The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	マトリックスメタロプロテアーゼ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
Author(s)	岡本, 基岐
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52335
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学　位　論　文

マトリックスメタロプロテアーゼ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

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻

口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）

（指導教官：林 美加子教授）

岡本 基岐

本論文の要旨の一部は 91st General Session & Exhibition of the IADR (2013 年 3 月，シアトル，米国)、日本歯科保存学会 2013 年度秋季学術大会（138 回) (2013 年 10 月，秋田)において発表した。

目次

I. 緒言

-

II. MMP 分子により分解された象牙質基質がラット歯髄初代培養細胞に与える影響の *in vitro* での検討

1) 目的

2) 材料および方法

① 象牙質基質の精製と MMP 分子による分解

② 分解象牙質基質タンパクプロファイルの観察 (SDS-PAGE)

③ 血管新生能の評価

④ ラット歯髄初代培養細胞の調整と培養

⑤ 細胞遊走能の評価

⑥ 細胞走化性の評価

⑦ 細胞増殖能の評価

⑧ Alkaline Phosphatase (ALP) 活性の評価

⑨ 石灰化能の評価

⑩ 統計学的解析

3) 結果

① 分解象牙質基質タンパクプロファイルの観察 (SDS-PAGE)

② 血管新生能の評価

③ 細胞遊走能の評価

④ 細胞走化性の評価

⑤ 細胞増殖能の評価

⑥ ALP 活性の評価

⑦ 石灰化能の評価

4) 小括

III. MMP 分子により分解された象牙質基質がラット象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に与える影響の *in vivo* での検討

1) 目的

2) 材料および方法

① 分解象牙質基質により誘導された第三象牙質の病理組織学的評価

② 統計学的解析

3) 結果

① 分解象牙質基質によって誘導された第三象牙質の病理組織学的評価

② 統計学的解析

4) 小括

IV.考察

V. 結論

VI. 謝辞

VII. 参考文献

VIII. 図表

I. 緒言

現在の歯科臨床で、う蝕除去後や窩洞形成時に露髄が認められた際に、直接覆髄剤 (材) として水酸化カルシウム製剤や Mineral Trioxide Aggregate (MTA) などのケイ酸カルシウム系セメントなどが用いられている [1)]。しかし、上記の材料を使用した場合でも歯髄を保存できる可能性は決して高いものではなく、成功率について Bjørndal らは 30%～40% [2)]、Aguilar ら [3)]、Mente ら [4)] は 60%～70% 程度と報告をしている。覆髄の臨床成績をさらに向上させ、歯髄の保存をより確実なものとするため、既存の覆髄剤の機械的、化学的性質の向上や操作性の改善などの性能の向上を目指す研究 [5-7)]や、成長因子やエナメル関連タンパク、象牙質シアロタンパクなどを覆髄剤に含有させて応用する試みなどがこれまでにおこなわれている [7-11)]。

一方、歯の発生過程において上皮組織と間葉組織と相互作用の結果、分化誘導される象牙芽細胞によって形成される原生象牙質の形成メカニズムに関する報告は比較的多く認められる [12-15)]ものの、歯の成熟後、後天的にう蝕や外傷などの結果、上皮間葉相互作用を伴わず間葉組織のみから分化誘導される象牙芽細胞様細胞によって形成される第三象牙質に関する報告はあまりなく [16, 17)]、第三象牙質の詳細な形成メカニズムは現在も明らかとなっていない。したがって、

現在用いられている覆髄剤は象牙質-歯髄複合体の創傷治癒機転に基づくものではなく、成長因子などを含む覆髄剤も第三象牙質の形成メカニズムが明らかとなっていない以上、正しく効果を発揮しているとは考えにくい。また、う蝕の存在する歯において積極的な治療をおこなっていなくても、エックス線写真においてう蝕病巣直下の歯髄腔が狭窄し、第三象牙質が形成されている現象に臨床では高頻度に遭遇する。そのような現象を人為的に促すことができれば、最良の覆髄法になりうると考えられ、この現象を誘導できるような、生物学根拠に基づく覆髄剤が理想的であるとの発想を得た。

