

Title	Hypoxic condition promotes differentiation and mineralization of dental pulp cells in vivo
Author(s)	伊藤, 幸太
Journal	歯科学報, 114(6): 650-651
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/3515">http://hdl.handle.net/10130/3515</a>
Right	

氏名(本籍)	伊藤幸太 (鳥取県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第2010号(甲第1251号)
学位授与の日付	平成25年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Hypoxic condition promotes differentiation and mineralization of dental pulp cells in vivo doi : 10.1111/iej.12288
掲載雑誌名	International Endodontic Journal 2014年
論文審査委員	(主査) 井上 孝教授 (副査) 片倉 朗教授 齋藤 淳教授 東 俊文教授 森永 一喜准教授

### 論文内容の要旨

#### 1. 研究目的

歯髄は外傷、感染等を起こした場合、血流低下が生じるため、しばしば低酸素状態に曝される。歯髄が低酸素状態に陥ると前駆細胞数の増加、血管新生能力の増幅、石灰化の亢進といった様々な影響を与えるということがわかっている。しかし、これまで低酸素状態による *in vitro* 研究は多く行われているが、*in vivo* において低酸素状態にした歯髄細胞の動態はほとんど知られていない。本研究は、ラット臼歯への血流を減少させる実験モデルを作製し、*in vivo* における低酸素下での歯髄細胞動態の検討を行った。

#### 2. 研究方法

実験動物には250~300gのSD系雄性ラットを用いた。麻酔下にて下顎右側第2臼歯遠心根付近の下顎管にミニスクリューを挿入することで下顎管を切断し、下顎第1臼歯への血流を減少させた。なお、反対側の第1臼歯の歯髄を対照群とした。ミニスクリュー挿入位置の確認としてMicro-CTを用いた。切断直後における墨汁注入透明標本の作製、H-E染色およびHypoxyprobe-1(低酸素マーカー)、ATP-binding cassette transporter G2(ABCG2)(代謝物の排泄能マーカー、幹細胞様細胞マーカー)、Dentin sialoprotein(DSP)、Osteocalcin(OCN)(石灰化マーカー)を一次抗体とした免疫組織化学染色を行った。またABCG2、Dentin sialophosphoprotein(DSPP)(石灰化マーカー)およびOCNのmRNAの発現を解析した。

#### 3. 研究成績および考察

Micro-CT画像では下顎管にミニスクリューが挿入されていること、ミニスクリューが第1臼歯と非接触であったことを確認した。墨汁注入透明標本では、実験群において墨汁注入量が少ないことが観察され、このことは下顎第1臼歯歯髄が下歯槽動脈以外から血液供給を受けていることが示唆された。またHypoxyprobe-1染色では、実験群にて術後7日目に陽性細胞が認められたことより、歯髄低酸素モデルとして適切な実験系であると考えられた。ABCG2、DSPPおよびOCN mRNAの発現は7、14日目において上昇していた。免疫組織化学染色では、ABCG2は7、14日目において象牙芽細胞層に強い陽性が認められた。DSP陽性は7、14日目ともに歯髄組織全体に発現しており、OCN陽性は7日目では象牙芽細胞層に発現し、14日目では歯髄組織全体に認められた。これらの結果より、象牙芽細胞層の歯髄細胞において、代謝物の排泄能の上昇、幹細胞

様細胞の発現, 石灰化に関与する前駆細胞への分化, 石灰化の促進ということが示唆された。

#### 4. 結 論

低酸素状態は歯髄細胞の石灰化および分化を促進させた。また特に象牙芽細胞層において観察された。

#### 論 文 審 査 の 要 旨

歯髄は歯牙硬組織に囲まれており, low compliance な組織である。それゆえ炎症等によって虚血が引き起こされ, 低酸素状態にしばしば曝される。このように, 歯髄は低酸素に陥りやすい組織であり, これまでの歯髄の *in vitro* 研究において様々な実験が行われているが, *in vivo* において低酸素状態での歯髄細胞の動態についての調査は行われていない。そこで本研究では, 低酸素実験モデルを作製し, *in vivo* における低酸素下での歯髄細胞の動態を検討した。これらより低酸素状態は, 歯髄細胞, 特に象牙芽細胞層において石灰化に関与する前駆細胞への分化および石灰化を促進させるということを示唆した。

本審査委員会では

(1) ABCG2, DSPP, OCN mRNA の発現の変化は外科的侵襲や疼痛などのストレスによって影響されるのか。(2) 実験後における神経の影響は考えられるのか。(3) 低酸素状態を定量的に示すとしたらどのような方法があるか。(4) 実験期間をなぜ14日目までにしたのか, について質疑がなされた。

(1) については, mRNA の発現は実験7日目において確認しているが, パイロット実験によりこれらは大きく影響しないという回答を得た。(2) については, 神経細胞が低酸素になることで生理的活性に関与しているという報告があり本研究においても一部影響があると考えられるが, 今までの *in vitro* 研究と同じ結果から低酸素影響によるものが大きいと考えられるという回答を得た。(3) については, 酸素分圧を酸素感知微小電極で測ることで低酸素状態を確認する方法があり, 今回使用した Hypoxyprobe-1 が低酸素時に染色される場合の酸素分圧値についての報告論文において, この方法が使用されているという回答を得た。(4) については, これまでのラットにおける歯牙再植, 移植実験等での実験期間では14日目より形態的な変化を示していたため本実験でも同様の期間にて行ったという回答を得た。また用語, 英文表記, 図表の修正等, についての指摘が行われた。

論文内容及びその質疑により概ね妥当な回答が得られたことにより, 本研究は今後の歯学の進歩, 発展に寄与するところ大であり学位授与に値すると判定した。