



Title	窩洞形成後の歯髄において誘導される分子の修復象牙質形成における役割
Author(s)	吉岡, 靖介
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58431
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【結論】

窩洞形成後の歯髄において誘導される分子について検索、解析を行った結果、歯髄内部に存在する未分化間葉系細胞まで影響を与える TIMP1 が修復象牙質の形成過程において重要な機能を果たしている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、窩洞形成後のラットの歯髄治癒過程において発現する遺伝子の網羅的検索を行い、発現上昇を示した遺伝子やそれに関連する分子の修復象牙質形成における役割について、病理組織学的ならびに分子生物学的手法を用いて解析を行ったものである。

その結果、窩洞形成の刺激によって、Matrix metalloprotease (MMP) 3、MMP13の MMP 分子および MMP の抑制因子である *Tissue inhibitor of metalloprotease 1* (TIMP1) 遺伝子の発現が誘導されることが明らかとなり、その中でも TIMP1 が修復象牙質形成において重要な機能を果たす可能性が示唆された。

以上の研究成果は、修復象牙質の形成メカニズム解明の一端を担うものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。

氏名	吉 吉	岡 岡	せい 靖	すけ 介
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)			
学 位 記 番 号	第 2 4 4 9 3 号			
学 位 授 与 年 月 日	平 成 23 年 3 月 25 日			
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻			
学 位 論 文 名	窩洞形成後の歯髄において誘導される分子の修復象牙質形成における役割			
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 恵比須繁之 (副査) 教 授 阪井 丘芳 講 師 佐伯万騎男 講 師 中澤 光博			

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

原生象牙質は上皮組織と間葉組織の相互作用により形成されるが、う蝕や窩洞形成などの非生理的な刺激によって後天的に形成される修復象牙質は間葉組織のみから形成され、両者は異なる形成メカニズムを有するとされている。しかし、修復象牙質の形成過程においてどのような分子が重要な機能を果たしているかなど、その詳細はいまだに明らかにされていない。

本研究では、修復象牙質の形成メカニズムの一端を明らかにするために、窩洞形成後の歯髄で発現する遺伝子の網羅的検索を行い、発現が上昇している遺伝子や関連する分子の修復象牙質形成過程における役割について検討を行った。

【材料と方法】

実験 1. ラット修復象牙質形成過程における発現遺伝子のマイクロアレイによる検索

9 週齢雄性 Wistar 系ラットの上顎第一臼歯近心面に、歯髄との間に残存する象牙質厚さが 200～300 μm となるように窩洞をラウンドバーで形成した。窩洞形成直後および 1、3 日後に被験歯を抜去し、歯髄細胞から total RNA を抽出して、マイクロアレイ解析を行った。その後、窩洞形成を行っていない歯と比較して、2 倍以上の発現差を認めた遺伝子の中から継続的に発現上昇を認めたものを抽出し、さらに、それらの中から炎症反応や創傷治癒、細胞の発生・分化に関与するとの報告がある遺伝子を選択した。

実験 2. リアルタイム PCR 法による遺伝子発現の解析

実験 1 で選択した遺伝子群について、リアルタイム PCR 法により、マイクロアレイの結果の検証を行った。

実験 3. *In situ* hybridization 法による mRNA の局在解析

1) 凍結切片作製

実験 1 と同様の手法にてラット臼歯に窩洞を形成し、4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定を行った。その後、被験歯を摘出し、ギ酸・クエン酸ナトリウム溶液にて脱灰を行った後、OCT compound® に包埋し、厚さ 12 μm の切片を作製した。

2) プローブ作製 (*Mmp3*、*Mmp13*、*Timp1*、*Axin2*) ならびに染色

Matrix metalloprotease 3 (*Mmp3*)、*Matrix metalloprotease 13* (*Mmp13*)、*Tissue inhibitor of metalloprotease 1*

(*Timp1*) については、リアルタイム PCR 法を行う際に得た cDNA をそれぞれ PCR 法にて増幅後、pGEM®-T Easy Vector に挿入した。*Axin2* は既製のプラスミドを用いた。それぞれを、制限酵素にて直鎖化後、*in vitro* 転写により、DIG 標識 cRNA プローブを得た。次に、作製した切片に上記プローブを用いて 55℃でハイブリダイゼーションを行い、シグナルを検出した。

