

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462958

研究課題名(和文)象牙質基質タンパク分解産物の同定と覆髄材としての応用

研究課題名(英文) Identification and application of degraded dentin matrix components as a pulp capping agent

研究代表者

高橋 雄介 (TAKAHASHI, YUSUKE)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：60397693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：象牙質基質タンパク(DMCs)はMMPなどの酵素によって分解を受けるが、その分解産物が歯髄細胞の様々な機能を促進し、さらに象牙質-歯髄複合体の創傷治癒も促進することが本研究により明らかとなった。特にMMP20により分解を受けたDMCsは他のMMP分子により分解されたDMCsと比較して、歯髄の創傷治癒をより促進することが明らかとなった。そこで、MMP20により分解されたDMCs分解産物のプロテオーム解析を行ったところ、歯髄の創傷治癒促進に有効な可能性のある8種のタンパクが同定された。以上の結果より、これらの分子は将来的に生物学的根拠に基づく覆髄剤として使用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Dentin matrix components (DMCs) can be degraded by proteinase like MMP molecules. Degraded DMCs by MMPs were found to promote the various functions of pulpal cells in vitro and also promote the wound healing process of dentin-pulp complex in vivo from the results of this study. Especially, degraded DMCs induced by MMP20 showed higher healing ability compared to other MMP molecules. To identify the components of the degraded DMCs by MMP20, proteome analysis was performed and eight candidate proteins were acquired from the analysis. From these results, the candidate molecules had possibilities to promote pulpal repair process and development of true biological pulp capping agent might be possible in the near future.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯学 覆髄 象牙質 歯髄 再生

1. 研究開始当初の背景

象牙質は 70%の無機質、20%の有機質と 10%の水から構成されており、有機質は主に I 型コラーゲン、糖タンパク、プロテオグリカンなどを含有している。その有機成分の象牙質基質タンパク中には象牙質の石灰化に関わる SIBLING 分子や、成長因子、さらには Matrix Metalloproteinase (MMP) 分子などが含まれていることがこれまでに報告されている (George, J Biol Chem, 1993)。

象牙質がう蝕に罹患すると、細菌が産生する酸により無機質は脱灰される。同時に、象牙質中の有機質も細菌由来の酸やプロテアーゼ、さらには象牙質中の内因性 MMP などのプロテアーゼなどによっても侵襲を受けると考えられる。

一方、腎臓や皮膚等の組織において、細胞外基質に存在するタンパクが酸やプロテアーゼによって傷害を受けると、その分解産物が細胞増殖や血管新生などを促進し、創傷治癒に影響を与えることが報告されている (Reing, Tissue Eng, 2009, Brennan, J Tissue Eng Regen Med, 2008)。興味深いことに、象牙質も細胞外基質タンパクを有しており、さらにはう蝕罹患時には、細胞外基質タンパクが酸やプロテアーゼによる侵襲を受ける可能性が高いため、上記の臓器と類似した環境下にあると考えられる。しかし、象牙質の細胞外基質タンパクの分解産物が歯髄の創傷治癒や歯髄細胞に与える影響についての報告はこれまでに認められず、う蝕などの非生理的的刺激により急速に形成される第三象牙質の誘導メカニズムについても未だに不明である。

そういった状況をふまえ、申請者らはこれまでに第三象牙質形成に関与する分子の網羅的検索を行い、Mmp3、Mmp13、Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 (Timp1) の遺伝子発現が窩洞形成後の歯髄において上昇することを明らかにし、さらに Timp1 が第三象牙質形成に重要な役割を果たしていることを解明した (Yoshioka, Takahashi, J Biochem, 2013)。また、MMP 分子が歯髄のみならず、象牙質の基質タンパク中に存在することに着目し、細菌性の酸やプロテアーゼによる侵襲とともに、象牙質中の MMP 分子が基質タンパクを分解、断片化することで、より高活性のペプチドとして機能し、歯髄の治癒を促進する可能性があると考え、MMP 分子をヒト象牙質基質タンパクに作用させたところ、象牙質基質タンパクは分解され、分解されたタンパクは歯髄細胞の増殖や石灰化を促進することも明らかにした。

しかし、もっと多面的な歯髄治癒への影響の検討が必要と考えられることや、分解された象牙質基質タンパクの詳細な性質については全く不明であり、基質タンパクのどの部分が分解され、どのようなタンパクもしくはペプチドとなることで歯髄細胞の機能向上に働いているかを解明できれば、本当の生物

