

氏 名	穴田 理嵯
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第6817号
学位授与の日付	令和5年3月24日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Important roles of odontoblast membrane phospholipids in early dentin mineralization (象牙質初期石灰化における象牙芽細胞膜由来リン脂質の役割)
論文審査委員	岡村 裕彦 教授 寺町 順平 准教授 大原 直子 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

象牙質は歯の主要な硬組織であり、外傷などで欠損した場合、代謝はほとんど認められないため自然治癒は望めない。歯の修復材料に関する研究は数十年以上の時間が費やされている。修復材料として、レジンマトリックスにフィラーを添加した無機/有機複合材料が歯科修復材料の世界的な主流であるが、それらの材料は歯質に直接接着せず、生存率に限界があるといった問題がある。また、これら以外の材料、例えば、歯本来の成分であるリン酸カルシウムを主材料とした歯の代替材料は依然、研究段階である。この理由として、リン酸カルシウムと有機基質（例えば、コラーゲン）を単純に複合化させただけでは、構造的・物性的に歯と同様の性質を再現できないことが挙げられる。つまり、リン酸カルシウムを主材料とした歯の代替材料を作製するにはこれまでとは異なる無機/有機成分の複合化方法を考案する必要がある。現状、象牙質における石灰化過程を再現するための理解は不十分であり、*in vitro*で象牙質の構造と性質を再現する技術はほとんどない。機能や機械的特性を向上させた新しい象牙質様複合材料の開発において、象牙質の形成過程をより詳細に、材料学的に理解することが重要である。本研究では、象牙質のボトムアップ構築に必要な材料学的情報の獲得を目的に、マウス第一大臼歯歯胚の初期石灰化時期および部位を同定し、象牙質初期石灰化過程を材料学的に検討した。これら知見を元に考案する材料合成技術は、新規無機/有機ハイブリッド材料作製のために重要であると考えられる。

【材料および方法】

1. カルセイン染色による初期石灰化部位同定

石灰化開始部位を特定するため、カルセインを 0.1 mL (20 mg/kg) 出産 2 日前の親マウス腹腔内へ注入した。カルセイン染色による石灰化領域の観察のため、胎生 18 日 (E18) および生後 0、1 日 (P0、P1) の第一大臼歯を回収し、蛍光実体顕微鏡下で観察した。

2. パラフィン切片、凍結切片およびレジン包埋切片の作製

胎生 18 日 (E18) および生後 0～3 日 (P0～P3) の ICR マウスを用いた。親マウスおよび新生児マウスをイソフルランの過剰吸入にて安楽死させた後、胎児および新生児マウス下顎骨中の第一大臼歯を採取しパラフィン切片、凍結切片、レジン包埋切片の作製に使用した。

3. 電子顕微鏡観察および石灰化物の定性解析

レジン包埋標本をダイヤモンドナイフにより厚さ 100 nm に薄切し、電界放出形走査電子顕微鏡・走査型透過電子顕微鏡（Field Emission-Scanning Electron Microscope：FE-SEM・Scanning transmission electron microscope：STEM）を用いて観察した。定性解析には、マウス第一大臼歯象牙質の未石灰化部位および石灰化部位を特異的に選択し、電子線回折・エネルギー分散型 X 線分析（EDS）・元素マッピングを行った。

4. 組織学的観察

作製したパラフィン切片を用い、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い光学顕微鏡下で観察した。凍結切片を用い、免疫組織化学染色（Immunohistochemistry：IHC）のために、一次抗体で免疫標識した。一次抗体には rabbit anti-Annexin V antibody、rabbit anti-Type I collagen antibodyを用いた。二次抗体には、Alexa Fluor 488 または 568 で標識された goat anti-rabbit IgGを用いた。核染色はHoechst 33342で行った。共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

5. *In vitro*石灰化実験

マウス間葉系幹細胞株であるKUSA-A1細胞を10%ウシ胎児血清および 1%ペニシリン・ストレプトマイシン含有 alpha Modified Eagle Minimum Essential Medium（ α -MEM）にて培養した。細胞を回収後、超音波処理にて粉碎し、細胞膜断片の単離、精製のために遠心分離を行った。単離した細胞膜断片をコラーゲングルと混和し、組織培養プレート中にゲルを静置、 β -グリセロリン酸（10 mM）を添加した α -MEMで2日間培養した。細胞膜に多く含まれるホスファチジルセリンを用い、同様な石灰化実験を行った。石灰化の評価には、アリザリンレッド染色、FE-SEM観察ならびにEDSによる元素分析を行った。

