

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 722号	論文提出者 河村 玲
論文題目 歯髄誘導に關与する化学的微小環境の抽出及び、再構築による歯髄再生能の検討	

I. 緒言

組織の初期発生、損傷時の修復および再生時には生物学的に複雑なメカニズムが存在する。現在、組織工学および組織再生の三要素として、幹細胞、成長因子、足場/微小環境の組合せが重要と考えられている。ヒトの細胞は外胚葉、中胚葉（間葉）、内胚葉に分類されるが、間葉系幹細胞（MSCs）は生理活性因子を分泌し、損傷を受けた細胞に直接的または、間接的に効果を示すことが報告されている。MSCs から分泌されるサイトカイン、炎症性メディエーター、細胞外基質と抗菌性タンパク質は、組織修復のために適切な微小環境を生み出す。これまでに、脳梗塞モデル、下肢虚血モデル、異所性歯根移植または抜髄後歯髄再生モデルにおいて歯髄・骨髄・脂肪のいずれの細胞を移植しても同様な歯髄組織が再生することが示されている。また、歯髄・骨髄・脂肪幹細胞培養上清を異所性歯根移植モデルに添加した場合も、歯髄組織が再生することがわかってきた。これらの報告は、再生組織は移植細胞の由来組織に依存せず、移植先の微小環境に依存することを示唆している。細胞の様々な挙動は、物理的要因と化学的要因による周囲の微小環境によって制御されている。幹細胞の運命も、可溶性因子、あるいは多くの固有可溶性因子による不溶性マトリックスの複合体に影響され、周囲の微小環境によって管理されているが、その詳細なメカニズムは明らかではない。

一方、歯の欠損に対しては可撤性義歯、ブリッジおよび歯科用インプラントによる補綴治療が行われてきたが、現在、組織工学による再生歯の開発が試みられている。これまでの研究で、移植細胞由来に関わらず、細胞移植した根管に歯髄が再生してくることから、象牙質自体が象牙質/歯髄複合体再生のために必要な微小環境であることが示唆されているが、象牙質内の歯髄再生に関与する化学的要因はまだ解明されていない。そこで、本研究では、歯の微小環境構成因子の抽出方法の検討及び、化学的微小環境の再構築による歯髄再生能の比較について検討を行った。

II. 材料および方法

1. ブタ歯髄幹細胞分取と上清調整

ブタ歯髄細胞は同一個体の下顎骨より分取し、50%コンフルエントの状態にて無血清培地に変え、24 時間後、培養上清として回収した。

2. 移植歯根の化学的微小環境構築因子抽出処理

ブタの下顎側切歯を抜歯し、歯根膜剥離、抜髄後、歯根を長さ 6mm で切断した。その後、0.6N 塩酸、4M グアニジン塩酸、0.5M EDTA にて段階的に 1 週間ずつ処理し、各段階の処理歯根を用意した。また、EDTA による処理液を濃縮し、 -80°C にて保存した。

3. マウス異所性歯根移植モデルにおける再生組織解析

各移植歯根に歯髄幹細胞をコラーゲンと混合して注入し、重度複合免疫不全（SCID）マウスに皮下移植した。移植片は移植 28 日後に摘出し、固定、脱灰の後、 $5\ \mu\text{m}$ のパラフィン切片とした。それぞれの再生組織をヘマトキシリン・エオジン（HE）染色後、形態学的に解析した。再生歯髄における細胞密度は、Hoechst 33342 による核染色にて解析した。血管新生能は、RECA1 を用いた免疫染色によって解析した。再生組織が歯髄であると証明するために、歯髄マーカーである thyrotropin releasing hormone degrading enzyme (TRH-DE) を in situ hybridization にて確認した。さらに、再生組織における TRH-DE の発現量を real-time RT PCR で解析した。再生歯髄組織の象牙芽細胞への分化は、enamelysin に対するプローブを用いて in situ hybridization によって解析した。再生歯髄組織に対する周囲組織マーカー発現は、periostin、PLAP-1 抗体を

用いた免疫染色によって解析した。

4. 微小環境の再構築

未処理歯根にオートクレーブ処理を行い、化学的微小環境を完全に失活させ物理的微小環境のみを温存させた。オートクレーブ処理歯根に前述の EDTA 処理液、上清、またはそれらの混合物を凍結乾燥処理にて付着させた。これらの各処理歯根を前述と同様にマウス皮下に移植し、再生組織を 3 と同様に解析した。

5. 統計学的解析

データは平均±標準偏差で表し、統計処理は一元配置分散分析および Tukey 法により多重比較にて行った。

III. 結 果

1. 各処理歯根による歯髄、象牙芽細胞再生能

移植 28 日後に新生血管に富む歯髄様組織の再生が未処理歯根内に認められた。未処理歯根と比較し、塩酸、グアニジン塩酸、EDTA 処理歯根では疎な歯髄様組織の再生が認められた。さらに、各処理歯根の歯髄組織再生量は、未処理歯根より有意に少なかった。塩酸処理歯根とグアニジン塩酸処理歯根の間では組織再生量に有意差は認められなかったが、EDTA 処理を行うことで組織再生量がさらに有意に減少することが認められた。また、再生組織内において Hoechst 33342 陽性細胞数は、未処理歯根と比較して、グアニジン塩酸処理、EDTA 処理歯根では有意に少なかった。再生組織を RECA 1 抗体にて観察すると、全ての再生組織中に (rat endothelial cell antigen) RECA 1 陽性細胞を認めた。また、未処理歯根は各処理歯根より有意に血管新生量が多いことが認められ、EDTA 処理を行うことで他の処理歯根より血管新生量が有意に減少した。