学的根拠に基づいた覆髄材の開発が可能になると考え、本研究の着想を得た。

2. 研究の目的

象牙質基質タンパクの分解産物が歯髄細胞に与える影響を詳細に検討するとともに、MMP 分子により分解されたタンパクプロファイルについて検討し、分解されたタンパクの同定ならびにその機能評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1. 象牙質基質タンパク分解産物が歯髄細胞の機能に与える影響の検討

申請者らが分離した、ヒト象牙質基質タンパク (Dentin Matrix Components; DMCs) に対して、各種 MMP 分子を作用させ、DMCs 分解産物を生成した。本研究で用いた DMCs は英国 National Research Ethics Service により承認を受けた (承認番号: 90/H0405/33)。その DMCs 分解産物が、ラット歯髄初代培養細胞 (Rat Pulp Primary Cells; RPPCs) の遊走能ならびにヒト臍帯静脈内皮細胞の血管新生能に与える影響について検討を行った。本研究は大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認下で実施した (承認番号: 動歯 23-005-1)。

(1) 遊走能の検討

DMCs 分解産物が歯髄細胞の遊走能に与える影響を検討するため、Scratch wound assay を行った。RPPCs を培養皿に播種し、10% FBS 含有 -MEM 中にて培養後、細胞増殖を抑制する目的で 10 μ g/ml mitomycin-C を添加し、1 時間反応させた後、ピペットチップにてディッシュ底部に傷を作成し、分解 DMCs 含有培地もしくは非分解 DMCs 含有培地中にて 36 時間培養した。細胞の移動量を、傷作成直後と 36 時間培養後の細胞の縁端部の距離の差を等間隔の 8 点について測定し、平均値を算出した。細胞移動量の測定および解析には画像解析ソフト (Image J, NIH) を用いた。なお、傷作成後 RPPCs を 1% FBS 含有培地中にて 36 時間培養したものをコントロールとした。試料数は各条件につき 3 とした。

(2) 血管新生能

ヒト血管内皮細胞と繊維芽細胞の共培養を行い、血管管腔形成初期段階となったところに DMCs 分解産物を培地に添加してさらに培養を行い、管腔形成の観察を行った。10 日後に形成された管腔を CD-31 抗体もしくは von Willebrand Factor 抗体を用いて染色を行い、管腔形成量を可視化し、その量を血管新生定量ソフトウェア (KSW-5000U, クラボウ) を用いて定量解析を行った。陽性対照には VEGF を含有した培地を用い、陰性対照には、非分解 DMCs 含有培地を用いたものおよび、VEGF に血管新生抑制因子 Suramin を加えたものを用いた。

2. 象牙質基質タンパク分解産物が象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に与える影響の検討 (in vivo)

実験1の結果より、どのMMP分子で分解されたDMCsが象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に最も効果的かを検討するため、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒の全過程に分解DMCsが与える影響を検討することができると思われる直接覆髄実験をおこない、第三象牙質の形成に与える影響を検討した。

8週齢雄性Wistar系ラットに全身麻酔を施し、窩洞形成はYoshiokaら、Tranらの報告に準じておこなった。左右上顎第一臼歯に対して、電気エンジンに装着した#1ラウンドバーを用いて、咬合面より露髄するような窩洞を形成した。露髄面を止血後、分解DMCsおよび非分解DMCsをゼラチンスポンジに浸漬させた後、直接覆髄をおこなった。その後、ガラスアイオノマーセメント(FUJI IX® GC, 東京)にて充填を行った。窩洞形成から4週後に、実験動物に麻酔薬を過剰投与することで屠殺し、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて灌流固定を行い、被験歯である上顎第一臼歯を含む上顎骨を摘出し、軟組織を除去後、同固定液でさらに12時間浸漬固定後、脱灰をおこなった。その後、通法に則りパラフィン包埋をおこない、厚さ5µmの連続切片をマイクロトームにて作成し、ヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色をおこなった。

病理組織学的評価はDentin bridgeの形成量を対象に行った。評価基準はKibaらの報告を参考に作成したものを使用した。なお、ゼラチンスポンジにPBSを浸漬させ直接覆髄をおこなったものをコントロールとした。試料数は各条件につき6とした。

3. 象牙質基質タンパクの分解産物の分画への分離

これまでDMCs分解産物が歯髄の創傷治癒に与える影響を*in vitro*および*in vivo*において検討を行ってきたが、DMCs分解産物の中のどの部分が実際に歯髄細胞の機能を向上させているのかを検討するために本実験を行った。