1. *TIMP1* が象牙芽細胞様細胞の増殖と石灰化に与える影響の検討

マウス象牙芽細胞様細胞株 MDPC-23 に *TIMP1* が及ぼす影響を検討するために、培地に *TIMP1* のリコンビナントタンパクを添加して培養を行い、*TIMP1* が MDPC-23 の増殖に与える影響について、WST-1 法にて検討した。また、石灰化に与える影響について、培養開始後 14 日目に生成された石灰化物に Alizarin red 染色を施した上で、石灰化物の定量を行った。

実験 4. 窩洞直下歯髄における β -catenin タンパクの免疫組織化学法による局在解析

実験 3-1) と同様の手法にて作製した切片に対し、ブロッキングを行った後、抗 β -catenin 抗体を一晩反応させた。その後、蛍光色素 Cy3 と DAPI を用いて可視化し、 β -catenin タンパクの局在について解析した。

実験 5. *Timp1* 転写開始部位上流領域に対して β -catenin タンパクが与える影響の検討

マウス *Timp1* のプロモーター領域 (転写開始部位の上流約 2.8 kbp) を mouse genomic DNA を鋳型として PCR 法により増幅し、pGL3basic Vector® にサブクローニングした。次に、MDPC-23 とマウス未分化間葉系細胞株 OD-21 に上記プラスミドとともに恒常活性型 β -catenin および恒常不活性型 T-Cell Factor 4 (TCF4) を遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイにより β -catenin が *Timp1* の転写に与える影響について検討した。

【結果ならびに考察】

ラット臼歯に窩洞形成を行った後の歯髄における遺伝子発現について、マイクロアレイを用いて経時的に解析した結果、窩洞形成を行っていない場合と比較して、MMP 分子である *Mmp3*、*Mmp13* ならびに MMP の抑制因子である *Timp1* の継続的な発現上昇が認められた。MMP 分子は、創傷治癒や血管新生、細胞外基質のリモデリングに関与しているとの報告があり、これら 3 分子が修復象牙質の形成に関与している可能性が考えられた。また、リアルタイム PCR 法においてもマイクロアレイと同様の結果が得られた。

次に、これら 3 分子の mRNA の局在を *in situ* hybridization 法にて検討した結果、窩洞直下の歯髄において、窩洞形成後 3 日目に *Mmp13* の発現が、また、窩洞形成直後および 1、3 日後に *Timp1* の発現が確認された。特に *Timp1* は、*Mmp13* と比較して広い領域に継続して発現しており、歯髄の治癒に与える影響がより大きいものと推測された。そこで、*in vitro* において MDPC-23 を *TIMP1* 添加条件下で培養したところ、増殖能に関しては添加した *TIMP1* の濃度依存的に抑制傾向を示し、石灰化は 50 ng/ml の *TIMP1* を添加することで有意に促進された。これらのことから、*TIMP1* が修復象牙質の石灰化に関与している可能性が示唆された。

これまでに、骨芽細胞の分化の際に *Timp1* の転写を Wnt/ β -catenin 経路が制御していること、および骨折時や軟骨組織が機械的な刺激を受けた時に Wnt/ β -catenin 経路が活性化されることが報告されている。そこで、窩洞形成の刺激によっても Wnt/ β -catenin 経路が活性化されるのではないかと仮説を立て、窩洞直下歯髄における β -catenin タンパクの局在について免疫組織化学法にて検討を行った。また、Wnt/ β -catenin 経路のネガティブフィードバック因子であり、さらにその標的遺伝子の一つである *Axin2* の局在について *in situ* hybridization 法による検討を行った。その結果、 β -catenin の核内移行が観察され、*Axin2* の発現も窩洞直下歯髄において確認された。さらに *Timp1* のプロモーター解析の結果、 β -catenin と T-Cell Factor の結合領域を欠失させると、OD-21 において転写が有意に抑制されることが確認され、未分化な細胞は Wnt/ β -catenin 経路の影響を大きく受けることが明らかとなった。

In situ hybridization 法における *Timp1* の発現ならびに免疫組織化学法における β -catenin の核内移行は、いずれも象牙芽細胞層を超えて歯髄内部にまで及んでいたことから、窩洞形成に伴う侵襲は、窩洞直下の象牙芽細胞のみならず、それよりも内側の歯髄に存在する未分化間葉系細胞にも影響を与えている可能性が示唆された。