

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792170

研究課題名（和文）象牙質基質タンパク分解産物が象牙質－歯髄複合体の治癒に与える影響

研究課題名（英文） Effects of degraded dentin matrix proteins on the repair process of dentin-pulp complex

研究代表者

高橋 雄介（TAKAHASHI YUSUKE）

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：60397693

研究成果の概要（和文）：

象牙質－歯髄複合体の創傷治癒メカニズムを解明することを目的とし、象牙質中に含まれる基質タンパク（DMPs）がう蝕細菌が産生する酸や内因性プロテアーゼによって分解され、その分解産物が歯髄由来細胞に与える影響についての評価を行った。その結果、酸や象牙質に存在する MMP 分子により DMPs は分解され、その分解産物によって歯髄細胞の増殖、分化が促進されることが明らかとなり、DMPs 分解産物が象牙質－歯髄複合体の治癒に影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The objective of this study was to elucidate the wound healing mechanism of dentin-pulp complex. We investigated the effects of degraded dentin matrix proteins (DMPs) induced by acids or proteinases on the function of pulp cells. External acid or internal MMP molecules were found to degrade DMPs and pulp cells were promoted their proliferation or differentiation by degraded DMPs. These results indicated that degraded DMPs potentially affected the healing process of dentin-pulp complex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：歯髄、象牙質、修復象牙質、第三象牙質、象牙質－歯髄複合体、MMP

1. 研究開始当初の背景

象牙質の組成は、約 70%の無機質と 20%の有機質、10%の水であり、無機質は主にハイドロキシアパタイトから成り、有機質は I 型コラーゲン、糖タンパク、プロテオグリカンなどを含んでいる。特に、有機質中の象牙質基質タンパク中には、象牙質の石灰化に関わる Dentin Matrix Protein 1 (DMP1)や Dentin Sialo Phosphoprotein (DSPP)などに代表される SIBLING ファミリー分子や成長因子、Matrix Metalloprotease (MMP)ファミリー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 *et al.* J Biol

Chem 268:12624-30, 1993, Toledano *et al.* J Dent 38:635-40, 2010)。象牙質がう蝕に罹患すると、細菌が産生する酸によって無機質が脱灰される。それと同時に、象牙質の有機質も細菌由来の酸やプロテアーゼ、また象牙質中に含まれる MMP などのプロテアーゼなどによって侵襲を受けると考えられる。

一方、心臓や腎臓、皮膚などの組織において、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分解を受けると、その分解産物が組織における細胞増殖や血管新生を促進し、組織の創傷治癒に対して

影響を与えることが報告されている(Reing *et al.* *Tissue Eng* 15:605-14, 2009, Brennan *et al.* *J Tissue Eng Regen Med* 2:491-8, 2008)。また、象牙質も上記の臓器と同様に細胞外基質タンパクを有し、さらに、う蝕罹患時には、その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く、他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認められず、う蝕などの非生理的刺激により誘導される修復象牙質の形成メカニズムについてもいまだに不明なままである。

そういった状況をふまえ、われわれはこれまでに修復象牙質形成に関与する遺伝子の検索を行い、MMP ファミリー分子、特に MMP3、MMP13、Tissue Inhibitor of Matrix Metalloprotease 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た。さらに MMP ファミリー分子が修復象牙質形成に与える影響について研究を行ってきた。

その結果、われわれは歯髄における MMP 分子の発現や局在、ならびにその機能の一端を明らかにしてきた(Yoshioka, Takahashi *et al.* 87th IADR, 2008, Takahashi *et al.* IADR Pulp Biology and Regeneration Group Symposium, 2010)。MMP 分子は歯髄だけではなく象牙質の基質タンパク中にも存在することに着目し、う蝕を想定した環境下においては、細菌性の侵襲(酸およびプロテアーゼなど)とともに、内因性の MMP 分子が象牙質基質タンパクを分解、断片化させることによって、より活性をもった分子として機能し、象牙質-歯髄複合体の治癒を促進する可能性があると考え、本研究の着想を得た。