DMCs分解産物を、逆相高速液体クロマトグラフィー(Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography: RP-HPLC)を用いてDMCsとDMCs分解産物の分離をおこなった。LC-10ADとCOSMOSIL PBr Packed Column 2.0mmI.D.×150mm(ナカライテスク, 京都)を用い、0.05%ギ酸水溶液を移動相

として用い、流量0.1ml/min.の条件でUV検出器(254nm)により100分間の分析をおこなった。分離された試料を10分毎に、またピークを含む部位は変則的に分取した。

4. HPLCにより分離された分画が歯髄細胞機能へ与える影響の評価(*in vitro*)

実験3において分離されたDMCs分解産物の各分画がRPPCsの機能に与える影響を、細胞増殖能と石灰化能について評価を行った。

5. HPLCにより分離された分画の覆髄材としての評価(*in vivo*)

実験3においてHPLCで分離された分画を用いて、覆髄材としての評価をラットを用いた動物実験系にて行った。

実験2と同様の方法を用いて、上記分画を用いた直接覆髄実験を行った。覆髄から4週経過後の新生硬組織評価としてマイクロCT画像解析および、H-E染色をおこなった。試料数は各条件につき3とした。

6. DMCs分解産物の同定

RP-HPLCによる分離分析前のDMCsおよびDMCs分解産物、そして分離分析後のDMCsおよびDMCs分解産物の分画12+13に含まれるタンパク質の同定を、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法(LC-MS/MS)にておこなった。LC-20AD nanoHPLC(島津製作所, 京都)、75µm×10cm analytical C18 column(BGI, 中国)を用い分析をおこなった。得られたMS/MSスペクトルに対しMascot software version 2.3.02.(MATRIX SCIENCES, 米国)およびUniProtを用いたペプチドマスフィンガープリンティングを行い、タンパク質の同定をおこなった。

4. 研究成果

1. 象牙質基質タンパク分解産物が歯髄細胞の機能に与える影響の検討(*in vitro*)

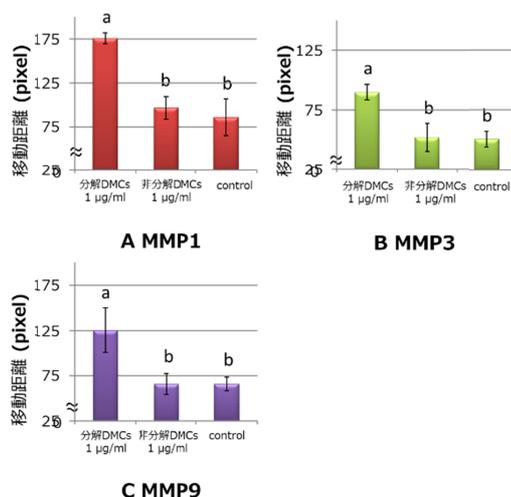
(1)細胞遊走能

Scratch wound assayにて検討をおこなった結果、1µg/mlのMMP1、MMP3およびMMP9により生成されたDMCs分解産物は非分解DMCsと比較してRPPCsの遊走能を促進した($p<0.05$) (図1)。

他のMMP分子による分解DMCsは細胞遊走能に影響を与えなかった($p>0.05$)。

図1. 細胞遊走能

MMP分子による分解DMCsが細胞遊走能に与える影響を検討した。



MMP1 (A)、MMP3 (B) および MMP9 (C) により生成された 1 µg/ml の分解 DMCs は細胞遊走能を促進した。同一文字 (a, b) で示された群間に有意差がないことを示す (One way ANOVA, Tukey-Kramer test, $\alpha=0.05$)。

(2) 血管新生能

MMP 分子によって分解を受けた DMCs が血管新生能に与える影響について検討をおこない、血管内皮細胞のマーカー CD31 を用いて免疫染色後、新生血管管腔面積を定量化したグラフ (図 2) を示す。

1 µg/ml の濃度の MMP1、MMP2 および MMP3 により生成された分解 DMCs は非分解 DMCs と比較して血管新生能を促進した ($p<0.05$)。

