







## 学位論文審査の結果及び最終試験の結果の要旨

|   |                  |  |  |
|---|------------------|--|--|
| 学位申請者氏名   | 趙 麗娟             |  |  |
| 学 位 論 文 名   | 修復象牙質の形成メカニズムの解析 |  |  |
| 論 文 審 査 委 員   | 主査：              | 松本歯科大学 教授  | 山本昭夫  |
|   | 副査：              | 松本歯科大学 教授  | 平岡行博  |
|   | 副査：              | 松本歯科大学 准教授   | 田所 治  |
|   | 副査：              |  |       |
|   | 副査：              |  |       |
|   | 副査：              |  |       |
| 最 終 試 験   | 実 施 年 月 日        | 2019 年 7 月 26 日  |  |
|   | 試 験 方 法          | <input type="checkbox"/> 口答 ・ <input checked="" type="checkbox"/> 筆答 |  |
| 学位論文の要旨   |                  |  |  |
| <p>【背景と目的】窩洞形成などの刺激により象牙質の石灰化が亢進する。この過程において、窩洞形成により象牙芽細胞の細胞死が誘導され、引き続き新成象牙芽細胞の出現が観察される。しかしながら、象牙芽細胞の細胞死と修復象牙質との関係は良く解っていない。今回我々は、遺伝子改変マウスを用いて、ジフテリア毒素(DT)投与により、象牙芽細胞を特異的に死滅させる実験系を構築した。この実験系を用いて修復象牙質の形成と象牙芽細胞死との関係性を調べることを目的とした。</p> <p>【方法】</p> <p>(1) 象牙芽細胞の検出実験系の確立：I 型コラーゲン(Col1)とNestinタンパク質をマーカーとして象牙芽細胞の検出を試みた。Col1の発現は、Col1のプロモーター[Col1(2.3)]の制御下でGFPを発現するマウス[Col1(2.3)-GFPマウス]を用いた。Nestinの検出には、抗Nestin抗体を用いた。</p> <p>(2) マウスの成長過程における象牙質形成の観察：マウスは出生後も象牙芽細胞による石灰化が亢進する。6、7、12、20 週齢の野生型マウスにカルセイン(0.48 mg/マウス)を4日の間隔をあけて2回投与した。2回目のカルセイン投与の1日後に上顎第一大臼歯を回収した。共焦点顕微鏡を用いてカルセインラベルを観察し、象牙芽細胞の石灰化の程度を解析した。</p> <p>(3) 象牙芽細胞の枯渇実験系の確立と新生象牙質形成の観察：Col1 のプロモーター[Col1(2.3)]の制御下でCreを発現するマウスとCre依存的にジフテリア毒素受容体(DTR)を発現するマウスを交配させた(Col1(2.3)-Cre/flox-stop-flox-DTR マウス)。Col1(2.3)-Cre/DTR マウスにジフテリア毒素(DT)(250 ng)を6日間投与した。最後のDT投与の1日後に象牙芽細胞を観察した。また、DT投与の1週間後に修復象牙質の形成をカルセインラベルにより観察した。</p> <p>(4) 象牙芽細胞の枯渇後の新生象牙芽細胞の観察</p> <p>①：「遺伝子改変マウスを用いた新生象牙芽細胞の観察」：I 型コラーゲンのプロモーター遺伝子[Col1(2.3)]の制御下でGFPを発現するマウス[Col1(2.3)-GFP]の歯髄内では、象牙芽細胞特異的にGFPが発現することを以前に確認した。象牙芽細胞を枯渇できる遺伝子改変マウス[Col1(2.3)-Cre/flox-stop-flox-DTRマウス]とCol1(2.3)-GFPマウスを交配した。以上のマウスにDTを1週間投与し、象牙芽細胞の再生をGFPにより観察した。</p> <p>②：「in situ ハイブリダイゼーションを用いた新生象牙芽細胞の観察」：Col1(2.3)-Cre/DTRマウスを用いて象牙芽細胞を枯渇し、象牙質シアロ蛋白質(dentin sialoprophosphoprotein: DSPP)の in situ ハイブリダイゼーションにより新生象牙芽細胞を観察した。</p> <p>【結果】</p> <p>(1) 象牙芽細胞の検出実験系の確立：Col1(2.3)-GFP マウスの第一大臼歯を回収し、凍結切片を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、象牙芽細胞に特異的な GFP の発現が認められた。また、パラフィン切片における抗 Nestin 抗体染色により、象牙芽細胞を Nestin 陽性細胞として観察できた。</p> |                  |  |  |



