



Title	歯髄創傷治癒を促進する機能ペプチドの抗炎症作用の評価
Author(s)	中谷, 公貴
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105342
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (中 谷 公 貴)

論文題名 歯髄創傷治癒を促進する機能ペプチドの抗炎症作用の評価

【緒言】

不可逆性歯髄炎は、これまで歯髄保存療法の適応外だと考えられてきた。不可逆性歯髄炎に対して、炎症制御と組織修復を促して歯髄保存療法が実施できるようになれば、根管治療数を大幅に減少させることが可能となり、歯の寿命延伸にも大きく貢献できる。われわれは、これまでに歯髄創傷治癒促進作用を持つ Protein S100A8 由来機能ペプチドの同定に成功し、抗炎症作用を有する可能性について報告した。本研究では、同ペプチドの抗炎症作用の詳細について *in vivo* と *in vitro* にて検討し、不可逆性歯髄炎治療の可能性を探索することを目的とした。

【材料・方法】

実験 1：う蝕由来可逆性・不可逆性歯髄炎ラットモデルに対する実験ペプチドの抗炎症作用の評価

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 R-01-017-1）。14 日齢の Sprague-Dawley ラット口腔内に *Streptococcus mutans* MT8148R 菌液を接種後、高スクロース含有飼料を不断給餌し、う蝕および継発する歯髄炎を惹起した。マイクロ CT にて、う蝕様透過像が象牙質厚さの 1/3 ～ 2/3 まで進行を認める場合は可逆性歯髄炎を、2/3 を超える場合は不可逆性歯髄炎を発症することがこれまでの研究で確認されている。可逆性および不可逆性歯髄炎を発症したラット歯に対してう蝕除去後、意図的に露髄させ、Protein S100A8 由来機能ペプチド（実験ペプチド；KLLETECPQ）（100 μg / mL）を含浸させたゼラチンスポンジを用いて直接覆髄をおこない、ProRoot MTA（Dentsply Sirona）（MTA）で被覆後、コンポジットレジン修復をおこなった。コントロールとして PBS を含浸させたゼラチンスポンジを用いた。直接覆髄後 4 週において、マイクロ CT を用いて硬組織形成を評価し、歯髄の炎症状態を評価するため、同試料に H-E 染色および炎症性細胞マーカーである CD43 に対する免疫組織化学染色をおこなった（ $n=6$ ）。また、不可逆性歯髄炎ラットを対象に同上の方法にて直接覆髄後、1 日および 3 日において汎用マクロファージマーカー（CD68）および M2 マクロファージマーカー（Arg-1）に対する免疫蛍光染色をおこない、マクロファージの分化について評価した（ $n=6$ ）。統計学的有意差は、硬組織形成評価は Kruskal-Wallis 検定を用いて評価し、CD43 免疫組織化学染色による炎症状態およびマクロファージの分化は Student's *t* 検定を用いて評価した（ $\alpha=0.05$ ）。

実験 2：ヒト歯髄細胞を用いた実験ペプチドの抗炎症作用の評価

ヒト歯髄幹細胞（hDPSCs, Lonza）に対して、大腸菌由来リポ多糖（LPS, *Escherichia coli* O111:B4, Sigma-Aldrich）刺激により炎症を惹起した。3 時間培養後に、LPS 処理群および未処理群に対して、実験ペプチド（100 μg / mL）を添加し、12 時間培養後にトータル RNA を回収した。続いて、炎症性サイトカイン（IL-6, IL-8, IL-1 β ）および抗炎症性サイトカイン（IL-4, IL-10）の mRNA 発現量を定量ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）により評価した（ $n=3$ ）。コントロールとして、同条件下で実験ペプチドを添加しないものを使用した。統計学的有意差は One way ANOVA および Tukey 検定を用いて評価した（ $\alpha=0.05$ ）。

実験 3：マクロファージを用いた実験ペプチドの抗炎症作用および分化に与える影響の評価

8 週齢 C57BL/6J マウスの大腿骨および腓骨より骨髓を採取し、ACK Lysing buffer（Thermo Fisher Scientific）を用いて赤血球成分を取り除き、骨髓細胞を単離した。得られた骨髓細胞を 24 時間培養後、浮遊細胞のみを回収し、20 ng / μL M-CSF（AF-315-02, Thermo Fisher Scientific）を作用させ、6 日間培養し、得られた細胞をマウス骨髓由来マクロファージ（BMDM）として実験に使用した。BMDM に対して LPS 刺激により炎症を惹起し、6 時間培養後に実験ペプチド（1, 10, 100 μg / mL）を添加し、1 時間培養後にトータル RNA を回収した。炎症性サイトカイン（IL-1 β ）、抗炎症性サイ

トカイン (IL-10), さらに M1 マクロファージマーカー (CD86, NOS2), M2 マクロファージマーカー (Arg-1) の mRNA 発現量を qPCR により評価した (n=3). コントロールとして, LPS 処理群および未処理群に対して実験ペプチドを添加しないものを使用した. 統計学的有意差は One way ANOVA および Tukey 検定を用いて評価した ($\alpha=0.05$).

