

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 枝並直樹
学位 博士(歯学)
学位記番号 新大院博(歯)第389号
学位授与の日付 平成29年9月20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 Characterization of Dental Pulp Myofibroblasts in Rat Molars after Pulpotomy
(ラット臼歯断髄後の歯髄 Myofibroblast の動態解析)

論文審査委員 主査 野杵 由一郎 教授
副査 大峽 淳 教授
副査 吉江 弘正 教授

博士論文の要旨

【緒言】

α -smooth muscle actin (α -SMA)を発現する Myofibroblast は、細胞外基質のリモデリングにより創傷治癒や線維化に寄与することが知られている。歯髄の修復象牙質形成過程においても、一過性に α -SMA 陽性細胞が創傷部に観察されることが報告されていることから、Myofibroblast の関与が推察される。しかしながら、修復象牙質形成過程における α -SMA 陽性細胞の詳細な動態は明らかにされておらず、また、Myofibroblast の特定には、同じく α -SMA 陽性を示す血管壁細胞との鑑別が必要であることから、この過程に Myofibroblast が関与するかは、いまだ不明である。そこで、断髄処置後のラット臼歯歯髄における α -SMA 陽性細胞の局在変化を免疫組織化学染色により観察し、さらに RECA-1 (血管内皮細胞マーカー)、NG2 (血管壁細胞マーカー)、または prolyl-4-hydroxylase β (P4H β : 線維芽細胞マーカー)の局在と比較することで、修復象牙質形成過程における Myofibroblast の動態を検索した。また、Myofibroblast の分化誘導因子である transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) および extra domain A fibronectin splice variant (EDA-FN)の修復象牙質形成過程における発現変化を、免疫組織化学染色およびリアルタイム PCR を用いて解析した。

【方法】

8週齢 Wistar 系ラットの上顎第一臼歯咬合面を直径 0.8mm のカーバイドバーにて切削し、ケイ酸カルシウム系セメント(ProRoot MTA; Dentsply Tulsa Dental)を用いて断髄処置を行った。その後、窩洞はコンポジットレジン(ビューティフィルフロー; 松風)にて封鎖し、1, 3, 5, 7, 14 日経過後に以下の実験に用いた。また対象群として、未処置の動物を以下の実験に用いた。

(1)動物を Periodate Lysine Paraformaldehyde 固定液を用いて灌流固定し、断髄処置歯を周囲組織と共に摘出した。10% EDTA 溶液により試料の脱灰を行い、厚さ 10 μ m の矢状断および水平断の凍結切片を作成した。次いで、抗 α -SMA および EDA-FN 抗体を用いて、酵素抗体法による免疫染色を行うとともに、抗 α -SMA 抗体と、抗 RECA-1、NG2、または P4H β 抗体を用いて、蛍光抗体法による二重免疫染色を行った。

(2)動物を安楽死させ、断髄処置歯を抜去した。次いで、抜去歯の歯髄(各期間 n=5)から RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて、TGF- β 1, EDA-FN, α -SMA の mRNA 発現を解析した。

【結果】

未処置歯髄では α -SMA 発現は血管内皮細胞 (RECA-1 陽性)を取り囲む、血管壁細胞 (NG2 陽性)に限局していた。処置 1 日後も同様に、血管周囲にのみ α -SMA 発現が認められた。しかしながら、処置 3 日後では、窩洞直下から歯根側の歯髄までに及ぶ広範囲に、紡錘形の α -SMA 陽性

細胞が観察された。また、これらの紡錘形 α -SMA 陽性細胞は、pulp core のみに観察され、象牙芽細胞層や細胞希薄層、細胞緻密層には観察されなかった。免疫二重染色において、紡錘形 α -SMA 陽性細胞は、NG2 陰性かつ P4H8 陽性であった。処置 5 日後には、紡錘形 α -SMA 陽性細胞は窩洞直下に集積し、P4H8 陽性を示した。14 日後になると修復象牙質の形成が観察され、 α -SMA 発現は再び血管壁細胞に局限した。EDA-FN 発現は未処置歯髄では陰性であったが、処置 3 日および 5 日後では、窩洞直下を中心に陽性反応が認められた。リアルタイム PCR の結果から、TGF- β 1, EDA-FN, α -SMA の mRNA 発現は、未処置歯髄と比較して処置後有意に増加した (Dunnett's test $p < 0.05$)。TGF- β 1 と EDA-FN は処置 1 日後に、 α -SMA は処置 3 日後に発現量が最大となり、その後、TGF- β 1、EDA-FN、 α -SMA とともに、処置 14 日後までに未処置歯髄と同等まで発現量が減少した。

【考察】

修復象牙質形成過程では、一過性に多数の紡錘形 α -SMA 陽性細胞が観察された。これらは未処置歯髄で認められる α -SMA 陽性の血管壁細胞とは異なり、NG2 陰性かつ P4H8 陽性であることが示された。コラーゲン合成過程で働く酵素である P4H8 は、主に線維芽細胞や Myofibroblast に発現することが知られており、本研究で観察された α -SMA と P4H8 の二重陽性細胞は Myofibroblast であると考えられる。

Myofibroblast は TGF- β 1 と EDA-FN の刺激により分化することが、これまでに多くの臓器で報告されている。本研究においても、Myofibroblast の出現に先立って、TGF- β 1 と EDA-FN の有意な増加が確認されたことから、修復象牙質形成過程における Myofibroblast の分化にも TGF- β 1 と EDA-FN が誘導因子として働いていることが示唆される。

