

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 佐 貫 環 (栃木県)
博士の専攻分野 博 士 (歯 学)
学位記番号 甲 第 510 号
学位授与年月日 令和3年3月14日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学専攻
学位論文題目 Characterization of Living Dental Pulp Cells in Direct Contact with Mineral Trioxide Aggregate
(Mineral Trioxide Aggregate と直接接触した歯髄細胞の特性の評価)
Cells 9(10): 2336. 2020
論文審査委員 主査 教授 早 川 徹
副査 教授 下 田 信 治 副査 教授 細 矢 哲 康

内容の要旨

【緒 言】

Mineral Trioxide Aggregate (MTA) は、1990年代初頭に米国で開発され、種々の歯内療法に応用されている¹⁾。日本では2007年から市販されており、ケイ酸三カルシウム、ケイ酸二カルシウム、アルミン酸三カルシウムなどの無機酸化物を主な構成成分とし、水と混和することで硬化する材料である。これまで、多くの良好な臨床報告に加え、構成成分に関連する研究として、生体適合性、封鎖性、抗菌性などを中心に、間葉系幹細胞やヒト歯髄細胞を用いた細胞毒性、細胞増殖、遺伝子発現など、多方面にわたる研究が盛んに行われている。しかしながら、MTAと直接接触している生細胞の動向を調べた研究報告はない。本研究の目的は、MTAと直接接触した状態で生存する、歯髄細胞の細胞数の変化、成長因子の影響と走化性、遺伝子発現ならびに結晶状態を分析することである。

【材料と方法】

被験試料として、シリコン製の型枠を用いて直径10 mm、厚さ1.8 mmのMTAディスクを作製した。

初めに、不透明な試料上で細胞を観察するために、不死化したブタの歯髄細胞 (PPU7細胞) に、赤色蛍光タンパク質 (DsRed) を遺伝子導入 (DsRed-PPU7細胞) し、限界希釈法にてクローニングした。次に、DsRedの影響を確認するために、PPU7細胞とDsRed-PPU7細胞のAlkaline Phosphatase (ALP) 活性を測定した。

細胞数と蛍光強度の関係を観察するために、DsRed-PPU7細胞を96 wellプレートに1,250 ~ 20,000 cells/wellまたは2,000 cells/wellで播種し6日間培養を行った。24時間毎に、細胞数はMTS assay kitを用いて測定し、蛍光強度に関しては、試料を0.5%アガロースゲルで薄くコーティングした6 wellプレートに、細胞接着面を下にして静置して倒立型蛍光顕微鏡にて撮影した。撮影画像から画像処理ソフトウェア (Image J) を用いて蛍光強度を測定した。

成長因子の影響と走化性を観察するために、試料を6 wellプレートに静置し、DsRed-PPU7細胞を20,000 cells播種した。これにBone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2)、BMP inhibitorであるLDN-193189、ならびにTransforming Growth Factor β (TGF- β)、TGF- β inhibitorであるSB-431542を添加して14日間培養した。2日ごとに倒立型蛍光顕微鏡で撮影した画像から蛍光強度を測定し、細胞数ならびに走化性を観察することで成長因子の影響について分析した。また、real time PCRにて*Dspp-v1*、*Dspp-v2*、*Mmp-20*、*Col1a1*の遺伝子発現の測定、走査型電子顕微鏡 (SEM) や電子線マイクロアナライザ (EPMA) を用いて結晶状態の分析を行った。

【結 果】

限界希釈法でクローニングすることにより、安定したDsRed-PPU7細胞を得ることができた。また、DsRedの導入によるALP活性への影響は認められなかった。

細胞数と蛍光強度間の決定係数は0.997であり、細胞数とMTS assay間では0.939となり、いずれも正の相関が認められた。また、蛍光強度の倍加時間は1.19日、MTS assayの倍加時間は1.16日であり、細胞数の測定に蛍光強度を利用することが可能であった。

成長因子の影響と走化性は、DsRed-PPU7細胞の蛍光強度が、6日目までは試料中央部で増強し、7日目以降は外周に移動する傾向を示した。蛍光強度は6日目のTGF- β 添加群で最も高く、8日目にはBMP-2添加群でも蛍光強度が増強した。

遺伝子発現は、BMP-2添加群で、*Dspp-v1*、*Mmp20*、*Col1a1*が対照群より有意に高かった。一方、これらの発現はLDN-193189添加群では抑制された。TGF- β 添加群では、同様に*Dspp-v1*、*Mmp20*、*Col1a1*の発現が対照群より有意に高く、SB-431542添加群では著しく抑制された。

