

令和 元年 6 月 24 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20475

研究課題名(和文) MMPs解析における象牙質・歯髄複合体組織破壊抑制と新規接着システムの開発

研究課題名(英文) Depression of dentin and dental pulp complex tissue destruction in MMPs analysis and development of a new adhesion system

研究代表者

竹内 撰 (TAKEUCHI, Osamu)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70548320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は齲蝕の進行による歯髄組織の炎症抑制と細胞外マトリックス分解酵素(以下MMPs)の接着修復に及ぼす影響について検討したものである。歯の硬組織はエナメル質・象牙質・セメント質から構成される。歯の中心部に存在する歯髄には神経としての役割だけでなく象牙質を修復する機能を有している。歯髄を温存することが歯を長期に渡り保つことに重要な役割を果たす。そこで、歯髄に生じた炎症による組織破壊を抑制することができれば歯の長期保存に有効である。本研究において炎症性サイトカイン刺激によるMMPsの発現は  $\beta$ -catenin経路が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで象牙質・歯髄複合体に存在するMMPsが象牙質破壊に及ぼす影響の解明に焦点をあて研究を行ってきた。歯髄に炎症が生じると炎症性サイトカイン刺激によりMMPsが産生され、組織破壊が進行する。またMMPsは組織破壊だけでなく修復処置された象牙質における接着層を破壊し接着修復における強度を低下させる。本研究で炎症性サイトカイン刺激によるMMPsの産生経路の関与を示す事で歯髄の保存が可能になることだけでなく、接着修復された歯に対し長期に渡り修復物を維持することが可能になる。それにより、再修復、二次う蝕のリスクを低下させることが可能となり歯を長期に渡り維持することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：This study examined influence to give to inflammatory restraint of the pulp tissue due to the progression of caries and adhesion restoration of MMPs. The hard tissue of the tooth is comprised of enamel, dentin, cement. I have a function to restore dentin as well as the role as the nerve to pulp existing in the center of the tooth. I play an important role in it keeping a tooth for a long term to keep pulp. Therefore it is effective for the long-term preservation of the tooth if pulp can control organization destruction due to inflammation that occurred.

As for the expression of MMPs by the inflammatory cytokine stimulation, it was suggested that  $\beta$ -catenin course participated in this study.

研究分野：保存修復

キーワード：ヒト歯髄由来線維芽細胞 MMPs シグナル伝達 コンポジットレジン 象牙質・歯髄複合体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 1) 象牙質・歯髄複合体の生物活性

象牙質は骨とは異なりリモデリングが無く抜髄後もある程度機能することから、生物活性の低い組織であると考えられてきた。しかし現在では、象牙質は外部刺激を受容し二次象牙質を形成することなどから、「象牙質・歯髄複合体」としてとらえることが臨床的にも発生的にも妥当であると考えられている。さらに最近では、象牙質には BMP や TGF- $\beta$  などのサイトカインが含まれており、脱灰(う蝕、酸処理など)により溶出し象牙芽細胞の活性に影響を与えたとの報告がある(1)。また象牙質にはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)が存在するとの報告(2,3)やう蝕進展時にこの MMP が有機マトリクス成分を分解するとの報告もある(4)。この様に、従来主に血中や軟組織での働きが注目されてきた MMP やサイトカインが石灰化した象牙質にも存在し、脱灰により様々な生物活性を示す可能性が示唆されはじめている。

#### 2) う蝕の病態理解の現状

う蝕の病態については、好発部位、進行様式、病原菌と宿主と食事との相互関係さらに再石灰化反応などが明らかとなっており、これらの知識がう蝕治療の基盤となっている。しかしながら、比較的多くプラークが付着しているにもかかわらずう蝕にならない場合や、若年者でみられるような急性う蝕など説明が困難な例外もあり、生活習慣、う蝕病原菌、歯の石灰化度、唾液の作用など多くの因子で説明されているが、病態理解がまだまだ十分であるとは言えない。