2. 研究の目的

う蝕関連細菌由来の酸やプロテアーゼ、さらに象牙質の細胞外基質に存在する MMP 分子をはじめとするプロテアーゼによって、象牙質基質タンパクがどのように分解されるかを評価し、さらに、分解を受けることで活性が向上したと考えられるタンパクが、象牙質-歯髄複合体の治癒を促進するかどうかについて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ヒト象牙質からの象牙質基質タンパク(DMPs)分離

ヒト抜去歯から象牙質粉末を調製し、プロテアーゼ阻害剤を含む 10% EDTA 溶液 (pH=7.2) 中で、4°Cにて 14 日間処理した。処理した上清を回収し、純水に対して透析を

行い(4°C、7 日間)、凍結乾燥を行って DMPs を分離した。

(2)DMPs 分解産物の作成

①酸による DMPs 分解産物の作成

前項で作成した DMPs を、0.1M 酢酸水溶液 (pH=3.0) もしくは 0.1M 乳酸水溶液 (pH=3.0)中に 1mg/mL の濃度で混和し、37°Cにて 48 時間静置したものを酸による DMPs 分解産物とした。

②MMP 分子による DMPs 分解産物の作成

DMPs を 1mg/mL の濃度に調整し、そこに 1 μ g のヒト組換え MMP1、MMP2 もしくは MMP3 を加えて、37°Cで 24 時間静置したものを MMP による DMPs 分解産物とした。

(3)DMPs 分解産物のプロファイル評価

前項で得られた DMPs 分解産物を SDS-PAGE にてタンパクを電気泳動し、銀染色にて可視化を行い、DMPs の分解について評価を行った。

(4)DMPs 分解産物が歯髄細胞に与える影響の検討

①細胞増殖能評価

象牙芽細胞様細胞またはラット歯髄由来初代培養細胞を用いて、酸により作成された DMPs 分解産物もしくは MMP 分子により作成された DMPs 分解産物を 0.01~1.0 μ g/mL の濃度で添加して培養を行い、細胞増殖能について WST-1 法にて検討を行った。

②細胞石灰化能評価

上記と同様の細胞を用いて、酸もしくは MMP 分子により作成された DMPs 分解産物を 0.01~1.0 μ g/mL の濃度で添加し、50 μ g/mL アスコルビン酸と 10mM 8-グリセロリン酸を培地に添加した分化誘導培地を用いて培養を行い、分化の指標である Alkaline Phosphatase (ALP) 活性を測定もしくは形成された石灰化物にアリザリンレッド染色を行い、石灰化物の定量を行った。

③細胞遊走能評価

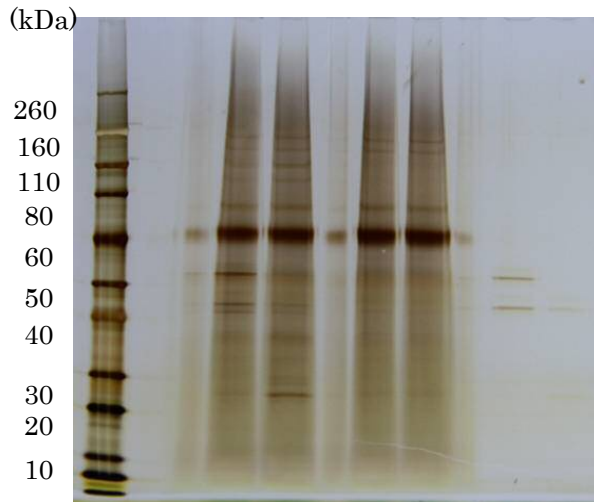
マウス歯髄由来未分化間葉系細胞を用いて、DMPs 分解産物を 0.01~1.0 μ g/mL 存在下において、agarose spot assay にて細胞の遊走能について評価を行った。

4. 研究成果

(1)SDS-PAGE (図 1)