SEM観察では、培養条件が石灰化培地のみ、LDN-193189、TGF- β 、SB-431542の各添加において、試料表面に球状析出物が観察された。さらにLDN-193189添加群では、三角錐の析出物も観察されたが、大きさは球状の析出物に比べて小さかった。また、球状ならびに三角錐の析出物表面には多数の板状結晶が認められた。EPMA観察では、球状の析出物には内部に空洞があり元素は検出されなかったが、外側はCaとPで構成されておりCa/P比は1.15～1.95であった。三角錐の析出物では内部に高濃度のCaを有し、外側は球状析出物からなりCa/P比は1.63～2.01であった。

【考 察】

これまでのMTAディスクを使用した研究では、培養インサートを用いた細胞実験や試料からの溶出成分に対する細胞の影響が報告されている。本研究では、不透明な試料上で生存しているDsRed-PPU7細胞を直接観察することにより、細胞増殖への影響は、構成成分、水酸化カルシウムの放出ならびにpHの上昇によって引き起こされた可能性があると考えられる。成長因子の影響は、BMP-2ならびにTGF- β は、細胞の移動速度に影響を与えないと考えられる。また、細胞の負の走化性は、石灰化析出物に関連する環境変化のために起こったと思われる。遺伝子発現では、DsRed-PPU7細胞が象牙芽細胞様細胞の方向に分化した可能性があり、さらに、BMP-2が象牙芽細胞様細胞の分化を増強していると考えられる。試料の石灰化析出物である、球状析出物の表面の板状結晶は、非晶質相からの転移の過程における、リン酸二カルシウム二水和物などのリン酸カルシウム結晶であると考えられる。

【結 論】

MTAディスクと直接接触しているDsRed-PPU7細胞は、MTA周囲の環境に応じて細胞数を増減させながら、象牙芽細胞に分化することが示唆された。

【文 献】

1) Lee S.J., Monsef M., Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. J Endod. 1993, 19, 541-544.

審査の結果の要旨

Mineral Trioxide Aggregate (MTA) セメントは、ケイ酸三カルシウム、ケイ酸二カルシウム、アルミン酸三カルシウムなどの無機酸化物を水と練和することで硬化する材料である。歯内療法においては、直接覆髄の他、穿孔部封鎖や根管充填などに応用されている。MTAセメントが歯髄細胞に与える影響については多くの報告があるが、MTAセメントと直接接触している状態での生細胞の動向を調べた研究は報告されていない。本研究では、MTAセメントと直接接触した状態での歯髄細胞の細胞数の変化、成長因子添加の影響と細胞の走化性、遺伝子発現ならびに石灰化析出物の分析を行った。

まず、不透明な試料上での細胞の挙動を観察するために、不死化したブタの歯髄細胞(PPU7細胞)に赤色蛍光タンパク質(DsRed)を遺伝子導入した。限界希釈法でクローニングすることにより安定した遺伝子導入細胞(DsRed-PPU7細胞)を得ることができ、DsRedの導入によるAlkaline Phosphatase活性への影響は認められなかった。

次に、成長因子の添加が細胞数および細胞の走化性に与える影響を調べた。MTAセメントディスク上にDsRed-PPU7細胞を播種し、Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2)、BMP inhibitorであるLDN-193189、Transforming Growth Factor β (TGF- β)、TGF- β inhibitorであるSB-431542を添加して14日間培養した。DsRed-PPU7細胞の蛍光強度は、培養6日目までは試料中央部で増強し、7日目以降は外周に移動する傾向を示した。蛍光強度は培養6日目のTGF- β 添加群で最も高く、

8日目には BMP-2 添加群でも蛍光強度が増強した。

また, real time PCR にて遺伝子発現の測定を行った所, BMP-2 添加群および TGF- β 添加群では *Dspp-v1*, *Mmp20*, *Colla1* の発現が有意に高く, 象牙芽細胞への分化が示唆された。一方, これらの発現は LDN-193189 添加群や SB-431542 添加群では抑制された。培養 14 日後に析出した球状および三角錐状の石灰化物は, 電子線マイクロアナライザー解析によってリン酸 2 カルシウム 2 水和物およびヒドロキシアパタイト様析出物と推測された。

以上, 本研究では MTA セメントに直接接触した状態での歯髄細胞の増殖, 分化について検討し, MTA セメントの直接覆髄材としての挙動を明確にすることができた。これらの結果は, 歯内療法の実現に大いに寄与するものと考えられる。よって, 本論文は博士 (歯学) の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。