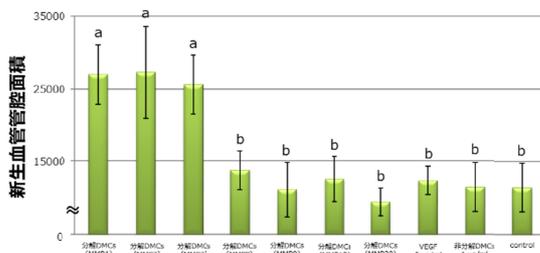


図 2 . 血管新生能

MMP 分子による分解 DMCs が血管新生能に与える影響を検討した。MMP1、MMP2、MMP3 により生成された 1 µg/ml の分解 DMCs および VEGF は血管新生を促進した。他の MMP 分子による分解 DMCs は血管新生を促進しなかった。同一文字 (a, b) で示された群間に有意差はないことを示す (One way ANOVA, Tukey-Kramer test, $\alpha=0.05$)。

これらの結果から、分解 DMCs は象牙質-歯髄複合体の創傷治癒の各過程において時期特異的に働く可能性が示唆された。

しかし、*in vitro* の実験では、創傷治癒の各過程における評価はできても、生体内での複雑な過程を経る創傷治癒モデルを再現するのは困難である。そこで、歯髄の創傷治癒の全過程に対してどの MMP 分子が有効であるかを検討していく必要があると考え、以下の実験を行った。

2. 象牙質基質タンパク分解産物が象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に与える影響の検討 (*in vivo*)

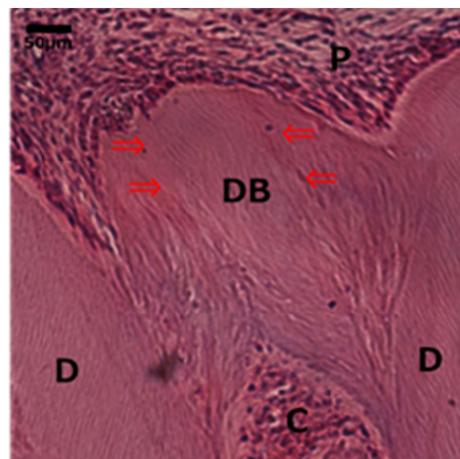
直接覆髄から 4 週間後に H-E 染色を行い、形成された Dentin Bridge を評価した結果を表 1 に示す。MMP1、MMP9、MMP13 および MMP20 により生成された分解 DMCs で直接覆髄をおこなった試料はコントロールと比較して有意に Dentin bridge の形成が認められた ($p<0.05$)。特に MMP20 により生成された分解 DMCs を用いて直接覆髄をおこなった場合、露髄部のほぼ全体を覆い、細管構造を有する第三象牙質の形成が認められ (図 3, 矢印)。一方、MMP1、MMP9 および MMP13 により生成された分解 DMCs を用いた場合は、コントロールと比較すると Dentin bridge の形成は認められるものの露

髄部を完全に覆うことは少なく、細管構造な

表 1 病理組織学的評価の結果

材料	Grade	Dentin bridge 形成			
		0	1	2	3
分解DMCs (MMP1)		1	2	2	1
分解DMCs (MMP2)		5	1	0	0
分解DMCs (MMP3)		5	1	0	0
分解DMCs (MMP8)		5	1	0	0
分解DMCs (MMP9)		2	2	1	1
分解DMCs (MMP13)		2	1	2	1
分解DMCs (MMP20)		0	0	4	2
非分解DMCs		3	2	1	0
control (PBS)		6	0	0	0

(n=6)



どは観察されなかった。また、MMP2、MMP3、MMP8 による分解 DMCs および非分解 DMCs を用いた試料では Dentin bridge の形成はわずかに認められただけであった (表 1)。図 7 . 形成された第三象牙質形成の病理組織学的評価

MMP20 による分解 DMCs を用いて直接覆髄を行うと、他の MMP 分子と比較して露髄部を完全に覆い、かつ象牙細管構造を有する第三象牙質が高い確率で観察された。C=Cavity, DB=Dentin Bridge, P=Pulp, D=Dentin, =細管構造

In vivo の実験系にて、MMP1、MMP9、MMP13 および MMP20 により生成された分解 DMCs は、非分解 DMCs と比較して第三象牙質の形成を有意に促進した。なかでも、MMP20 による分解 DMCs は、他の MMP 分子による分解 DMCs に比べて優れた第三象牙質誘導能を示し、形成された象牙質も細管構造を有していることが確認された。また、*in vitro* において複数の機能促進に関わっている MMP 分子が *in vivo* でも効果を持つ可能性が示唆された。

