

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月23日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592419

研究課題名（和文） 修復象牙質形成過程におけるマトリックスメタロプロテアーゼの局在および機能解析

研究課題名（英文） The analysis of function and localization of matrix metalloproteinase in the process of forming tertiary dentin.

研究代表者

伊藤 祥作 (ITO SHOUSAKU)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：90360495

研究成果の概要（和文）：窩洞形成に伴う侵襲は、窩洞直下の象牙芽細胞の石灰化の誘導のみならず、それよりも内側の歯髄に存在する未分化間葉系細胞にも影響を与え、Wnt/ β -catenin 経路を介して *Timp1* の発現を誘導している可能性が明らかとなった。以上の事から、修復象牙質を誘導しうる新規生体覆髄材の開発において、TIMP1 はとても有用な分子であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：TIMP1, which promotes the mineralization of odontoblast and activates undifferentiated mesenchymal cells via Wnt/ β -catenin pathway in the pulp after cavity preparation, might be one of a critical molecule for tertiary dentinogenesis and one of a candidate for a new “biological” pulp capping materials.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：修復象牙質, MMP ファミリー

1. 研究開始当初の背景

これまで、直接覆髄処置には水酸化カルシウム製剤やレジン系材料が使用されてきたが、いずれの材料も生体の治癒に大きな影響を与えるものではなかった。そのため、より積極的な象牙質再生能を備えた覆髄材が求められてきており、一つの候補として、修復象牙質の形成メカニズムに基づく生物学的な作用を発揮する材料の開発に期待が寄せられている。しかし、いまだ修復象牙質を積極的に誘導するような特異的な分子については未知のままである。こういった背景から、

申請者らは修復象牙質形成に関与する遺伝子群の検索をおこなった。ラットに窩洞形成を行った後の歯髄における遺伝子発現についてマイクロアレイを用いての継時的解析を行った。その結果、MMP-13 と TIMP-1 の継続的な発現上昇が認められた。これらの分子は、創傷治癒や血管新生、そして細胞外マトリックスのリモデリングに関与しているとの報告があり、修復象牙質の形成にも関与している可能性は十分に考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題は、生物学的な作用を發揮するような覆髓材の開発を念頭に置いた、修復象牙質の形成メカニズムの一端を基礎的研究により明らかにしていこうとするものである。申請者らはこれまでに *in vivo* において雄性9週 Wistar ラットの臼歯に対して実験的窩洞形成を行い、歯髄における遺伝子発現についてマイクロアレイ法を用いた経時的な解析を行ってきた。その結果、MMPファミリー分子 (MMP-13, TIMP-1) の発現が継続的に上昇していることを見出した。そこで、窩洞形成後の歯髄における MMP-13 と TIMP-1 の遺伝子発現の局在を *in situ hybridization* 法にて明らかにすること、そしてそれら遺伝子の修復象牙質形成時の働きについて解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in situ hybridization* 法による修復象牙質形成過程における MMP ファミリー遺伝子の局在についての解析

① 組織切片の作成

ラットに吸入麻酔装置にての全身麻酔下で、規格窩洞形成器を用いて上顎第一大臼歯近心面に窩洞形成を行う。0, 1, 3, 7, 14 日後に全身麻酔下にて脱血および灌流固定を行った後、被験歯を歯槽骨とともに摘出し、さらに浸漬固定を行う。そして、脱灰後にパラフィン包埋し、マイクロトームにて連続切片を作成する。

② *in situ hybridization*

ラットの MMP-13 と TIMP-1 の全長 DNA をデータベースにて検索し、得られた情報からジゴキシンゲン標識 RNA プローブを作成する。そして、連続切片を脱パラフィン・固定・プロテアーゼ処理・アセチル化処理を行った後、ハイブリダイゼーションを行う。その後、ブロッッキングを行い、アルカリフォスファターゼ標識ジゴキシンゲン抗体と反応させる。基質と反応させて発色させた後、光学顕微鏡にて観察し、MMP-13 と TIMP-1 の局在について経時的に検討する。

(2) TIMP1 が象牙芽細胞様細胞の増殖能、石灰化能に与える影響

マウス象牙芽細胞様細胞株 MDPC-23 を、1-50ng/ml の TIMP1 のリコンビナントタンパクを添加した培地で培養し、WST-1 法にて増殖能を検討した。また、培養14日目に生成された石灰化物に Alizarin red 染色を施し、石灰化物の定量を行った。

(3) 窩洞直下歯髄細胞における β -catenin タンパクの免疫組織化学染色法による局在解

析

① 凍結切片の作成

ラット臼歯に窩洞形成を行い、窩洞形成直後および1, 3日後に脱血および4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定を行う。その後、ギ酸・クエン酸ナトリウム溶液にて脱灰し、OCT compound に包埋し凍結する。この凍結試料を凍結クリオスタットにて厚さ12 μ m の切片を作成する。

② 免疫組織化学染色

上記凍結切片を抗 β -catenin 抗体と反応させた後、2次抗体として Cy3-ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と反応させ発色させる。発色後、蛍光顕微鏡にて観察を行う。

