することが重要である。

グルコースは全細胞のエネルギー源として使用され、創傷部でその利用率が増加するが、グルコーストランスポーター (Glut) ファミリーと呼ばれる膜貫通型タンパク質を介して輸送されることでその機能を発揮する。そのうち、Glut2 は歯の形成や大きさの決定に重要であり、一方、Glut4 は骨芽細胞の石灰化形成に関与している。以上の知見から、Glut2 および Glut4 が歯髄創傷治癒過程での修復象牙質形成に関与している可能性が予想されるが、その機序は未だ不明である。そこで本研究では、Glut2 および Glut4 が歯髄創傷治癒時のグルコース供給を担い、修復象牙質形成に関与していると仮説を立て、MTA 断髄後の修復象牙質形成過程におけるこれらの動態を検証することを目的として、免疫組織化学染色および遺伝子発現解析を行った。

【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: SA00212)。全身麻酔下で8週齢 Wistar 系雄性ラットの左側上顎第一臼歯に、ラウンドソーで露髄させ、次亜塩素酸ナトリウムと過酸化水素水、および生理食塩水で洗浄後、MTA 断髄を行い、歯髄創傷治癒モデルラットを作製した。観察期間は1、3、5、7および14日とした。対照群として反対側の右側上顎第一臼歯を用いた。

・免疫組織化学染色

灌流固定およびパラフィン切片作製後、正常歯髄での Glut2 および Glut4 の局在解析を行うために、象牙芽細胞のマーカーである nestin と血管内皮細胞のマーカーである RECA-1 に対する抗体を用いた蛍光二重染色を行った。続いて、Glut2 および Glut4 の歯髄創傷治癒過程における発現変化を解析するために酵素抗体法染色を、さらに、nestin に対する抗体を用いた蛍光二重染色を行った。

・遺伝子発現解析

抜歯した第一臼歯を用いて、*Slc2a2*(Glut2 の遺伝子)、*Slc2a4*(Glut4 の遺伝子)、*nestin* および *Igf1r*(インスリン様成長因子1受容体の遺伝子)に対する歯髄創傷治癒時の mRNA 発現量について real-time PCR 解析を行った。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 (有意水準は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 Glut2 および Glut4 の発現は、nestin および RECA-1 の陽性部位と一部一致し、血管内皮細胞およ

ひ象牙芽細胞に局在し、グルコースの輸送経路が各細胞に存在していることが示された。断髄1日後では、創傷部位に Glut2 および Glut4 の陽性細胞は認められず、3日後にそれらの発現を歯髄細胞に認めた。5日後に修復象牙質が形成され、その直下に Glut2 および Glut4 陽性の象牙芽細胞様細胞を認め、7日後には修復象牙質直下に整列した Glut2 および Glut4 陽性の象牙芽細胞様細胞が認められた。Nestin を用いた免疫蛍光二重染色では、特に、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、nestin と Glut2 または Glut4 陽性の象牙芽細胞様細胞が認められた。断髄後の *Slc2a2*, *Slc2a4*, *nestin* および *Igf1r* の mRNA 発現レベルは対照群と比較して、3または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ける象牙芽細胞様細胞の分化と修復象牙質形成におけるグルコース供給を Glut2 と Glut4 が担っている可能性が示唆された。また、修復象牙質形成に関与している *Igf1* は、Glut4 の細胞膜表面への移動制御にも関与していることから、特異的レセプターである *Igf1r* と結合することで修復象牙質形成に関与していることが考えられる。さらに、炎症時の治癒遅延を認める2型糖尿病の発症には Glut4 が深く関わっているため、ここにも Glut4 による制御があると考えられる。

【結論】

Glut2 および Glut4 の発現は、正常歯髄では象牙芽細胞および血管内皮細胞に、MTA 断髄後の歯髄では歯髄細胞および象牙芽細胞様細胞に認められた。さらに *Slc2a2*, *Slc2a4*, *nestin* および *Igf1r* の mRNA 発現レベルは MTA 断髄後に有意に上昇した。

審査結果の要旨

本研究は、*in vivo* 動物実験系を用いて、Mineral trioxide aggregate (MTA) 直接覆髄後のデンティンブリッジ形成過程におけるグルコース輸送体 Glut2/4 の役割を免疫組織化学的・分子生物学的に明らかにすることを目的としている。MTA は細菌感染の抑制や修復象牙質形成の促進など優れた特性をもつことから、従来の水酸化カルシウム製剤に代わりうる直接覆髄剤として利用されている。しかしながら、MTA 直接覆髄からデンティンブリッジの完成までには約3カ月を要し、その間に潜在的な感染の危険がこされされることになる。したがって、デンティンブリッジ形成をより早く完成させることは臨床で克服すべき重要課題である。

