

論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙 第 号	論文提出者名	酒徳晋太郎
論文審査 委員氏名	主査 名和 弘幸 副査 前田 初彦 諸富 孝彦		
論文題名	Wnt10a は再生歯髄における象牙芽細胞分化 に關与する		

インターネットの利用による公表用

幹細胞応用による歯髄再生療法は、幹細胞の増幅期間や費用から、救急処置を要することの多い小児歯科領域への応用は難しい。そのため、幹細胞を用いない歯髄再生誘導薬の開発は急務であり、その達成には発生模倣することが必要と考えられる。

歯の発生過程にて、Wnt シグナルが関与しており、その代表例に Wnt10a と DKK1 の相互作用による象牙質発生の制御が報告されている。そこで、象牙芽細胞制御による象牙質誘導能が備えるべき作用の一つである非細胞性歯髄再生誘導薬の開発には、再生歯髄内での Wnt10a 動態の解明が必要であると着想した。

本実験は、Wnt10a が再生誘導薬となり得るかを評価するために、歯髄幹細胞の象牙質誘導における Wnt10a の動態を解析した。さらに異所性歯根移植を用いて、再生歯髄内で Wnt10a 及び象牙芽細胞が経時的にどのように変化するのか検討した。

ヒト歯髄幹細胞(hDPSC)は抜去後の永久歯から回収した歯髄を、酵素消化法にて分取した。分取した hDPSC を増殖期で無血清培地に交換し、24 時間後、上清として精製した。

hDPSC 5×10^4 cells を象牙質誘導培地にて培養した。

象牙質誘導開始 3 日、7 日後に hDPSC を回収し、直ちに RNA を抽出、*Wnt10a*、*DKK1*、*DSPP* の遺伝子発現量を qPCR にて解析した。

異所性歯根移植モデルを用いて上清の歯髄再生能を検討した。上清を終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ となるようコラーゲンと混合してヒト永久歯歯根に注入し移植片とした。その後、移植3日、7日に回収し、パラフィン切片を製作し、移植切片とした。

異所性歯根移植による再生歯髄組織を HE 染色し、光学顕微鏡にて観察した。根管面積に対する再生歯髄面積の比率を算出し、平均値を求めた。

移植切片を各々の抗体で免疫組織染色し、光学顕微鏡で観察し評価した。また、DSPP 陽性細胞数を計測し、さらに Wnt10a、DKK1 は全細胞数に対する陽性細胞率を算出した。

移植切片を DSPP 及び Wnt10a にて二重免疫染色し蛍光顕微鏡にて観察した。

再生歯髄組織を回収し RNA を抽出、*DSPP*、*Wnt10a*、*DKK1* の遺伝子発現量を qPCR にて解析した。

得られたデータは平均±標準偏差で表した。統計処理には T 検定を用い、統計学的有意差の有意水準は 5%未満とした。

歯髄幹細胞を象牙質へと分化誘導し、遺伝子発現を解析したところ、*DSPP* の発現が上昇する 7 日にて Wnt10a の発現も上昇した。一方、*DKK1* の発現は減少した。よって *DKK1* が発現を抑えられ *Wnt10a* が発現した結果 *DSPP* が発現することが再生歯髄幹細胞の象牙質分化メカニズムの可能性であると考えられる。

次にこの推定される象牙質分化メカニズムが *in vivo* においても生じているかを確認した。移植 3 日から根管内部に組織が再生し、この組織は血管を含む線維性組織であり、DSPP 陽性細胞の根管壁への並列も見られ、歯髄組織及び象牙芽細胞と言える。また移植 3 日と 7 日における歯髄再生量に有意な差はないが、DSPP 陽性の象牙芽細胞数は増加しており、移植日数経過により歯髄が成熟したと考えられる。また、再生歯髄内の *Wnt10a* 陽性細胞数は移植 3 日より 7 日のほうが有意に増加していた。加えて、DSPP 陽性細胞は *Wnt10a* を共発現した。移植 3 日から 7 日の再生量が有意に変化しなかったが DSPP 陽性細胞数は増加した結果とあわせて考察すると、この時点で *Wnt10a* は象牙芽細胞の分化に関与していることが示唆された。しかし、再生歯髄内の *Wnt10a* と *DSPP* は移植日数が経過すると遺伝子発現量が減少した。一方、*DKK1* の発現量に有意な差はないが、移植 3 日から 7 日にかけて増加傾向にある。再生歯髄量の増加に伴い、*Wnt10a* と *DSPP* の発現に関与しない血管等の組織分化により、*Wnt10a* と *DSPP* の発現量は相対的に減少したと考察される。再生歯髄組織内にて *DKK1* 陽性細胞数は有意に変化してはいないが、移植 3 日より 7 日にかけて増加していた。歯の発生にて *Wnt10a* と *DKK1* の相互作用による石灰化の制御が報告されており、本研究でも歯髄幹細胞の象牙質誘導にて *DKK1* 発現量の減少、*Wnt10a* 発現量の増加と *DSPP* 発現の増加の時期とが一致していた。そのため、遊走した幹細胞に起因する再生歯髄内においても *Wnt10a* と *DKK1* が相

相互作用を持つことは十分に考えられる。

本研究より、再生歯髄内において再生量の増加に伴って象牙芽細胞が増加することに加え、象牙芽細胞は Wnt10a を発現していることが明らかとなった。また、歯髄再生における canonical Wnt シグナルを介した象牙質分化誘導メカニズムとして、DKK1 が発現を抑えられ Wnt10a が発現した結果 DSPP が発現することが想定された。従って、Wnt10a は象牙質誘導能を持つ非細胞性歯髄再生誘導薬の候補であることが示された。

これは、小児歯科学のみならず関連諸分野に寄与するところが大きい。よって本論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判断した。