

氏名	石本 和也
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5320号
学位授与の日付	平成28年3月25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	Topical Application of Lithium Chloride on the Pulp Induces Dentin Regeneration (歯髄への塩化リチウム局所投与は、象牙質再生を誘導する)
論文審査委員	高柴 正悟 教授      上岡 寛 教授      中野敬介 准教授

### 学位論文内容の要旨

We herein describe a novel procedure for dentin regeneration that mimics the biological processes of tooth development in nature. The canonical Wnt signaling pathway is an important regulator of the *Dentin sialophosphoprotein (Dspp)* expression. Our approach mimics the biological processes underlying tooth development in nature and focuses on the activation of canonical Wnt signaling to trigger the natural process of dentinogenesis. The coronal portion of the dentin and the underlying pulp was removed from the first molars. We applied lithium chloride (LiCl), an activator of canonical Wnt signaling, on the amputated pulp surface to achieve transdifferentiation toward odontoblasts from the surrounding pulpal cells. MicroCT and microscopic analyses demonstrated that the topical application of LiCl induced dentin repair, including the formation of a complete dentin bridge. LiCl-induced dentin is a tubular dentin in which the pulp cells are not embedded within the matrix, as in primary dentin. In contrast, a dentin bridge was not induced in the control group treated with pulp capping with material carriers alone, although osteodentin without tubular formation was induced at a comparatively deeper position from the pulp exposure site. We also evaluated the influence of LiCl on differentiation toward odontoblasts *in vitro*. In the mDP odontoblast cell line, LiCl activated the mRNA expression of *Dspp*, *Axin2* and *Kallikrein 4 (Klk4)* and downregulated the *Osteopontin (Osp)* expression. These results provide a scientific basis for the biomimetic regeneration of dentin using LiCl as a new capping material to activate dentine regeneration.

## 論文審査結果の要旨

古典的Wntシグナル伝達経路は胚発生や細胞増殖など、多様な生命現象を制御するシグナル伝達経路であり、歯の発生過程においても局所的に発現し、様々な成長因子の発現制御に関与することが知られている。申請者は歯の発生過程初期に古典的Wntシグナル伝達経路のリガンドの1つであるWnt10aが象牙質形成に関与することに着目し、歯髄中の古典的Wntシグナル伝達経路を活性化することによって、直接覆髄において象牙質の産生を促進できるのではないかと考えた。

8週齢ラットの上顎第一大臼歯を実験対象とし、麻酔下で生活歯髄切断を行った。歯髄中の象牙芽細胞分化を促進させるため、覆髄剤の基剤に古典的Wntシグナル伝達経路の活性因子である塩化リチウム (LiCl) を添加した。覆髄剤の基剤には、歯科臨床における覆髄法の一つである3Mix-MP法の基剤として使用され、生体為害性および象牙質形成能のないmacrogolとpropyleneglycolを選択した。処置後4週間後にmicro-CT撮影およびHE染色を行った切片の顕微鏡観察を行った結果、LiCl投与群では覆髄面を完全に覆う象牙質橋の形成が観察できた。LiClによって産生が促進された象牙質橋の基質内には歯髄細胞が存在しておらず、象牙質橋直下に配列した象牙芽細胞には、*in situ hybridization*において象牙質シアロリン蛋白である*Dspp*のmRNA量の発現が観察できた。これとは対照的に、基剤のみを覆髄剤として使用した群では象牙質橋の形成はなく、代わりに基質内に歯髄細胞が存在し、不規則な構造を持つ骨様象牙質の形成があった。なお、LiCl投与群の歯髄細胞と比較すると、基剤のみを覆髄剤として使用した群では歯髄細胞が壊死および崩壊しており、失活している可能性が考えられた。

さらに、*in vitro*での象牙芽細胞に対する分化誘導の影響について評価するため、マウス歯乳頭由来細胞株 (mDP) にLiClを添加したところ、培養7日後に象牙質形成マーカーである*Dspp*, *Kallikrein 4*, 古典的Wntシグナル伝達経路マーカーである*Axin2*の遺伝子発現が上昇していた。これらの結果からLiClが古典的Wntシグナル伝達経路を介して、マウス歯乳頭由来細胞株の象牙芽細胞分化を促進させていることが明らかとなった。

本論文は、古典的Wntシグナル伝達経路の活性因子であるLiClを直接覆髄剤として使用することで断髄部に象牙質橋形成が促進されることを示したものであり、これらの知見は古典的Wntシグナル伝達経路の活性化による象牙芽細胞分化の影響を明らかにする糸口になると考えられる。また、新たな覆髄材料として、将来的に臨床応用される可能性も示唆される。

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。