MMP1 による DMPs 分解産物のプロファイルを図 1 に示す (①1 時間分解 DMPs②24 時間分解 DMPs③非分解 DMPs(1 時間 PBS に浸漬)④非分解 DMPs(24 時間 PBS に浸漬)⑤MMP1(活性化後 1 時間静置)⑥MMP1 (活性化後 24 時間静置)。MMP1 により 1 時間分解されたものに比べて 24 時間分解された DMPs の方がより低分子のタンパクもしくはペプチドに変化していることが明らかとなった。この結果は他の MMP 分子を用いても同様の傾向が得られたため、以降の実験では 24 時間分解された DMPs を用いた。なお、

酸により作成した DMPs 分解産物は SDS-PAGE においては非分解 DMPs と比較して変化は認められなかった。



① ② ③ ④ ⑤ ⑥
図 1. MMP1 により分解された DMPs のタンパクプロファイル

(2)DMPs 分解産物が歯髄細胞に与える影響

①細胞増殖能評価

乳酸、酢酸により分解された DMPs が象牙芽細胞様細胞の増殖に与える影響を検討したところ、培養開始後 3, 4, 5 日目においては DMPs 非添加の場合と比較して有意差は認められなかった (図 2)。

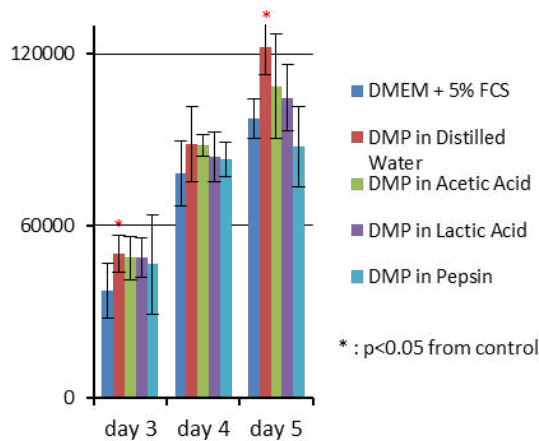


図 2. 酸により分解された DMPs が象牙芽細胞様細胞の増殖に与える影響

一方、MMP1 および 2 によって作成された DMPs 分解産物は象牙芽細胞様細胞の増殖を有意に促進することが明らかとなった (図 3)。

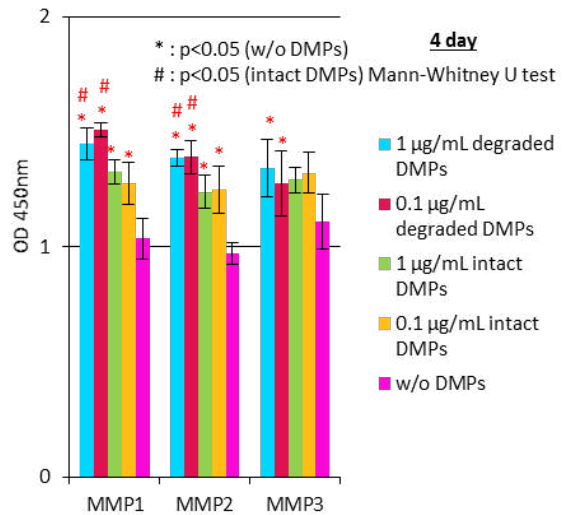


図 3. MMP1、2 および 3 により分解された DMPs が象牙芽細胞様細胞の増殖に与える影響

②細胞石灰化能評価

乳酸、酢酸により分解された DMPs が象牙芽細胞様細胞の石灰化に与える影響について検討したところ、蒸留水に溶解した DMPs および、酢酸、乳酸により作成した DMPs 分解産物すべてが、DMPs 未添加より高い石灰化能を示した。

