

学位論文内容の要旨

論文提出者	横川 大輔
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 河野 哲 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 永山 元彦 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 川木 晴美
論文題目	Chemokine like receptor 1-positive cells are present in the odontoblast layer in the tooth tissue in rats and humans
論文内容の要旨	<p>【目的】</p> <p>CD44 は膜貫通型糖タンパク質であり歯髄幹細胞のマーカーである。過去の研究より CD44 は歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化や象牙芽細胞による石灰化への関与が示唆されている。梶浦らの先行研究(2021)では, CD44 は Shikonin による歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化誘導や DSPP (象牙質シアロリントタンパク) の発現に関与していることを明らかにした。そこで歯髄幹細胞や象牙芽細胞に発現し炎症や分化に関与する受容体として, Chemokine like receptor 1 (Chemerin receptor 23 : 以下 CMKLR1) が報告されていた。この CMKLR1 は Chemerin および ResolvinE1 の受容体であり象牙芽細胞や歯髄幹細胞をはじめさまざまな細胞に発現し, これらは炎症の抑制 (炎症性細胞の減少やサイトカイン産生の抑制) に関与している。このように, CD44 と CMKLR1 は歯髄幹細胞あるいは象牙芽細胞に存在し, それぞれ細胞の分化や炎症の抑制への関与が報告されているが, その局在は明らかになっていない。そこで本研究では, CD44 と CMKLR1 の細胞内もしくは組織内の局在を明らかにし, ResolvinE1 の細胞への作用について検討した。</p> <p>【材料および方法】</p> <ol style="list-style-type: none">1. ヒト歯髄幹細胞 (Lonza Walkersville Inc) における CD44 と CMKLR1 の発現を蛍光免疫染色にて観察を行った。2. ウェスタンブロットで ResolvinE1 の LTA (リポタイコ酸) によるグラム陽性細菌の刺激がある場合とない場合のそれぞれの DSPP と COX2 への影響を検証した。3. Wistar ラット (12 週, 雄性) およびヒトの歯における正常歯髄と, 歯髄炎の状態の歯髄の組織切片を作製した。ラットの歯髄炎モデルは動物用イソフルランを用い吸入麻酔下で歯質の切削を行い露髄させ, 24 時間後, 灌流固定を行い組織切片を作成した。また, ヒトで使用した歯は, 矯正学的理由により抜歯となった歯およびう蝕のある第三大臼歯とした。組織切片は抗 CD44 抗体, 抗 CMKLR1 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。 <p>本研究は, 朝日大学歯学部動物実験専門委員会および朝日大学倫理委員会の承認のもと行った。</p> <p>【結果】</p> <ol style="list-style-type: none">1. 蛍光免疫染色よりヒト歯髄幹細胞の細胞レベルにおける CD44 と CMKLR1 の細胞内での局在は異なっていた。

2. ウェスタンブロットより ResolvinE1 は DSPP の発現を活性化させることを示した. LTA による刺激の中, ResolvinE1 は COX2 の発現を抑制しないが, DSPP の発現を活性化した. また, CD44 は ResolvinE1 や LTA の刺激の有無に関わらず発現していた.

3. 免疫組織化学染色よりラットおよびヒトの正常歯髄組織において CD44 と CMKLR1 の発現は象牙芽細胞層に陽性が確認できた. しかし, 歯髄炎を起こしたラットおよびヒトの歯髄組織において CMKLR1 では陽性を示し, CD44 では陰性であった.

【考 察】

免疫組織化学染色より CD44 と CMKLR1 は共に象牙芽細胞層に存在し, 歯髄炎の状態であっても CMKLR1 の発現は認められた. ResolvinE1 の刺激下の中, DSPP の発現を上昇し, かつ炎症刺激の存在下でも DSPP の発現を認めたため, 炎症状態であっても歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導に関係することが示唆された. また, CD44 はウェスタンブロットにおいて炎症刺激の存在下では発現に大きな変化はなかったが, 歯髄炎の組織像では発現を確認することができなかった. これは炎症の進行の程度による発現の有無の可能性やウェスタンブロットは条件を整えた環境の中での研究になり, ラットやヒトの組織切片ではさまざまな要素が含まれるので, 本研究の免疫組織化学染色では確認できなかった可能性がある. CD44 と CMKLR1 は共に炎症の中でも発現する可能性があることや DSPP の活性化という共通点はあるものの, 蛍光免疫染色から歯髄幹細胞の細胞内での局在は共存していなかった.

【結 論】

CD44 と CMKLR1 が歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化誘導に関わることにより, 今後の幹細胞を用いた歯髄の再生に影響する可能性が示唆された.