3 . 象牙質基質タンパクの分解産物の分画への分離

DMCs 分解産物は様々な分子から成る集合体であり、象牙質 - 歯髄複合体の創傷治癒を促進する分子を絞り込むために RP-HPLC を用いて内容物の分離を行った。DMCs only, DMCs/MMP20 の内容物の分離が確認された (図 4)。矢印で示したリテンションタイムにおいて試料間のピークの形が大きく異なり、この部分の溶出物の差の存在が示唆された。各試料の分離後の分画を回収した結果、それぞれ 14 の分画が分取された。

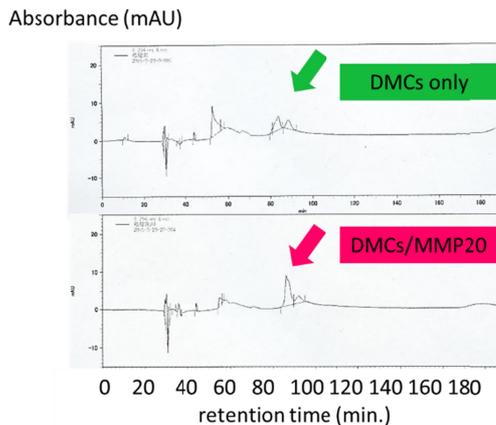


図 4 . RP-HPLC により分離された DMCs および MMP20 による DMCs 分解産物 DMCs と DMCs 分解産物のピークで異なる波形が認められた (矢印)。

4 . HPLC により分離された分画が歯髄細胞機能へ与える影響の評価 (in vitro)

実験 3 において得られた異なるピークの内容物を回収し、それらのピークが歯髄細胞の増殖ならびに石灰化に与える影響について検討したところ、DMCs/MMP20、DMCs only の分画はともにコントロールと比較し有意に細胞増殖、石灰化を促進したが、DMCs/MMP20 と DMCs only の間に有意差は認めなかった。

5 . HPLC により分離された分画の覆髄材としての評価 (in vivo)

RP-HPLC にて分離、採取されたすべての分画を用いて、ラット臼歯に直接覆髄実験を行ったところ、分画 12、13 ならびに分画 12 と 13 を合わせたものを覆髄剤として用いた場合に最も良好な修復象牙質の形成が認められた (図 5)。

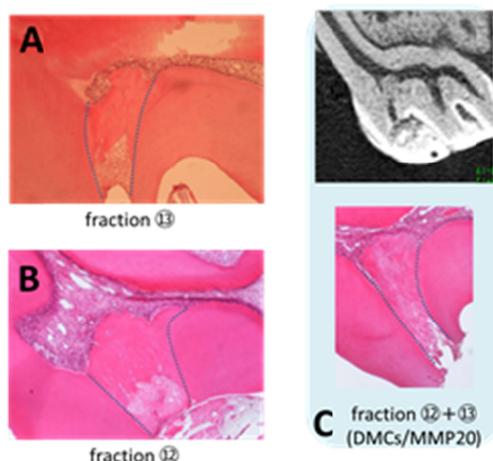
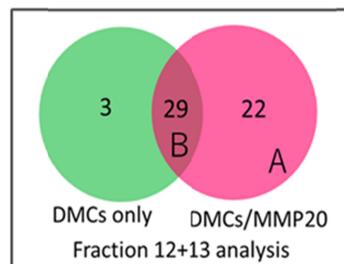
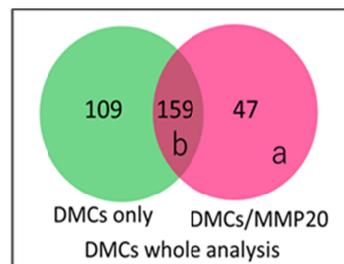


図 5 . DMCs 分解産物より分離された分画を用いた覆髄実験

分画 12 (A) ならび分画 13 (B) 単独によっても良好な修復象牙質の形成が認められたが、分画 12 と 13 を合わせたものを用いて覆髄を行うと最も厚みのある修復象牙質の形成が認められた (C: μ CT ならびに HE 染色)。

6. DMCs 分解産物の同定

DMCs と DMCs/MMP20 に含まれる全体のタンパクの解析結果と、DMCs only と DMCs/MMP20 の分画 12+13 に含まれるタンパクの解析結果を



解析結果を図 6 に示す。この結果と、タンパク比データなどを元に解析を行うことで、8 種のタンパクを同定した。今後、これらのタンパクを用いた覆髄実験を行い、さらなる絞り込みを進めると同時に覆