一方で、酢酸もしくは乳酸で処理した DMPs 分解産物は、蒸留水に溶かした DMPs に比べて有意に高い石灰化能を示した(図 4)。

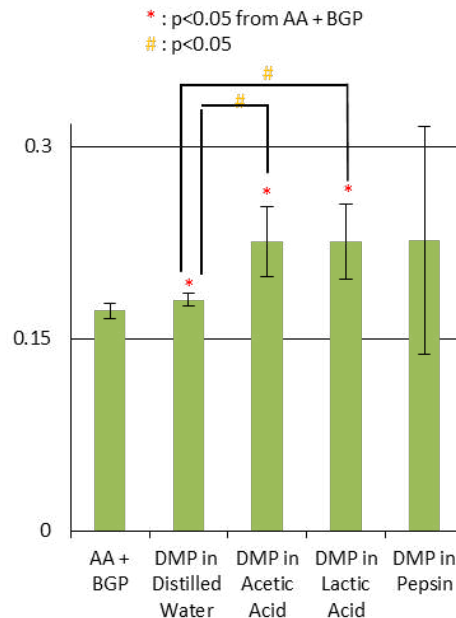


図 4. 酸により分解された DMPs が象牙芽細胞様細胞の石灰化に与える影響

一方、MMP1、2 および 3 によって作成された DMPs 分解産物はラット歯髄初代培養細胞の ALP 活性を有意に促進することが判明

した (図 5)。

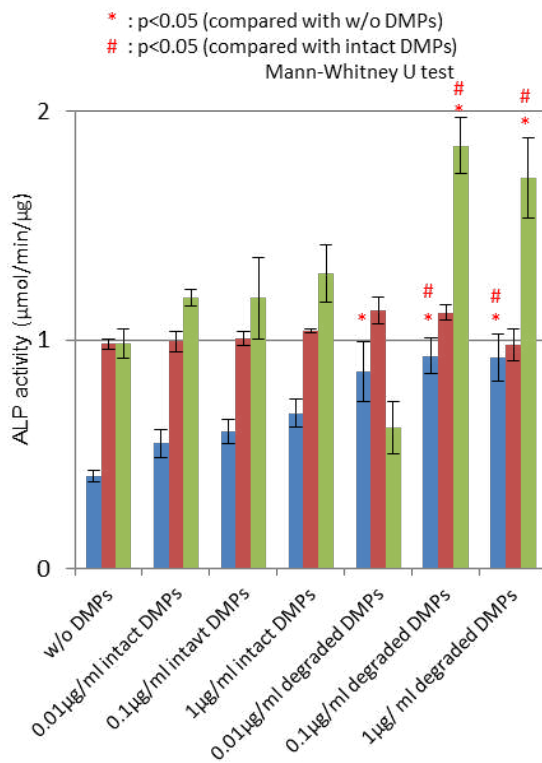


図 5. MMP1 により分解された DMPs がラット歯髄初代培養細胞の分化に与える影響

③細胞遊走能評価

酸により分解された DMPs がマウス歯髄由来未分化間葉系細胞の遊走能に与える影響について検討したところ、酢酸もしくは乳酸で分解された DMPs を含むアガローススポットには、蒸留水に溶解した DMPs に比べて有意に侵入している細胞数が多く、分解された DMPs によって、未分化間葉系細胞の遊走能が向上することが明らかとなった (図 6)。

以上の結果より、酸やプロテアーゼによって分解を受けた象牙質基質タンパク存在下において、歯髄由来細胞の増殖能や分化、石灰化能、また遊走能が促進されることが明らかとなった。

すなわち、う蝕病巣において細菌から産生される酸や脱灰された象牙質に内因性に存在する MMP 分子によって生成される DMPs 分解産物が歯髄に対して刺激を与え、その結果、歯髄内部の細胞が創傷部位である歯髄辺縁に遊走し、さらに、象牙芽細胞の石灰化が促進され、象牙質-歯髄複合体の治癒促進に働いている可能性が示唆された。

今後は、さらに他の MMP 分子を用いた研究を推進するとともに、MMP 分子によって分解された DMPs の具体的にどのようなタンパクもしくはペプチドが歯髄の治癒を促