本研究では、第三象牙質の形成を促進、誘導する因子が象牙質中に含まれると考え、特に象牙質の約 20% 程度を占める有機成分に含まれる象牙質基質 [18-20] (Dentin matrix components: DMCs) に着目した。

ところで、骨や腎臓、皮膚などの全身の組織において細胞外基質 (Extracellular matrix: ECM) が酸や酵素などによって分解を受け、分解された ECM によって各組織の創傷治癒が促進されることが報告されている [21-27]。前述した象牙質中の有機成分は、原生象牙質形成過程終了後に残留したものであり [28]、これらは歯髄にとっての細胞外基質として機能していると考えられるため、う蝕に罹患した象牙質においても、DMCs がう蝕関連細菌由来の酸や象牙質に内因性に存在する酵素によって分解を受け、分解された DMCs が象牙質-歯髄複合体の創傷治癒

を促進する可能性がある。これまでに酸によって分解された DMCs が歯髄細胞の機能を促進することが報告されている [29]。しかし、酵素によって分解された DMCs が象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に与える影響を評価した報告は認められない。また、窩洞形成後のラットの歯髄において発現している遺伝子を解析したところ、窩洞直下の歯髄細胞において Matrix metalloproteinase (MMP) 分子の遺伝子発現の上昇が認められ、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に Matrix metalloproteinase (MMP) 分子が関わっている可能性が報告されている [30] が詳細はいまだに不明である。MMP 分子は ECM の分解やリモデリングを通して、全身組織の創傷治癒に関わっている [31, 32] ことから、同様のメカニズムで MMP 分子によって分解された DMCs が象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に影響を与えている可能性は十分に考えられる。

そこで本研究では、生物学的な創傷治癒機転に基づく覆髄剤の開発を念頭に、象牙質-歯髄複合体に内因性に存在している MMP 分子によって分解された DMCs が象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に与える影響を、ラット歯髄初代培養細胞を用いて *in vitro* で検討するとともに、ラット臼歯を用いた直接覆髄実験にて *in vivo* で検討した。

Ⅱ. MMP 分子により分解された象牙質基質がラット歯髄初代培養細胞に与える影響の *in vitro* での検討

---

1) 目的

象牙質-歯髄複合体に存在が確認されている各種 MMP 分子によって分解された象牙質基質が歯髄の創傷治癒過程で重要と考えられる、血管新生、細胞遊走および走化性、細胞増殖、分化、石灰化の各過程に対して与える影響を *in vitro* において検討をおこなった。

2) 材料および方法

① 象牙質基質の精製と MMP 分子による分解

象牙質基質 (Dentin Matrix Components: DMCs) の精製は Tomson ら[33] の方法に準じておこなった。ヒト象牙質粉末をプロテアーゼ阻害剤 (10 mM n-ethylmaleamide (Sigma Aldrich, Poole, 英国) および 5 mM Phenyl-methyl-sulphonyl fluoride (Sigma Aldrich)) と、10% EDTA 溶液中で 4°C にて 24 時間反応させ、3000rpm で 10 分間遠心分離を行い、有機成分の溶出した上清を回収後、再度 EDTA 溶液を追加し、14 日間反応させた。その後、回収した

上清を蒸留水にて透析、凍結乾燥したものを非分解象牙質基質 (非分解 DMCs) とした。

得られた非分解 DMCs を PBS に溶解し、歯髄および象牙質において存在が確認されており、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒促進に効果の期待される[34] リコンビナント MMP 分子 (MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP13 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), MMP20 (フナコシ, 東京)) と 37°C にて 1 時間もしくは 24 時間反応させたものを分解象牙質基質 (分解 DMCs) とした。

なお、本研究で用いたヒト象牙質由来の DMCs は英国 National Research Ethics Service に承認を受け、研究を実施した (承認番号 90/H0405/33)。

② 分解 DMCs のタンパクプロファイルの観察 (SDS-PAGE)