実験 4: 不可逆性歯髄炎ラットモデルに対する実験ペプチド含有 MTA を用いた直接覆髄実験

将来的な臨床応用を見据え, 不可逆性歯髄炎ラットに対して, 実験ペプチド (100 $\mu\text{g/mL}$) 含有 PBS を MTA と練和したものをを用いて, 実験 1 と同様の方法にて直接覆髄をおこなった. コントロールとして MTA を PBS で練和したものをを用いた. 直接覆髄後 4 週においてマイクロ CT を用いて硬組織形成を評価し, H-E 染色および CD43 に対する免疫組織化学染色にて炎症状態を評価した (n=6). 統計学的有意差は, 硬組織形成評価は Kruskal-Wallis 検定を用いて評価し, CD43 免疫組織化学染色による炎症状態の評価は Student's *t* 検定を用いて評価した ($\alpha=0.05$).

【結果】

実験 1: 可逆性歯髄炎への直接覆髄後 4 週において, マイクロ CT による硬組織評価では, 実験ペプチド群, コントロールともに露髄部を被覆する硬組織形成を認め, 形成量に有意差は認めなかった. H-E 染色では両群ともに均一な硬組織形成を認め, 歯髄組織に炎症反応を認めず, CD43 陽性細胞数も両群間に有意差は認めなかった. 不可逆性歯髄炎では, 直接覆髄後 4 週のマイクロ CT による硬組織形成評価では, 実験ペプチド群とコントロールの間に有意差は認められなかったが, H-E 染色においてコントロールでは硬組織の内部が疎な構造を示し, さらに第三象牙質直下に炎症性細胞浸潤が観察された. これに対して, 実験ペプチド群では第三象牙質は硬組織内部に欠損を認めない均一な構造を呈し, 第三象牙質直下に炎症性細胞浸潤を認めなかった. また, 実験ペプチド群において CD43 陽性細胞数がコントロールより有意に少なかった ($p < 0.05$). 免疫蛍光染色では, 実験ペプチド群ではコントロールと比較して直接覆髄後 1 および 3 日において M2 マクロファージ数が有意に増加した (1 日後: $p < 0.01$, 3 日後: $p < 0.001$).

実験 2: hDPSCs を用いた qPCR での mRNA 発現評価において, 炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8, IL-1 β) は, 実験ペプチド添加による影響を認めなかった. 一方, 抗炎症性サイトカイン (IL-4, IL-10) は, 実験ペプチド添加によって有意に発現が上昇した ($p < 0.05$).

実験 3: BMDM を用いた qPCR での mRNA 発現評価において, 炎症性サイトカイン (IL-1 β) の発現は, 実験ペプチド 10 $\mu\text{g/mL}$ 以上の作用群において, コントロールと比較して有意に低下した ($p < 0.05$). 抗炎症性サイトカイン (IL-10) の発現は, 実験ペプチド 10 $\mu\text{g/mL}$ 以上の作用群において有意に上昇した ($p < 0.05$). M1 マクロファージマーカーである CD86 の発現は, 全ての濃度の実験ペプチド作用群において有意に低下した ($p < 0.05$). 同じく M1 マクロファージマーカーである NOS2 の発現は, 100 $\mu\text{g/mL}$ の実験ペプチド作用群において有意に低下した ($p < 0.05$). M2 マクロファージマーカー (Arg-1) の発現は, 1, 100 $\mu\text{g/mL}$ の実験ペプチド作用群において有意に上昇した ($p < 0.05$).

実験 4: 不可逆性歯髄炎試料に実験ペプチド含有 MTA を用いた直接覆髄をおこなったところ, 直接覆髄後 4 週のマイクロ CT による硬組織形成評価では, 実験ペプチド含有 MTA 群とコントロールの間に有意差は認められなかったが, H-E 染色においてコントロールでは硬組織の内部が疎な構造を示し, さらに第三象牙質直下に炎症性細胞浸潤が観察された. 実験ペプチド含有 MTA 群では第三象牙質は硬組織内部に欠損を認めない均一な構造を示し, 第三象牙質直下に炎症性細胞浸潤を認めなかった. また, CD43 免疫組織化学染色では, 実験ペプチド含有 MTA 群において CD43 陽性細胞数が有意に少なかった ($p < 0.001$).

【考察および結論】

実験ペプチドは歯髄炎において, マクロファージの M2 サブタイプ分化を促進することで炎症歯髄における炎症の消退および組織修復を誘導し, 歯髄を健全な状態へ回復させるとともに, 欠損を認めない均一な構造の第三象牙質形成を促進し, さらに炎症性細胞の発現を抑制することで, 不可逆性歯髄炎の治癒につながる可能性が示された.

S100A8 由来機能ペプチド (KLLETECPQ) は歯髄炎に対して抗炎症作用を発揮し, 不可逆性歯髄炎を回復させる効能を持つことが示唆された.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (中 谷 公 貴)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 林 美加子
	副 査	教授 竹立 匡秀
	副 査	准教授 大川 玲奈
	副 査	准教授 広瀬 雄二郎
論文審査の結果の要旨 本研究は、Protein S100A8 由来機能ペプチドの抗炎症作用を <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> にて検討をおこない、本ペプチドが不可逆性歯髄炎に対して、マクロファージの M2 サブタイプ分化を促進するとともに、CD43 陽性炎症細胞の集積を減少させることで、抗炎症作用を発揮することを示した。 このように、不可逆性歯髄炎を制御する機能ペプチドの創傷治癒メカニズムの一端を明らかにしたことは、新たな歯髄保存療法の開発の可能性を示すものである。よって、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。		