【結果と考察】

マウス第一大臼歯の石灰化開始点は P0 の頬側中央咬頭であり、その後、歯冠表層に沿って広がり、その他の歯冠咬頭頂からも石灰化が認められた。FE-SEM 観察より、P0 では、象牙質の石灰化が開始されることが示された。電子線回折の結果、P0 の象牙質初期石灰化物は非晶質であった。P1 では、石灰化領域にアパタイト結晶が認められた。つまり、初期象牙質は非晶質から多結晶に変化していくと考えられた。さらに、P1 の象牙質石灰化最前線における初期石灰化を STEM にて観察した結果、最初期石灰化物の多くは針状結晶を示し、配向性は認められなかった。初期結晶はコラーゲン特有のバンドル構造を示す線維性物質の存在部位と関連性が認められた。低石灰化領域での元素マッピングの結果、石灰化前のコラーゲン線維において、リンとオスミウムが同一部位で局在していた。オスミウムは脂質との結合性が高いことが知られており、コラーゲン線維にリン脂質が共局在していると考えられた。さらに、IHC の結果、初期石灰化部位におけるコラーゲンならびに Annexin V の局在が一致していた。Annexin V は一般的にコラーゲンと結合する特性をもち、アポトーシスのマーカーかつ細胞膜結合タンパク質である。同部位に存在する細胞は象牙芽細胞のみであることから、象牙質石灰化はコラーゲン線維に吸着した象牙芽細胞の細胞膜由来リン脂質が起点となっていることが示唆された。*In vitro* 石灰化実験により、細胞膜由来リン脂質および細胞膜成分であるホスファチジルセリンは迅速に石灰化を誘導した。

【結論】

マウス第一大臼歯初期石灰化は P0 に頬側中央咬頭から開始する。その後歯冠形態に沿って石灰化は広がる。象牙質の初期石灰化は象牙芽細胞が分泌したコラーゲン線維と、同部位に存在する細胞膜由来リン脂質により誘導されと考えられた。さらに、コラーゲン線維と細胞膜由来リン脂質断片を材料として使用した *in vitro* 石灰化実験により、細胞膜由来リン脂質が石灰化の誘導に重要な因子であることが示唆された。これら原料を用いること、ならびにこの過程を模倣することで象牙質の組成・物性に類似した新規材料の開発が期待できる。

論文審査結果の要旨

【緒言】

象牙質は歯の主要な硬組織である。象牙質に欠損が生じた場合、レジン、金属およびセラミックスがその修復材料として用いられる。これらの修復材料の物性は象牙質と完全に同じものではないため、より象牙質に近似した修復材料の開発が望まれている。そのためには、象牙質における石灰化過程の詳細な解析が必要である。本研究では、象牙質に近似した修復材料の開発に必要な材料学的情報の獲得を目的に、マウス第一大臼歯歯胚の初期石灰化時期と部位を同定し、象牙質の石灰化過程における構造変化や特性について検討した。

【材料および方法】

出産2日前のICR親マウス腹腔内にカルセイン (20 mg/kg) を投与した。胎生18日 (E18) および生後0、1日 (P0、P1) のマウス下顎第一大臼歯を回収し、蛍光実体顕微鏡を用いて初期石灰化時期と部位を調べた。E18~P3の第一大臼歯を採取し、パラフィン切片、凍結切片およびレジン包埋切片を作製した。初期石灰化部位を、電界放出形走査電子顕微鏡

(Field Emission Scanning Electron Microscope: FE-SEM) および走査型透過電子顕微鏡 (Scanning transmission electron microscope) を用いて観察した。定性解析として電子線回折、エネルギー分散型X線分析 (EDS)、元素マッピングを行った。

Annexin V 抗体、Type I collagen抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡下でリン脂質およびコラーゲンの局在を調べた。*in vitro*石灰化実験では、マウス間葉系幹細胞株であるKUSA-A1細胞を超音波処理にて粉碎し、遠心分離により細胞膜断片を回収した。細胞膜断片あるいはホスファチジルセリンをコラーゲンゲルと混和し、 α -MEM中で2日間培養した後、Alizarin Red S染色、FE-SEM観察とEDSによる元素分析を行った。

【結果と考察】

マウス第一大臼歯ではP0に頬側中央咬頭から象牙質の初期石灰化が開始した。この初期石灰化は象牙芽細胞が分泌したコラーゲン線維と細胞膜由来のリン脂質により誘導されと考えられた。さらに、コラーゲン線維と細胞膜由来のリン脂質・ホスファチジルセリンを材料として使用した*in vitro*石灰化実験により、リン脂質が石灰化誘導の重要因子であることが示唆された。

本研究では、マウス第一大臼歯歯胚の象牙質初期石灰化時期および部位を同定し、形態、特性、組成を明らかにした。さらに、象牙質石灰化には象牙芽細胞の細胞膜由来リン脂質が関与するという新たな知見を得た。*in vitro*石灰化実験によっても、細胞膜由来リン脂質が石灰化誘導に重要な因子であることを示した。これら知見は象牙質の組成・物性に近似した新規材料の開発につながると考えられる。本論文はすでに英王立化学会発行のJournal of Materials Chemistry Bに掲載されており、国際的にも評価されている。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。