MMP 分子により分解された DMCs のタンパクプロファイルを SDS-PAGE にて解析をおこなった。

PBS に溶解させた 1 mg/ml DMCs を 500 µl に対して、50 µg/ml の各種 MMP 分子 20 µl を添加したものを分解 DMCs、PBS に溶解させた 1 mg/ml DMCs に MMP 分子を添加しなかったものを非分解 DMCs として、37°C にて 1 時間もしくは 24 時間の条件で反応させた。各試料を 1 mg/ml の濃度で loading buffer (Life Technologies, Carlsbad, CA, 米国) に溶解し、70°C にて 10 分間温熱処理をおこな

い、4% -12% Bis-tris gel　(Life Technologies) に 200V で 40 分間電気泳動をおこなった。その後、銀染色 (Silver Express®, Life Technologies) を施し、観察をおこなった。

なお、MMP 分子単体を PBS に溶解させたものを 37°C にて 1 時間もしくは 24 時間静置したものをコントロールとして用いた。

③ 血管新生能の評価

分解 DMCs が血管新生能に与える影響について、血管新生キット(Kurabo, 大阪) を用いて検討した。24 穴細胞培養プレート (Kurabo) に管腔形成初期段階のヒト臍帯静脈内皮細胞とヒト線維芽細胞を、0.01～1 μg/ml 分解 DMCs もしくは 0.01～1 μg/ml 非分解 DMCs を含有した血管新生専用培地中 (Kurabo) にて 11 日間共培養をおこなった。なお、1 μg/ml よりも高い DMCs 濃度では細胞毒性を示すことが予備実験で明らかとなっていたため、以降の実験では DMCs 濃度を 0.01～1 μg/ml の範囲で評価した。

11 日間の培養後、血管内皮細胞のマーカーである CD31 に対する免疫組織化学的染色を、管腔染色キット (Kurabo) を用いておこなった。培地を吸引後、-20°C に冷却した 70% エタノールを添加し、30 分間固定をおこなった。固定液を除去後、1% Bovine serum albumin (Sigma Aldrich) 含有 PBS にてブロッキングを行い、

1 次抗体 (mouse ant-human CD31, Kurabo) を添加し、37°C で 60 分間反応させた。その後、1 次抗体を吸引しブロッキング液にて洗浄後、2 次抗体 (Goat anti-mouse IgG AlkP Conjugate, Kurabo) を添加し、37°C で 60 分間反応させた。反応終了後、5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt/nitro-blue tetrazolium chloride 溶液 (Kurabo) を加え発色させた。光学顕微鏡下にて画像を撮影し、画像解析ソフト (血管新生定量ソフトウェア Ver. 2, Kurabo) を用いて新生血管管腔面積を計測し定量化した。なお血管新生専用培地に DMCs を非添加のもの、もしくは 2 μg/ml Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) を添加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。

④ ラット歯髄初代培養細胞の調整と培養

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)。

6 週齢雄性 Wistar 系ラット (日本クレア, 東京) より歯髄細胞を回収した。実験動物にペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル®) を腹腔内に過剰投与 (200mg/kg) することにより屠殺した。その後、上下顎切歯を顎骨内から摘出、#12 メスにて歯牙を分割し、歯髄組織を回収した。回収した歯髄組織を#15 メスにて細切し、Trypsin-EDTA (Sigma Aldrich) にて処理を行い、セルストレーナー

を用いて軟組織を除去後、細胞培養プレート (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 米国) にて 20% ウシ胎仔血清 (FBS, Sigma Aldrich) および 10 μg/ml Penicillin-Streptomycin (Sigma Aldrich) を添加した α-MEM (Life Technologies) を用い、37°C、5% CO_2 気相下で培養を開始した。その後、2～3 日毎に培養液を交換しながらセミコンフルエントになるまで、約 10 日間培養をおこなった。続いて、Trypsin-EDTA 処理をおこない、付着細胞を回収し、ラット歯髄初代培養細胞 (Rat Pulp Primary Cells: RPPCs) として以降の実験に供した。