#### 3) 接着修復の現状

現代の歯科治療において接着修復は欠かせない手技となっている。水分と有機質が約 30% を占める象牙質は、エッチング後に適用される疎水性のボンディングレジンとの相性が悪く、コラーゲン繊維層へのレジンモノマーの浸透を助けるプライマー処理が必要となる。これらの処理により形成された樹脂含浸層がコンポジットレジンとの強固な接着を可能にする反面、辺縁漏洩の開始点ともなる。最近、セルフエッチングプライマーが象牙質に存在する MMP を活性化すると報告がなされ(5)、MMP による樹脂含浸層の破壊を検討する必要性がある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的はう蝕進展の新規病態モデル(機能的モデル)の確立である。象牙質・歯髄複合体に存在する細胞外マトリクス分解酵素が、象牙質破壊に関与するメカニズムの解明に焦点をあて、象牙質・歯髄複合体を外來刺激および歯科治療に対して従来よりも複雑に反応する生物活性の高い組織であると考えた。

#### 1) 象牙質から溶出するサイトカイン・MMPs の解析

従来から骨には BMP や TGF- $\beta$  が含まれており、破骨細胞による骨吸収などによって溶出して骨芽細胞、あるいは腫瘍などの活性に影響を与えたとの報告がなされている。象牙質にも同様にサイトカインや MMPs が含まれており、これがう蝕やエッチングなどによって溶出し生物活性を示すか否かを明らかにする。

#### (2) 歯髄によるサイトカイン・MMPs の産生とそれに対する歯髄の反応

外來刺激、炎症刺激に対する歯髄の反応性を検討する歯髄充血などの歯髄鎮静により保存可能な症例でも軽度の炎症反応が生じている。申請者の過去の研究でも炎症性サイトカイン刺激により、経時的な MMP 産生の上昇を認めている。歯髄によって産生された MMPs が歯髄の破壊および接着修復の破壊に及ぼす影響を検討する。

#### (3) MMPs がう蝕の進行および接着修復に及ぼす影響

象牙質を構成する有機成分は大部分がコラーゲンである。う蝕の進行には無機成分の脱灰とコラーゲンの分解が必要である。細菌性のコラゲナーゼに加えて宿主由来のコラゲナーゼもう蝕の進行に関与する可能性がある。樹脂含浸層を構成するコラーゲンが MMPs による分解を受けると、二次う蝕や修復物の脱離につながる。象牙質・歯髄複合体由来の MMPs が象牙質破壊と接着修復の成否に及ぼす影響を明らかにする。

#### (4) MMPs 阻害剤が象牙質破壊および接着修復に及ぼす影響

MMPs は腫瘍の進行などに関与することから広く研究されており、現在までに数多くの MMPs 阻害剤が開発されている。MMPs 阻害剤が象牙質に含まれる MMPs を阻害し象牙質破壊を抑制できるか、また接着修復による接着強度を高めることができるかを明らかにする。

そこで以下の研究計画を立案した。

炎症性サイトカインに対する歯髄の反応と、歯髄による MMP の産生  
脱灰象牙質から溶出する MMP の解析  
脱灰象牙質由来 MMP が象牙質破壊に及ぼす影響  
MMP 阻害剤が象牙質破壊および接着修復の成否に及ぼす影響  
う蝕病態の生化学的解釈の進展

### 3. 研究の方法

本研究の目的はう蝕進展の新規病態モデル（機能的モデル）の確立である。象牙質・歯髄複合体に存在する細胞外マトリックス分解酵素が、象牙質破壊に関与するメカニズムの解明に焦点をあて、象牙質・歯髄複合体を外來刺激および歯科治療に対して従来よりも複雑に反応する生物活性の高い組織であると考え、研究計画を立案した。