進しているかを検索し、最終的には歯髄の治癒機転に基づく覆髄材の開発につなげたいと考えている。

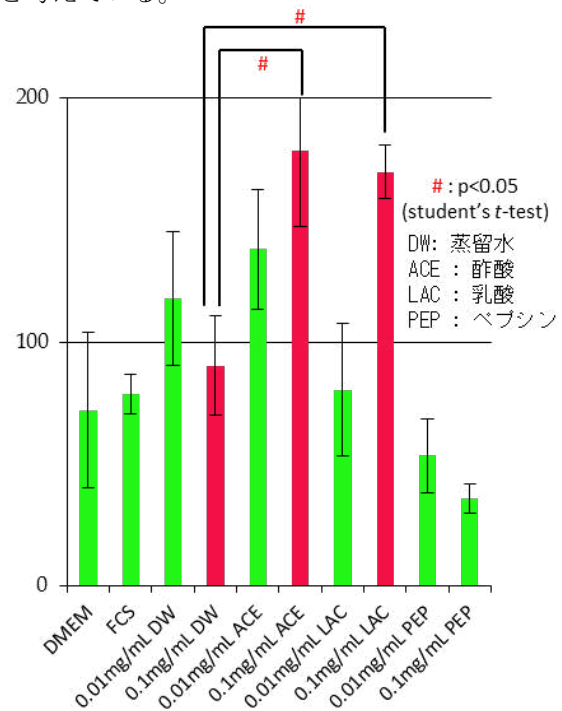


図 6. 酸により分解された DMPs が未分化間葉系細胞の遊走能に与える影響

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 3 件)

- (1) Izutani N, Imazato S, Nakajo K, Takahashi N, Takahashi Y, Ebisu S, Russell RR, Effects of the antibacterial monomer 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) on bacterial viability and metabolism, *European Journal of Oral Science*, 査読有, 119巻, 2011, 175-181.
DOI: 10.1111/j.1600-0722.2011.00817.x
- (2) Yoshioka S, Takahashi Y, Abe M, Michikami I, Imazato S, Wakisaka S, Hayashi M, Ebisu S, Activation of the Wnt/b-catenin pathway and tissue inhibitor of metalloprotease 1 during tertiary dentinogenesis, *Journal of Biochemistry*, 査読有, 153巻, 2013, 43-50.
DOI: 10.1093/jb/mvs117
- (3) 高橋雄介, 吉岡靖介, 朝日陽子, 永山智崇, 野村由一郎, 林 美加子, う蝕象牙質除去後の残存細菌にEr: YAGレーザーが与える影響, *日本歯科保存学雑誌*, 査

読有, 第56巻, 2013, 1-8.

[学会発表] (計 6 件)

- (1) Takahashi Y, Okamoto M, Yoshioka S, Hayashi M, Effects of degraded dentin matrix proteins on pulp cells' function, IADR Pulp Biology and Regeneration Group Symposium 2013 (2013 年 3 月 26 日、サンフランシスコ、米国)
- (2) Okamoto M, Takahashi Y, Yoshioka S, Hayashi M, Effect of degraded dentin matrix proteins on pulp cell function, 91st General Session & Exhibirion of the IADR (2013 年 3 月 23 日、シアトル、米国)
- (3) Takahashi Y, Okamoto M, Yoshioka S, Hayashi M, Effect of Degraded Dentin Matrix Proteins induced by Matrix Metalloproteinase Molecules on Pulp Cells Function, 日本歯科保存学会 2012 年度秋季学術大会 (第 137 回) (2012 年 11 月 22 日、広島市)
- (4) Takahashi Y, Analysis of pulpal gene expression during tertiary Takahashi Y dentin formation, Japan-Korea Joint Symposium“Development and Regeneration of Oro-Facial Structures” (招待講演) (2012 年 07 月 13 日、吹田市)
- (5) Takahashi Y, Analysis of pulpal gene expression for designing pulp capping materials, Start-up symposium for innovative materials research “A Roadmap for the Future of Oral Biomaterials” (招待講演) (2011 年 7 月 3 日、吹田市)
- (6) 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、日本歯科保存学会 2011 年度春季学術大会 (第 134 回) (2011 年 6 月 9 日、浦安市)

[図書] (計 1 件)

- (1) Yusuke Takahashi, Anthony J. Smith, Paul R. Cooper, Nova Science Publishers, Advances in Medicine and Biology, 2011, 335.

[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://www.dent.osaka-u.ac.jp/english/g_school/facilities/endodontology.html

(1)研究代表者

高橋 雄介 (TAKAHASHI YUSUKE)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号 : 60397693