

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 伊藤 崇史
学位 博士(歯学)
学位記番号 新大院博(歯)第335号
学位授与の日付 平成28年3月23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 **Implantation of Mesenchymal Stem Cells into the Coronal Pulp of Rat Molars**
(ラット臼歯冠部歯髄への間葉系幹細胞の移植)

論文審査委員 主査 大島 勇人 教授
副査 大峽 淳 教授
副査 吉羽 邦彦 准教授

博士論文の要旨

【緒言】これまでの歯髄組織再生に関わる研究には、イヌなどの大型動物が使用されてきたが、現在、その使用は困難なものになっている。そこで、入手が容易であり、遺伝的、および生物学的にヒトと類似したラットなどの小動物を用いた歯髄組織再生モデルが確立されることは、再生歯内療法の実現に有益と考えられる。しかし、ラットの歯髄腔は非常に小さく、幹細胞やスキャホールドの移植は非常に困難である。そこで我々は、ラット骨髄間葉系幹細胞を混合した三次元スキャホールドを、手術用顕微鏡下においてラット上顎臼歯に移植し、移植後の歯髄組織を組織化学的に解析した。また、再生歯髄組織の性状を解析するため、象牙芽細胞マーカー分子である *dentin sialophosphoprotein (Dspp)* を取り上げ、再生歯髄組織における遺伝子発現状態を定量的に解析した。

【材料と方法】7週齢雄生Wistar系ラットの歯髄第一臼歯を検索対象とした。幹細胞としてラット骨髄間葉系幹細胞(PoieticsTM ラット間葉系幹細胞; ロンザジャパン株式会社)、三次元スキャホールドとして Matrigel/PLLA スキャホールドを用いた。上顎第一臼歯を露髄させた後、直下の歯髄組織をさらに削除した。その後、窩洞の洗浄を行い、幹細胞混合三次元複合型スキャホールドを移植した。移植窩洞は、水硬性セメント (Cavit Pink; 3M ESPE Dental AG)、およびフロアブルコンポジットレジン (Beautiful Flow; 松風) を用いて二重仮封を施した。幹細胞を混合せず三次元複合型スキャホールドのみを移植した群、および未処置の正常上顎第一臼歯を、それぞれコントロールとした。全ての行程は、手術用顕微鏡下にて行った。移植後3日あるいは7日経過後に被験歯を顎骨ごと摘出し、通常に従い固定、脱灰後、厚さ6 μ mの凍結切片を作成した。HE染色にて組織学的観察を行うとともに、CD43抗体(W3/13)を用いた免疫染色を行った。分子生物学的解析は、正常上顎第一臼歯、幹細胞移植3日、および7日間経過後の冠部歯髄および歯根歯髄を検索対象とし、作製した凍結切片をレーザーキャプチャーマイクロダイセクション用スライドに貼付し、実体顕微鏡下で冠部歯髄および歯根歯髄をそれぞれ別々に採取した。これらの試料より全RNAを抽出したのち、*Dspp*mRNAの発現変化をreal time PCRを用いて定量解析した。

また、移植後の幹細胞の挙動を解析するため、移植24時間前に、幹細胞に対しエレクトロポレーションを用いて *LacZ* 遺伝子の導入を行った後、上顎第一臼歯に3日間移植し、同様に試料作成後、 β -ガラクトシダーゼ染色を施した。

統計分析は、Mann-Whitney *U*検定 (Bonferroni 補正を適用) により危険率5%で検定した。

【結果】幹細胞移植3日経過例では、スキャホールドに沿って細胞が観察されたが、充実性組織は観察されなかった。幹細胞移植後7日経過例では、ほぼ全ての移植部が歯髄腔の充実性組織で満たされていた。一方、幹細胞を混合せずスキャホールドのみを移植した群においては、移植後7日経過しても移植部に充実性組織の形成は認められなかった。また、各群とも観察期間を通じ明白な好中球浸潤は観察されなかった。さらに、移植後7日経過例におけるCD43陽性T細胞幹細胞の密度を正常組織と比較したところ、有意差は認められなかった。

分子生物学的解析では、幹細胞移植3日間経過例の冠部歯髄において、正常組織と比較して *Dspp*mRNAの有意な減少が認められたが、幹細胞移植7日間経過例においては、正常組織と比較して有意に増加した。

LacZ 遺伝子導入幹細胞群では、移植 3 日経過例でβ-ガラクトシダーゼ陽性細胞が観察された。これらは、スキャフォールド周囲に様々な形状の細胞として多数観察された。

【結論】幹細胞混合三次元複合型スキャフォールド移植後 7 日間で、ラット上顎臼歯歯髄空洞、歯髄補充生組織の再生が観察され、冠部歯髄においては、*Dspp*mRNA の顕著な発現の亢進を認めた。また、*LacZ* 遺伝子導入幹細胞移植 3 日後の歯髄組織内で、β-ガラクトシダーゼ陽性細胞が同定された。

審査結果の要旨

う蝕に起因する不可逆性歯髄炎は歯髄保存が難しく抜歯に至る場合が多い。歯髄の喪失は歯の生物学的・物理学的な integrity の破綻をきたし抜歯に至ることもある。もし歯髄が再生出来れば歯が保存される可能性が高くなるので、幹細胞と生体材料を組み合わせた歯髄再生は歯髄保存のための重要な問題解決策となる。新しい歯髄再生療法を確立するためには、*in vivo* および *in vitro* 動物実験モデルを確立することは極めて重要な研究方略である。また、大型動物の使用に関連した倫理的問題から、ラットなどの小動物で実験モデルを確立することが求められている。過去 20 年間で歯内療法は、新しい技術、機器、材料の発展により正確性が増している。とりわけ手術顕微鏡の使用が歯内療法の発展に繋がった。この技術はラットなどの小動物を用いた *in vivo* 実験にも大きく貢献するようになっている。

本研究は、手術顕微鏡を用いてラットの歯髄切断後の歯に骨髄間葉系幹細胞・生物分解性スキャフォールド・ハイドロゲルを用いた幹細胞移入処置を確立し、経時的な歯髄変化を観察した。さらに歯髄細胞に *LacZ* レポーター遺伝子プラスミドを導入し、ドナー細胞の運命を追った。術後 3 日でドナー由来の骨髄幹細胞が認められ、術後 7 日でデンチンブリッジの形成が認められないものの象牙芽細胞分化マーカーの象牙質シアロリントタンパク質 *Dspp* mRNA が有意に増加した。

本研究で開発したハイドロゲルと生物分解性スキャフォールドの組合せは適度な柔軟性と強度を可能にし、硬組織である象牙質に囲まれた閉鎖空間を満たし、窩洞をシールする充填材にも機械的強度を示す材料である。ハイドロゲルについては、Matrigel と PuraMatrix の二種類の材料を著者らが確立したラット *in vitro* 実験モデル (whole tooth-in-jawbone approach) を使って検証し、Matrigel で有意にアポトーシスが少ないことを証明し、Matrigel が細胞毒性の低いことを示唆している。

さらに、本研究は免疫抑制剤の効果についても検証している。結果として、免疫抑制剤と抗生物質の組合せにより、未治療の歯髄と有意差がないレベルまで歯髄の炎症反応を抑えることに成功した。

以上、本研究結果は、ラットにおいて骨髄間葉系幹細胞・生物分解性スキャフォールド・ハイドロゲルを用いた幹細胞移入処置を確立し、再生歯髄生物学における幹細胞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。