再生組織における TRH-DE の mRNA 発現を観察したところ、未処理、塩酸処理、グアニジン塩酸処理歯根では発現が認められたが、EDTA 処理歯根では認められなかった。次に、再生組織より RNA を抽出し、TRH-DE による real-time RT-PCR を行ったところ、再生組織における発現量は未処理、塩酸処理、グアニジン塩酸処理歯根間で同様の発現量が認められたが、EDTA 処理歯根では発現が認められなかった。

組織学的に未処理、塩酸処理、グアニジン塩酸処理歯根の再生組織を観察すると、根管壁に Enamelysin の発現を認めた。しかし、EDTA 処理歯根では Enamelysin の発現が認められず、陽性細胞数は他の処理歯根より有意に減少した。再生組織の PLAP-1 陽性細胞率は未処理歯根と塩酸処理歯根の間に有意差は無かったが、グアニジン塩酸処理歯根では有意に高くなった。EDTA 処理歯根では、他の移植歯根より PLAP-1 陽性細胞率が有意に高かった。

2. 化学的微小環境を再構築させた移植歯根の歯髄再生能

28 日後にてオートクレーブ処理、EDTA 抽出液付着歯根内に再生歯髄組織、血管新生、象牙芽細胞は認められなかった。上清付着歯根では歯髄様組織の再生が認められた。混合液付着歯根では上清付着歯根と比べ、歯髄様組織の再生量が有意に多かった。再生組織内における Hoechst 33342 陽性細胞数は、上清付着歯根では未処理歯根と比較して有意に少なかったが、混合液付着歯根と未処理歯根の間では差が認められなかった。再生組織を RECA 1 抗体にて観察すると、上清付着、混合液付着歯根においてその陽性細胞は観察された。血管新生密度を組織学的に測定すると、未処理歯根は各付着歯根より有意に多く、上清付着歯根と混合液付着歯根において血管新生量の有意差は認められなかった。

再生組織における TRH-DE の mRNA 発現を観察したところ、上清付着、混合液付着歯根の再生組織に発現が認められた。さらに、再生組織より RNA を抽出し、TRH-DE による real-time RT-PCR を行ったところ、再生組織における発現量は上清付着、混合液付着歯根で正常歯髄と同等であった。

上清付着、混合液付着歯根の再生組織の根管壁に Enamelysin の発現を認めた。上清付着歯根における Enamelysin 陽性細胞数は未処理、混合液付着歯根と比べ有意に少なかったが、未処理歯根と混合液付着歯根の間に有意差は認められなかった。上清付着歯根における PLAP-1 陽性細胞率は、未処理、混合液付着歯根より有意に高かったが、未処理歯根と混合液付着歯根の間に有意差は認められなかった。

IV. 考 察

本実験結果より、EDTA 処理により歯髄再生に必要な化学的微小環境を構成する因子が抽出されていることが示唆された。これまでにグアニジン塩酸および EDTA 処理によって、象牙質内のほとんどの非コラーゲタンパクが抽出できると報告されている。象牙質内の有機物の 10%程度が非コラーゲタンパクであるが、ブタ歯の象牙質に最も多く含まれる非コラーゲタンパクは DSPP であり、その分解産物である DSP、DPP は象牙質の石灰化の開始や象牙芽細胞の成熟に関与することが報告されている。

そこで非コラーゲタンパクの混合物である EDTA 抽出画分をオートクレーブ処理による不活性化歯に再付着させて、歯髄再生に関与する微小環境の再構築について検討したが、EDTA 画分の再付着のみでは歯髄は再生しなかった。象牙質中には石灰化に伴って NGF、FGF、BMP、TGF- β が取り込まれている。また最近の研究でも、*in vitro* において、幹細胞の培養上清から、再生に関与する因子を中和すると、Trophic 効果が有意に減少することがわかった。したがって、EDTA は非コラーゲタンパクを中心に抽出するため、これらの因子が不足し、歯髄再生が誘導されなかったと考えた。そこで、接着能、増殖能、細胞遊走促進効果、血管形成促進能、象牙芽細胞分化能に効果がある因子を含む上清を不活性化歯根に付着させたところ、歯髄の再生が観察された。さらに、EDTA 抽出画分と上清を混和し付着させることで、上清単独を付着させたときより、歯髄再生能、根管壁の象牙芽細胞数が有意に増加した。象牙芽細胞の分化には FGF-2 が必要であると報告されているが、上清には TGF- β や FGF2 などの他、DSPP、DMP1 が含まれていることが報告されている。これにより、EDTA 抽出画分中の因子と上清中の因子によって、根管内への細胞の遊走・増殖および象牙芽細胞への分化を促進したと考えられる。一方、EDTA と上清の両方を付着させても血管新生量に関しては上清のみと比較して有意差は無かった。この理由として、血管新生に関して、EDTA 抽出画分と上清中の因子との間で有意に働く因子が少なかったことが考えられる。

V. 結 論

歯髄再生に関与する化学的微小環境は EDTA 抽出画分、歯髄幹細胞培養上清に含まれることが示唆された。EDTA 抽出液だけでは歯髄は再生しなかったが、EDTA 抽出液と歯髄幹細胞培養上清の両方を付着させることで、培養上清単独時より、歯髄再生能を向上させることが示唆された。