

(様式第 13 号)

2016 年 11 月 16 日

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	松田 紗衣佳	
学位論文名	Migration and Differentiation of GFP-transplanted Bone Marrow-derived Cells into Experimentally Induced Periodontal Polyp in Mice (マウスにおける実験的に発生させた歯根膜ポリープへの GFP 移植骨髄由来細胞の移動と分化)	
論文審査委員	主査:	松本歯科大学 准教授 影山 徹 (印)
	副査:	教授 佐原 紀行 (印)
	副査:	准教授 平賀 徹 (印)
	副査:	(印)
	副査:	(印)
	副査:	(印)
最終試験	実施年月日	2016 年 11 月 16 日
	試験方法	口答 ・ 筆答
学位論文の要旨		
<p>【緒言】 歯根膜ポリープについて古くから病理組織学的な消長や処置に関する研究は数多くある。しかし、その細胞供給がどこから行われているかは明確にされていない。そこで、GFP マウスの骨髄移植の実験系を用いてこの部の細胞が骨髄の間葉細胞に由来するとの仮説のもと、歯根膜ポリープを形成する肉芽組織の構成細胞の動態を追究した。</p> <p>【材料・方法】 実験には GFP 骨髄移植マウスモデルを使用し、上顎第一臼歯の髓床底部を 1/2 歯科用ラウンドバーを用い穿孔した。m_CT と病理組織学的に検討するとともに、GFP について免疫組織化学的にその動態を追究するとともに、GFP-S100A4、GFP-Runx2、GFP-CD31 について蛍光二重染色により検討した。</p> <p>【結果】m_CT 像では、どの時期においても、歯槽骨の吸収と歯根膜腔の拡大が生じていた。術後 2 週間の病理組織像では増殖細胞の主体は、線維芽細胞であり、その細胞の形態は、短い紡錘形で、その核は比較的丸いものが多かった。肉芽組織の最表層には、細胞間橋の明瞭な多角形の上皮細胞が増殖していた。当該の歯根膜部には正常な生理的な配列の歯根膜組織は無く、一部に好中球などの炎症性細胞が認められた。術後 1 ヶ月の病理組織像では、線維芽細胞は 2 週と同様、核は丸みをおび、肉芽組織の主をなしていた。髓床底直下にできた肉芽組織は穿孔部より髓腔内に盛り上がり、最表層は、重層扁平上皮で覆われていた。毛細血管は、2 週と比較して増殖し、とくに上皮直下に多く存在していた。術後 3 ヶ月では、増殖した肉芽組織内の線維芽細胞の核は扁平に変化し、膠原線維が目立つようになってきた。重層扁平上皮は厚みを増していた。毛細血管は、肉芽組織内に多数存在した。術後 6 ヶ月では、増殖した肉芽組織には、膠原線維と、核の扁平な線維芽細胞が、より目立ち、リンパ球はその中に点在していた。GFP の免疫染色では、当該部の肉芽組織内に GFP 陽性細胞が多数みられた。これら GFP 陽性細胞について、その細胞種の同定を行うために、蛍光免疫二重染色を行った。GFP-S100A4 の組み合わせでは、2 週、6 ヶ月ともに、紡錘形の核を持った長紡錘形の細胞に緑色蛍光を示す GFP 陽性所見があり、これらの外形を示す細胞に赤色反応の S-100A4 陽性反応が認められた。これらを重ね合わせによって確認すると、橙色に発色する両者の一致を示す場所があった。さらに核を青色蛍光に発色する DAPI と重ね合わせると、橙色は核の周囲を取り込むように認められた。GFP-Runx2 の組み合わせについては、肉芽組織内には、紡錘状で、丸みをおびたものがあり、同部位には緑色蛍光を発する GFP 陽性所見があり、これらの外形を示す細胞に、赤色蛍光の Runx2 陽性所見が認められた。これを重ね合わせ</p>		

によって確認すると、橙色に発色する両者の一致を示した。形態は、さらに核を青色蛍光に発色する DAPI と重ね合わせると、橙色は核の周囲を取り込むようになっていた。GFP-CD31 では、明瞭な血管腔がみられる部位では、血管内腔面に GFP 陽性の内皮細胞の細胞質が配置していた。この血管腔を作る血管内皮細胞に赤色蛍光の CD31 陽性反応が認められた。これらの重ね合わせでは、GFP-S100A4、GFP-Runx2 と同様であった。

【考察】今回 GFP マウスの第一臼歯の髄床底を穿孔して根分岐部病変を形成し、病理組織学的に病変の進展過程や、増殖した肉芽組織の構成細胞の由来を明確にすることとした。その結果、病理組織学的検討では、初期では若干の化膿性炎症が引き起こされるが、次第に慢性炎症として肉芽組織の増殖が起きていくことが分かった。蛍光二重染色を行った結果、GFP-S100A4 では、紡錘形細胞に S100A4 陽性反応がみられ、かつ、GFP 陽性反応を示したことから通常型の線維芽細胞が骨髄由来であることが分かった。GFP-Runx2 では、肉芽組織内の紡錘形細胞に Runx2 陽性反応を認め、GFP 陽性反応を示したことから、通常の線維芽細胞とは異なった歯根膜線維芽細胞も骨髄に由来することが示唆された。GFP-CD31 において、形態学的に明瞭な血管において CD31 陽性反応を示し、GFP 陽性反応を認めたため、血管内皮細胞も骨髄細胞に由来するものがあることが示された。以上から、髄床底穿孔部にできた歯根膜ポリープには、毛細血管内皮細胞や、線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞が増殖本態であり、これらはいずれも移植骨髄細胞に由来するものであることが分かった。

なお、本研究は Int J Med Sci 誌に掲載された (Int J Med Sci 13(7):500-506, 2016)。

学位論文審査結果の要旨

歯根膜ポリープについて、本研究は GFP 骨髄移植マウスの実験系を用いてこの部の細胞が骨髄の間葉細胞に由来するとの仮説のもと、これを形成する肉芽組織の構成細胞の動態を追究した。

その結果、病理組織学的には重層扁平上皮で被覆された歯根膜ポリープが全例で形成された。また、GFP-S-100A4 の免疫蛍光二重染色では、増殖する肉芽組織内の線維芽細胞が移植骨髄に由来するものがある事を明らかにした。またその一部は GFP-Runx2 の二重染色によって歯根膜特有の線維芽細胞に分化している事が明らかにした。さらに、GFP-CD31 の二重染色結果によってダブルの染色された毛細血管の内皮細胞が確認されたことから、盛んに新生される血管の内皮細胞の一部は移植骨髄由来である可能性が示唆された。本研究の結果から GFP 骨髄移植マウスを用い、歯根膜部に生じた慢性炎症さらにはその治癒過程に出現する様々な細胞の由来を解析できることを示した意義ある研究で学位論文に値する。

最終試験結果の要旨

申請者の学位論文について口答試問した。代表的な質問事項は以下の通りである (順不同)。

1. 本研究に使用した GFP 骨髄マウスには移植時から全身に GFP 陽性細胞が移動していないか？
2. 臨床的に歯根膜ポリープはどの程度発生するか
3. CD31-陽性で GFP 陽性の毛細血管 (の内皮細胞) どの程度発現していたか？
4. スライドに示した、指示して説明した細胞以外にも多くの陽性細胞があるが、これらはどのようにかんがえるのか？
5. 全例にみられた被覆上皮についてはどの様に考えるのか？

以上の質問に対し申請者からは的確な回答がえられたので、本審査会合議の結果、申請者は博士 (歯学) として十分な学力及び知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。