本研究において Myofibroblast は、処置 3 日後には歯髄の広範囲に出現し、処置 5 日後では断髄面直下に集積して観察された。このことが、Myofibroblast の創傷部への遊走によるものかは不明であるが、これまでの研究で、創傷時に歯髄細胞は、pulp core から周辺部に、または、根尖部から歯冠部に移動することが報告されており、本研究における Myofibroblast も、何らかの遊走因子により創傷部へ移動した可能性がある。

断髄面直下に集積した Myofibroblast は、その後、修復象牙質が形成されると共に観察されなくなった。これまでに、 α -SMA 陽性細胞が骨芽細胞や、象牙芽細胞に分化しうることが報告されていることから、歯髄の Myofibroblast の一部は、新生象牙芽細胞に分化することで α -SMA 発現を消失したとも考えられる。

修復象牙質形成過程に特異的に出現する Myofibroblast は、歯髄創傷部の治癒に重要な役割を果たしていると考えられるため、この細胞を活性化させることで治癒を促進する新たな歯髄保存療法の開発が期待できる。

【結論】

断髄後の歯髄において、修復象牙質形成に先立ち TGF- β 1 と EDA-FN が増加し、 α -SMA と P4H8 の二重陽性 Myofibroblast が一過性に出現することが示された。

審査結果の要旨

近年、新生象牙芽細胞の前駆細胞として、歯髄 myofibroblast 様細胞の存在が明らかとなり、歯髄(幹)細胞から歯髄 myofibroblast 様細胞への形質転換は、新生象牙芽細胞の分化において重要な過程であると位置づけられている。一方、深在性のう蝕や外傷では、歯髄組織において歯髄(幹)細胞から新生象牙芽細胞が分化し、修復象牙質形成が誘起されるが、新生象牙芽細胞の分化機序は、現在でも断片的にしか解明されていない。本研究では、この分化過程に着目し、歯髄(幹)細胞から歯髄 myofibroblast 様細胞への形質転換を誘導する生理活性物質を特定し、誘導された歯髄 myofibroblast 様細胞の動態を解明することによって、より効果的な新規歯髄保存療法の可能性を模索したものである。

本研究は、学位申請者らが発見した、新生象牙芽細胞の前駆細胞である歯髄 myofibroblast 様細胞を効果的に誘導する生理活性物質を特定し、さらに覆髄剤としての臨床応用を見据えたもので、他に例を見ない独創性、すなわち“生物学的覆髄材の開発”を目指した基礎研究という側面を有している。本研究の遂行により、これまで未解明であった歯髄(幹)細胞から象牙芽細胞への

分化機構の一端が明らかにされるとともに、象牙芽細胞の分化決定因子の同定へと繋がるものと予想され、歯髄組織に含まれる幹細胞/前駆細胞の誘導と新生象牙芽細胞の分化を促進する画期的な生物学的歯髄保存療法の開発に大きく貢献することが期待される研究である。

α -smooth muscle actin (α -SMA)を発現する Myofibroblast は、細胞外基質のリモデリングにより創傷治癒や線維化に寄与する。歯髄の修復象牙質形成過程においても、一過性に α -SMA 陽性細胞が創傷部に観察されることが報告されていることから、Myofibroblast の関与が推察される。そこで学位申請者（枝並直樹）は、断髄処置後のラット臼歯歯髄における α -SMA 陽性細胞の局在変化を免疫組織化学染色により観察し、さらに RECA-1（血管内皮細胞マーカー）、NG2（血管壁細胞マーカー）、あるいは prolyl-4-hydroxylase β (P4H β ：線維芽細胞マーカー)の局在と比較することで、修復象牙質形成過程における Myofibroblast の動態および Myofibroblast の分化誘導因子である transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) および extra domain A fibronectin splice variant (EDA-FN)の修復象牙質形成過程における発現変化を検索した。そして、断髄後の歯髄において、修復象牙質形成に先立ち TGF- β 1 と EDA-FN が増加し、 α -SMA と P4H β の二重陽性 Myofibroblast が一過性に出現することを解明した。また申請者らは、歯髄治癒過程で出現する紡錘形 α -SMA 陽性細胞が、正常歯髄で α -SMA 陽性を呈する血管周皮細胞とは異なり、myofibroblast 様の特徴を持つ細胞であることを明らかにした。すなわち、歯髄 myofibroblast 様細胞は、新生象牙芽細胞の前駆細胞であると考えられ、歯髄(幹)細胞から、歯髄 myofibroblast 様細胞への形質転換を誘導することができれば、新生象牙芽細胞の分化を促進できる可能性が高い。

この発見は、修復象牙質形成過程に特異的に出現する Myofibroblast が、歯髄創傷部の治癒に重要な役割を果たすことを示したもので、この細胞を活性化させることで治癒を促進する新たな生物学的歯髄保存療法の開発（臨床的応用）の有用性を示す所見であり、得られた本研究の成果は学位取得に十分な内容であると考えられる。他方で、審査員 3 名の口頭試問の結果（別紙：最終審査結果の要旨参照）、本人は歯学博士にふさわしい学力を有していると認められた為、大学院博士課程の修了に値する。