髄材開発へ向けて研究を展開予定である。

図 10 . LC-MS/MS によるタンパク同定結果 DMCs と DMCs 分解産物全体を同定したものと、生理活性をもつ分画 12+13 のみを同定したものを示す。

以上の結果より、8 分子のタンパクが象牙質 - 歯髄複合体の創傷治癒を促進する分子の候補として得られ、それらの分子が生物学的覆髄剤として使用できる可能性が明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- (1) Yoshioka S, Takahashi Y*, Abe M, Michikami I, Imazato S, Wakisaka S, Hayashi M, Ebisu S, J. Biochem., 査読有, 153 巻, 2013, 43-50. doi: 10.1093/jb/mvs117.
- (2) Ma S, Imazato S, Takahashi Y, Kiba W, Takeda K, Izutani N, Kitagawa H, Chen J, Mechanism of detoxification of the cationic antibacterial monomer 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) by N-acetyl cysteine, Dent Mater., 査読有, 29 巻, 2013, 1219-27. doi:10.1016/j.dental.2013.09.008.
- (3) Sato S, Hashimoto J, Usami Y, Ohyama K, Isogai Y, Hagiwara Y,

Maruyama N, Komori T, Kuroda T, Toyosawa S, Novel sandwich ELISAs for rat DMP1: age-related decrease of circulatory DMP1 levels in male rats, Bone, 査読有, 2013, 57 巻, 429-36. doi: 10.1016/j.bone.2013.09.013.

- (4) Kuremoto K, Noiri Y, Ishimoto T, Yoneda N, Yamamoto R, Maezono H, Nakano T, Hayashi M, Ebisu S, Promotion of endodontic lesions in rats by a novel extraradicular biofilm model using obturation materials, Applied Environmental Microbiology, 査読有, 80 巻, 2014, 3804-10. doi: 10.1128/AEM.00421-14.

〔学会発表〕(計 8 件)

- (1) 高橋雄介. MMP ファミリー分子と象牙質-歯髄複合体の創傷治癒. 「若手研究者が描く Pulp Wound Healing & Regeneration」第 138 回日本歯科保存学会 2013 年度春季学術大会 シンポジウム. 2013 年 6 月 27 日, 福岡県・福岡市
- (2) 岡本基岐, 高橋雄介, 小道俊吾, 林美加子. MMP 分子により分解された象牙質基質タンパクがラット歯髄細胞に与える影響. 第 139 回日本歯科保存学会 2013 年度秋季学術大会. 2013 年 10 月 17 日. 秋田県・秋田市
- (3) 岡本基岐, 高橋雄介, 小道俊吾, 林美加子. MMP 分子で分解を受けた象牙質基質タンパクが歯髄細胞に与える影響. 第 13 回日本再生医療学会総会, 2014 年 3 月 5 日. 京都府・京都市.
- (4) 岡本基岐, 高橋雄介, 小道俊吾, 今里聡, 林美加子. S-PRG フィラー含有試作セメントの覆髄剤としての応用. 第 140 回日本歯科保存学会 2014 年度春季学術大会. 2014 年 6 月 20 日. 滋賀県・大津市.
- (5) Okamoto M, Takahashi Y, Komichi S, Hayashi M. Effect of degraded dentin matrix components on tertiary dentinogenesis 93rd General Session & Exhibirion of the IADR. 2015 年 3 月 11 日. ボストン(米国).
- (6) 岡本基岐, 高橋雄介, 小道俊吾, 林美加子. MMP 分子により分解された象牙質基質が象牙質歯髄複合体の創傷治癒に与える影響. 第 142 回日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会. 2015 年 6 月 25 日. 福岡県・小倉市.
- (7) 岡本基岐, 高橋雄介, 小道俊吾, 林美加子. 生物学的根拠に基づく覆髄剤の開発. 第 15 回日本歯内療法学会西日本支部会研修会(2015 年度). 2015 年 9 月 13 日. 大阪府・大阪市.
- (8) 小道俊吾, 高橋雄介, 岡本基岐, 林美加子. 象牙質-歯髄複合体の創傷治癒を促進する象牙質基質分解産物の同定. 第 143

回日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会. 2015 年 11 月 12 日. 東京都・文京区

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子感染制御学講座(歯科保存学教室)ホームページ <http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~conserve/res.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 雄介(TAKAHASHI YUSUKE)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号: 60397693

(2)研究分担者

豊澤 悟(TOYOSAWA SATORU)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号: 30243249

(3)連携研究者

研究者番号:

(4)研究協力者

岡本 基岐(OKAMOTO MOTOKI)