#### 象牙質から溶出するサイトカイン・MMP の解析

骨には BMP や TGF- $\beta$  が存在し、破骨細胞による骨吸収によって溶出して骨芽細胞、あるいは腫瘍などの活性に影響を与えるとの報告がなされている。象牙質に存在するサイトカインや MMPs がう蝕やエッチングなどによって溶出し、生物活性を示す可能性を検討する。う蝕象牙質、健康象牙質からサイトカインや MMPs を抽出したという報告が増えてきている。しかしながら、抽出方法や測定方法の違いにより測定結果に多少の違いが見られる。本実験ではウエスタンブロッティング、ゼラチンザイモグラフィ、ELISA、免疫染色によりサイトカイン、MMPs の測定をおこなう。う蝕やエッチングで象牙質を溶解する主要な酸である乳酸やリン酸に加えその他の無機・有機酸、キレーターなどを用いたタンパク質の溶出を行う。以下に述べる DQ コラーゲンを用いた実験系も象牙質に含まれる MMPs の推定の一助とする。

#### 歯髄によるサイトカイン・MMP の産生と、それに対する歯髄の反応

外部刺激、炎症刺激に対する歯髄の反応性を検討する。歯髄充血や初期の漿液性歯髄炎など、歯髄鎮静により保存可能な症例でも軽度の炎症反応が生じている。申請者の過去の研究でも炎症刺激により、経時的な MMPs 産生の上昇を認めている。歯髄によって産生された MMPs が歯髄の破壊および接着修復の破壊に及ぼす影響を検討するための基礎的研究を行う。*in vitro* 歯髄細胞培養系にて各種刺激下でのサイトカイン・MMPs の産生の変化をウエスタンブロッティング、ザイモグラフィで検討する。

#### MMP が象牙質破壊および接着修復に及ぼす影響

*In vitro* のう蝕研究モデルとしては、脱灰後の抜去歯に細菌を浸透させた模擬う蝕病変などの実験系が知られている。本研究では、*in vitro* で脱灰象牙質注に含まれる MMP がコラーゲン分解に及ぼす影響を検討するために、本研究に先立って構築した「酸脱灰象牙質と DQ コラーゲンを用いた実験系」を用いる。この実験系では、酵素による切断が起こると蛍光を発する様に標識された細胞外基質である DQ コラーゲンおよび DQ ゼラチン(インビトロジェン社)を脱灰象牙質 MMPs による分解の基質とするもので、脱灰象牙質由来 MMP の活性および基質特異性を定量的に測定することが可能である。本実験系は微弱な酵素活性でも蛍光観察が可能であり、申請者の以前の研究でも一細胞レベルでの蛍光観察が可能であることを確認している。

#### MMP 阻害剤が象牙質破壊および接着修復に及ぼす影響

MMPs 阻害剤は大きく分けて 1)広域スペクトルを持つもの、2)2~3 種類の MMPs を阻害するもの、3)特異性が高く適切な濃度では 1 種類の MMPs を阻害するもの、4)MMPs を阻害しないが pro-MMPs の活性化を阻害するものなどがある。これらの特異性および作用機序の異なる阻害剤を先に挙げた DQ コラーゲンを用いた実験系に適用し、MMPs 阻害剤が象牙質 MMPs による基質分解能に及ぼす影響を検討する。これにより MMPs による象牙質の崩壊にどの MMPs がどの程度関与しているのかを明らかにする。また、MMPs 阻害剤が接着修復に及ぼす影響を検討するために、MMPs 阻害剤を適用した象牙質に対し接着修復をおこない、接着強度を万能試験機を用いた引っ張り試験により評価する。MMPs 阻害剤がレジン重合に及ぼす影響を検討するために、象牙質を用いない系として、エナメル質、リン酸カルシウムディスクも用いて引っ張り試験を行い評価する。

### 4. 研究成果

本研究はう蝕進展による歯髄組織の炎症抑制と MMPs の接着修復に及ぼす影響の解明である。象牙質・歯髄複合体に存在する細胞外マトリックス分解酵素が、象牙質破壊に関与するメカニズムの解明に焦点をあて、象牙質・歯髄複合体が外來刺激に対して従来よりも複雑に反応する