(4) Timp1 転写開始部位上流領域に対して β -catenin タンパクが与える影響の検討

① サブクローニング

1) マウス Timp1 のプロモーター領域 (転写開始部位の上流約 2.8kbp) を SacI 切断配列と XhoI 切断配列をフォワードおよびリバースプライマーに付与して mouse genomic DNA を鋳型として PCR Thermal Cycler により PCR を行い増幅する。

2) 増幅された断片を SacI と XhoI で切断後、ゲル泳動、精製し、ホタルルシフェラーゼレポーターベクター pGL3basic Vector の同制限酵素部位にサブクローニングする。

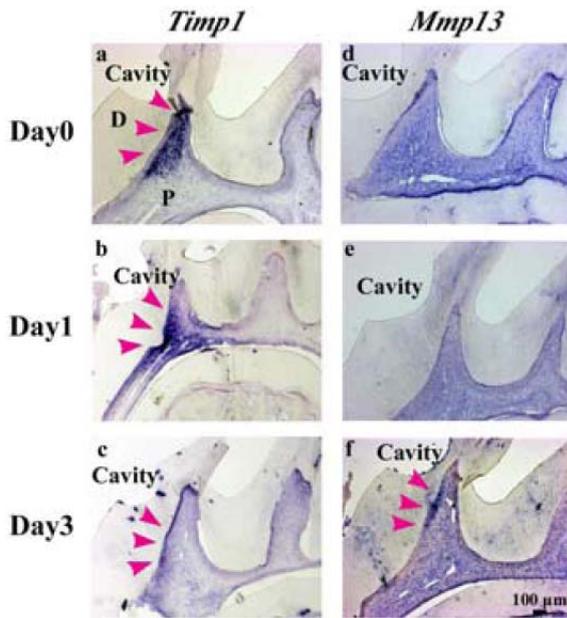
② MDPC-23 への遺伝子導入およびルシフェラーゼアッセイ

1) MDPC-23 を 12 穴細胞培養用プレートに播種した後、上記プラスミドを恒常活性型 β -catenin, β -catenin と結合領域を欠く恒常不活性型 TCF4 とともに Lipofectamine2000 reagent を用いて遺伝子導入を行う。

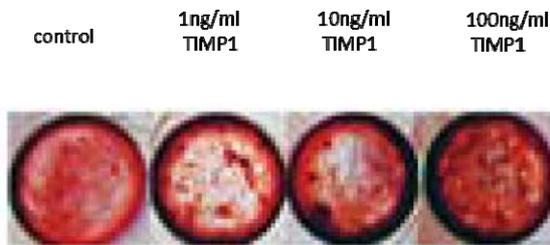
2) 40 時間後に Lysis Buffer にて細胞溶解し、その後 Dual Luciferase Reporter Assay System によって処理し、ルミノメーターを用いて発光量を計測する。

4. 研究成果

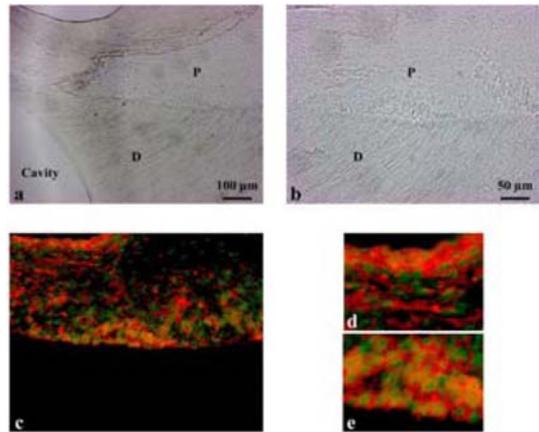
(1) ラット臼歯に窩洞形成を行った後の歯髄における MMP-13 と TIMP-1 の遺伝子発現の局在について *in situ hybridization* 法にて解析した結果、ラット臼歯窩洞直下の歯髄において、窩洞形成後3日目に *Mmp13* の発現認められた。また、窩洞形成直後および1日後、3日後に *Timp1* の発現が確認された。特に *Timp1* は、*Mmp13* と比較して広い領域に継続して発現しており、歯髄の治癒に与える影響がより大きいものと推測された。



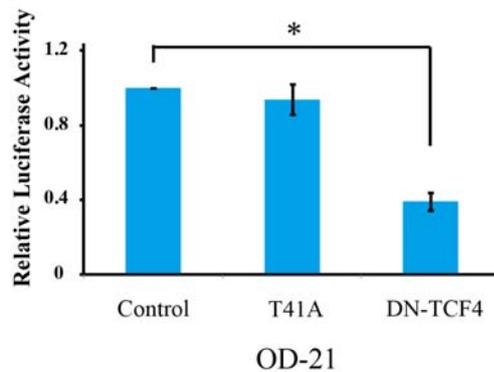
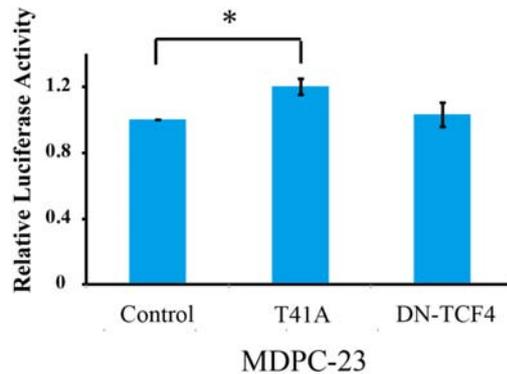
(2) *in vitro*においてマウス象牙芽細胞様細胞株 MDPC-23 を TIMP1 添加条件下で培養したところ、増殖能に関しては添加した TIMP1 の濃度依存的に抑制傾向を示し、石灰化は 50 ng/ml の TIMP1 を添加することで有意に促進された。これらのことから、TIMP1 が修復象牙質の石灰化に関与している可能性が示唆された。



