

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)

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 遠間 愛子

ここから記入

【目的】

非感染性に歯髄が露出されると、歯髄幹細胞から分化した象牙芽細胞様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 は歯の形態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: SA 00212)。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、ラウンドバーで露髄させ、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 *Igf-1r* (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での 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、血管内皮細胞および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 *Igf-1r* 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 *Igf-1* 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 *Igf-1r* 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 *Igf-1r* の mRNA 発現レベルは MTA 断髄後に有意に上昇した。