生物活性の高い組織であると考え、研究を行った。

MMPs 阻害剤が象牙質・歯髄複合体破壊及び接着修復に及ぼす影響

歯髄炎組織では IL-1 および TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインが認められる。歯髄炎の進行に伴い MMP-1,2,3 および 14 などのマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が発現することが知られており、MMP-3 は他の MMPs を活性化し、活性化 MMP-1 および MMP-3 は、細胞外マトリックスを分解し歯髄組織破壊や組織再生を惹起する。

この研究において IL-1 および TNF- $\alpha$  刺激したヒト歯髄線維芽細胞において Wnt/ $\beta$ -catenin 伝達経路を阻害する薬剤と活性化する薬剤を用い MMP-1 および MMP-3 の産生への影響について検討した。我々は、ヒト歯髄由来線維芽細胞において MMP-1 および MMP-3 産生は、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路に依存することを明らかにした。これらの結果より、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路調節薬物が歯髄組織再生のための有用性を有し得ることを示唆された。

また DQ ゼラチン、DQ コラーゲンの分解は XAV 刺激により促進していることから MMPs の発現も Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路が関与していることが示唆された。このことによりコンポジットレジン接着面における樹脂含浸層への応用へ有用な結果をえられた。

#### 引用文献

- 1) Sloan AJ, Arch Oral Biol, 1999
- 2) Mazzoni A, J Dent Res, 2007
- 3) Sulkala M, Connect Tissue Res, 2004
- 4) Chaussain-Miller C, J Dent Res, 2006
- 5) Lehmann N, J Dent Res, 2008

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Takeuchi O, Komasa R, Hosoyama R, Yoshikawa K, Goda S, Yamamoto K. Wnt Signal Pathway Regulates MMP-1 and MMP-3 Production in Human Dental Pulp Fibroblast Like Cells. J Oral Tissue Engin 2018;16(2):47-56. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 黄地 智子, 澤井 健司郎, 横田 啓太, 竹内 撰, 中田 朋宏, 三木 秀治, 吉川 一志, 山本 一世. 各種照射器を用いた象牙質接着能の評価. 148 回日本歯科保存学会春季学術大会 2018.6.26 横浜市.
2. 保尾 謙三, 韓 嘯宇, 三浦 樹, 中野 純嗣, 藤原 秀樹, 竹内 撰, 吉川 一志, 山本 一世. 新規亜鉛含有ガラス系知覚過敏抑制材の象牙細管封鎖性について. 第 147 回日本歯科保存学会秋季学術大会.2017.10.26.盛岡市.
3. 竹内 撰, 小正 玲子, 岩佐 一弘, 井村 和希, 藤原 秀樹, 合田 征司, 山本 一世. ヒト歯髄由来線維芽細胞における XAV 刺激による MMPs の産生 第 145 回日本歯科保存学会秋季学術大会 2016.10.28 松本市.
4. 保尾 謙三, 井村 和希, 黄地 智子, 竹内 撰, 岩田 有弘, 吉川 一志, 山本 一世. 知覚過敏症罹患モデル象牙質を用いた知覚過敏抑制材の象牙細管封鎖性について 第 23 回日本歯科医学会総会 2016.10.22 福岡市.
5. 岩田 有弘, 初岡 昌憲, 宮地 秀彦, 竹内 撰, 吉川 一志, 山本 一世. エナメル質形成不全歯に対しコンポジットレジンで対応した症例 第 27 回日本歯科審美学会学術大会 2016.8.27 札幌市.

6. 竹内 摂, 小正 玲子, 大前 正範, 恩田 康平, 吉川 一志, 山本 一世. 前歯欠損部に対して Direct resin bonded bridge を用いた症例 第 27 回日本歯科審美学会学術大会 2016.8.27 札幌市.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。