(3) また、これまでに骨芽細胞の分化の際に *Timp1* の転写を Wnt/ β -catenin 経路が制御していること、および骨折時や軟骨組織が機械的な刺激を受けた時に Wnt/ β -catenin 経路が活性化されることが報告されている。そこで、免疫組織化学法により、 β -catenin タンパクの局在について検索したところ、 β -catenin の核内移行(黄色)が窩洞直下歯髓において観察され、窩洞形成の刺激によって Wnt/ β -catenin 経路が活性化されることが示された。



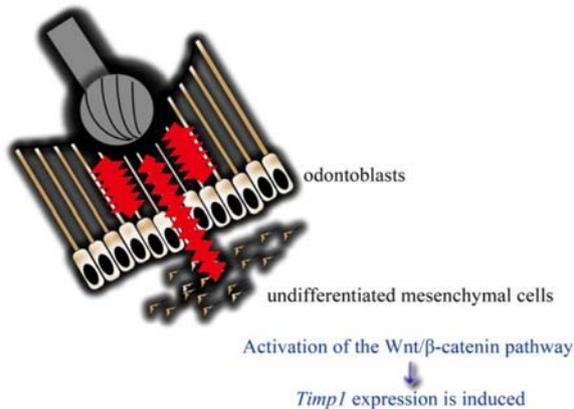
(4) さらに、*Timp1* のプロモーター解析をおこなった結果、 β -catenin と TCF4 の結合領域を欠失させると OD-21 において転写が有意に抑制されることが確認された。すなわち、未分化な細胞は Wnt/ β -catenin 経路の影響を大きく受けることが明らかとなった。



Control : LacZ
 $P < 0.05$ (Student's *t*-test)

以上の研究結果から、窩洞形成に伴う侵襲は、窩洞直下の象牙芽細胞のみならず、それよりも内側の歯髓に存在する未分化間葉系細胞にも影響を与え、Wnt/ β -catenin 経路を介して *Timp1* の発現を誘導することを明らかにした。これらの研究成果により、修復象牙質の形成メカニズムの一端が明らかとなり、

研究目標に対して十分な研究成果が得られたと考えている。



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1件)

① Ikumi Michikami, Toshiya Fukushi, Mariko Tanaka, Hiroshi Egusa, Yoshinobu Maeda, Takashi Ooshima, Satoshi Wakisaka, Makoto Abe: Krüppel-like factor 4 regulates membranous and endochondral ossification, EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, 2012, 査読有
318:311-325, doi:10.1016/j.yexcr.2011.12.013

[学会発表] (計6件)

① 伊藤祥作、松下健太、池田峻、山本由美子、恵比須繁之：新規幹細胞集団における硬組織再生能の評価
第134回 日本歯科保存学会 秋季学術大会
平成23年10月20日 大阪

② 吉岡靖介、高橋雄介、今里聡、恵比須繁之：修復象牙質形成過程における *Tissue inhibitor of metalloprotease 1* の発現誘導
第134回日本歯科保存学会春季学術大会
平成23年6月9日 東京

③ 松下健太、伊藤祥作、池田峻、恵比須繁之：骨髄ストローマ細胞の骨芽細胞分化における LIF の機能解析
第134回 日本歯科保存学会 春季学術大会
平成23年6月9日 東京

④ H. Nasa, S. Itoh, S. Imazato, S. Ebisu: Effects of Calcium Hydroxide on Osteoblast Differentiation and Mineralization
第58回 Japanese Association for Dental Research
平成22年11月21日 福岡

⑤ 高橋雄介、吉岡靖介、今里聡、恵比須繁之：象牙質基質タンパク質分解産物が歯髄細胞に与える影響
第133回 日本歯科保存学会 秋季学術大会
平成22年10月29日 岐阜

⑥ 伊藤祥作、松下健太、恵比須繁之：高度骨再生能を有する新規細胞集団精製法についての報告
第28回 日本骨代謝学会学術集会
平成22年7月23日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤祥作 (ITO SHOUSAKU)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：90360495

(2) 研究分担者

藪根敏晃 (YABUNE TOSHIAKI)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：90423144

(3) 研究分担者

阿部真士 (ABE MAKOTO)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：40448105

(4) 研究分担者

高橋雄介 (TAKAHASI YUSUKE)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：60397693

(H22.4.1～研究分担者として参画)