グルコースは生物のエネルギー源として重要な働きをすることに加え、創傷治癒過程を支えるエネルギーとしても利用される。グルコースはグルコース輸送体 (Gluts) 等で運ばれる。Gluts はほとんどの哺乳類細胞に発現する膜タンパクで、クラス I Gluts は Glut1, Glut2, Glut3, Glut4 からなり、グルコースの取り込みと排出を担う必須の膜タンパクである。Glut2 は特に肝臓、膵臓β細胞、腎臓近位尿管、小腸に発現しており、最も大きなグルコース輸送能を持つ。Glut4 は筋、心臓、脂肪組織に局在し、全身のグルコース恒常性に関与する。Glut2 は上皮・間葉細胞に加え、象牙芽細胞で発現しており、歯の形態形成や歯の大きさの決定に関わると考えられている。さらに、Glut4 は骨芽細胞による石灰化時活性化する。従って、本研究は、Glut2/Glut4 が創傷治癒における象牙芽細胞の分化・石灰化に関わるグルコース輸送体であるという仮説を立て、その役割を検証している。本研究は、Glut2/Glut4 の発現を象牙芽細胞分化マーカーであるネスチンと内皮細胞マーカーである RECA-1 との二重免疫染色で検証し、正常歯髄および MTA 直接覆髄後のデンティンブリッジ形成過程における歯髄における Glut2 と Glut4 発現を初めて詳細に明らかにした。正常歯髄では、Glut2/Glut4 は象牙芽細胞と内皮細胞で発現がみられ、直接覆髄後に損傷部で発現が消失し、その後損傷部位に Glut2/Glut4 陽性細胞が出現し、術後7日で新たに分化した象牙芽細胞様細胞が Glut2/Glut4 陽性を獲得する。さらに、Glut2 遺伝子をコードする *Slc2a2* mRNA が術後3日でピークを示すのに対し、Glut4 遺伝子をコードする *Slc2a4* mRNA、ネスチン mRNA、インスリン様成長因子 I 受容体 (*Igf1r*) mRNA が術後5日でピークを示した。創傷部位では、変性細胞の除去後、細胞増殖・遊走・接着・分化が起こるが、この過程で、Glut2 と Glut4 が、オーバーラップしながらもピーク時期をずらすことにより、細胞増殖・象牙芽細胞様細胞分化・機能発現に必要な糖代謝に重要な役割を担っていることを示唆している。正常歯髄において、象牙芽細胞に Glut2/Glut4 が持続的に発現しているのは、象牙芽細胞の恒常性維持に必要な糖代謝に Glut2/Glut4 が重要な役割を担っているのであろう。最近の研究で、骨芽細胞の分化過程においてインスリンで刺激されたグルコースの取り込みが Glut4 を介することが報告されている。*Igf1r* mRNA のピークが、象牙芽細胞様細胞の分化・機能発現の時期と一致していることは、IGF-1 を介した Glut4 の活性化が関与している可能性がある。また、Glut4 の局在がインスリンの刺激で劇的に変化すること、II型糖尿病では Glut4 が細胞膜から移動できず創傷治癒が遅延すること、糖尿病ラットでデンティンブリッジ形成が阻害されることが報告されており、II型糖尿病における創傷治癒の遅延が Glut4 を介した糖代謝に起因することが示唆されている。創傷治癒過程の Glut2/Glut4 の役割解明は、II型糖尿病の病態解明にも繋がる研究テーマであり、本研究では、Glut2/Glut4 を介した糖代謝が歯髄治癒過程と恒常性維持に重要な役割を果たしていることが証明された。さらに、本研究では、

Slc2a4 mRNA、*Igf1r* mRNA 発現により創傷台癒過程における Glut4 と IGF-1 相互作用の関与の一端も示唆している。将来、IGF-1 による Glut4 の活性化がデンティンブリッジ形成を促進する可能性も考えられ、研究成果がデンティンブリッジ形成促進直接薬劑の開発に繋がることを期待される。

以上、本研究結果は、ラットにおいてデンティンブリッジ形成過程における Glut2/Glut4 を介した歯髓糖代謝機構を明らかにしており、再生歯髓生物学における糖代謝機構研究への貢献度が極めて高いので、学位論文としての価値を認める。