(様式第 13 号)

- (2) マウスの成長過程における象牙質形成の観察:6 週齢では象牙質全体にカルセインの取り込みが認められた。一方、12 週齢以降ではカルセインでラベルされる象牙質は殆ど確認できなかった。以上より、マウスでは生後 12 週以降に象牙芽細胞の石灰化が低下することが明らかになった。
- (3) 象牙芽細胞の枯渇実験系:Col1(2.3)-Cre/DTR マウスに DT を投与することにより、象牙芽細胞の枯渇が観察された。また、DT による象牙芽細胞の枯渇後に、象牙質へのカルセインの取り込みが認められた。一方、コントロールマウス(DTR)では、DT 投与による象牙芽細胞への影響は認められず、象牙質へのカルセインの取り込みも確認されなかった。
- (4) Col1(2.3)-Cre/DTR/Col1(2.3)-GFP マウスでは、DT 投与直後に GFP 陽性の象牙芽細胞が著しく減少した。しかし、象牙芽細胞は時間依存的に再生することが明らかになった。再生した象牙芽細胞が DSPP 陽性であることが in situ ハイブリダイゼーションにより確認できた。
- (5) Col1(2.3)-Cre/DTR マウスでは、DT 投与後に象牙質体積が有意に増加することがマイクロ CT 解析により明らかになった。一方で、歯髄体積は減少した。また、歯の全体積に対する硬組織の相対比率は有意に上昇することが認められた。以上の結果より、象牙芽細胞の細胞死が新生象牙質形成を誘導することが示された。

【結論】

以上の結果より、象牙芽細胞の枯渇が再生象牙芽細胞の形成、ならびに新生象牙質を誘導することが明らかになった。すなわち象牙芽細胞死を引き金とした、新生象牙質の形成を調節する歯髄環境の存在が示唆された。

学位論文審査結果の要旨

象牙芽細胞の死と修復象牙質の形成との関係はこれまでのところ明確ではない。そこで遺伝子改変マウスを用いて、ジフテリア毒素(DT)投与により象牙芽細胞を特異的に死滅させる実験系を構築して修復象牙質の形成と象牙芽細胞死との関係性を調べた研究である。その研究方法、結果については学位論文の要旨に記述の通りである。

結論として象牙芽細胞の死を引き金とするPTH/PTHrP受容体/PKA経路を介した象牙芽細胞の再生および新生象牙質の形成を調節する歯髄環境の存在を示唆されたもので、意義ある研究で今後PTH/PTHrP受容体/PKA経路の活性化による人為的な制御を基盤とした歯科治療法の確立に向けて大きく貢献するものと考えられるもので、本論文が博士(歯学)の学位論文に値すると判断した。

最終試験結果の要旨

申請者の学位論文“象牙芽細胞の枯渇は象牙芽細胞分化と象牙質形成を誘導する”について以下の質問を行い明確な回答が得られた。

質問事項

1. 修復象牙質の形成メカニズムについて述べて下さい。
2. 切削での観察で臼歯との差が認められたか。
3. この研究のモチベーションは何か。
4. col1(2,3)陽性すべての細胞が「象牙芽細胞」とする根拠について、形態学的に具体的に述べてください。
5. DT によって象牙芽細胞を枯渇させ、細胞死したとする H・E 染色の写真と所見が不明瞭です(図2c)。さらにその後、象牙芽細胞が再生したとしていますが、その根拠を具体的に教えてください。
6. DT が象牙芽細胞を枯渇させる時間はどのくらいでしたか。
7. 図4C(12 週齢)の象牙質において、カルセイン標識された成長線がまったくみられなかった理由と、歯槽骨にまばらにみられたカルセイン標識産物は何か?考えられることを述べてください。
8. 今回の研究結果をもとに今後の展開はどのように考えていますか。

以上により、申請者は博士(歯学)として十分な学力および見識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

判 定 結 果

合格

・ 不合格

備考

- 1 学位論文名が外国語で表示されている場合には、日本語訳を( )を付して記入すること。
- 2 学位論文名が日本語で表示されている場合には、英語訳を( )を付して記入すること。
- 3 論文審査委員名の前に、所属機関・職名を記入すること。