⑤ 細胞遊走能の評価

分解 DMCs が歯髄細胞の遊走能に与える影響を検討するため、図 1 に示す Scratch wound assay をおこなった。RPPCs を 6 穴細胞培養プレート (Becton Dickinson and Company) に播種し、10% FBS 含有 α-MEM 中にてセミコンフルエントになるまで培養後、培地中の FBS を 1%に変更し、さらに 24 時間培養した。その後、細胞増殖を抑制する目的で 10 μg/ml mitomycin-C (Calbiochem, San Diego, CA, 米国) を添加した 1% FBS 含有 α-MEM に培地を交換し、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、PBS にて非接着細胞を除去し、1% FBS と 0.01～1 μg/ml 分解 DMCs 含有 α-MEM もしくは 1% FBS と 0.01～1 μg/ml 非分解 DMCs 含有 α-MEM を 6 穴細胞培養プレートに注入、36 時

間培養した。細胞の移動量を、傷を作成した直後と 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顕微鏡画像および画像解析ソフト (Image J, NIH) を用いた。なお、傷作成後 RPPCs を 1% FBS 含有 α-MEM 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。

⑥ 細胞走化性の評価

前項の Scratch wound assay では評価できない細胞の走化性を Trans well assay (Cytoselect®, Cell Biolabs, San Diego, CA, 米国) [35] を用いて検討した。図 2 で示すように、upper chamber に 1% FBS 含有 α-MEM とともに 2×10^4 cells /well になるよう調整した RPPCs を播種し、直径 8 μm ポリカーボネート製メンブレンインサートで隔てられた lower chamber に 1% FBS と 0.01～1 μg/ml 分解 DMCs を添加した α-MEM もしくは 0.01～1 μg/ml 非分解 DMCs を添加した α-MEM を加え、37°C、5% CO_2 気相下で 2 時間培養後、メンブレンを通過して、lower chamber に移動した細胞を detachment buffer を加え 30 分間作用させることで剥離し、CyQuant® GR dye (Cell Biolabs) を添加し 20 分間静置することで蛍光染色をおこなった。その後、蛍光強度 (485 nm/535 nm) をマイクロプレートリーダー (ARVO MX, Perkin Elmer, Waltham, MA, 米国) を用いて測定することにより細

胞走化性を定量化した。なお、lower chamber に 1% FBS 含有 α-MEM を加えたものコントロールとした。試料数は各条件につき 8 とした。

⑦ 細胞増殖能の評価

分解 DMCs が歯髄細胞の増殖能に与える影響を検討するため、1.0×10^4 cells/well になるよう調整した RPPCs を 96 穴細胞培養プレート (Becton Dickinson and Company) に播種し、1% FBS と 0.01～1 μg/ml 分解 DMCs もしくは 0.01～1 μg/ml 非分解 DMCs を添加した α-MEM 中にて 37°C、5% CO_2 気相下で 5 日間培養した。 培地は 3 日目に一度交換した。培養終了後、WST-1 試薬 (Roche, Basel, スイス) [32)]を培養上清中に添加し、37°C、5% CO_2 気相下にて 1 時間培養した。さらに、室温にて 1 分間振盪した後に、450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (ARVO MX) にて測定した。なお、RPPPCs を 1% FBS 含有 α-MEM 中にて培養したものコントロールとした。試料数は各条件につき 6 とした。

⑧ Alkaline Phosphatase (ALP) 活性の評価

分解 DMCs が歯髄細胞の分化能に与える影響を検討するため、ALP 活性の測定をおこなった。5.0×10^4 cells/well になるよう調節した RPPCs を 24 穴細胞培養プレート (Becton Dickinson and Company) に播種し、50 μg/ml アスコルビン酸

(Sigma Aldrich)、10 mM β-グリセロリン酸 (Sigma Aldrich) を加えた 10% FBS 含有 α-MEM に 0.01～1 μg/ml 分解 DMCs もしくは 0.01～1 μg/ml 非分解 DMCs を添加し 7 日、もしくは 14 日間培養した。

その後、Alkaline Phosphate Substrate Kit (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, 米国) を用いて ALP 活性を測定した。それぞれの培養期間終了後、PBS を加え洗浄し、0.02% Triton X-100 (和光純薬工業, 大阪) 含有 PBS を添加した。凍結融解法にて得られた細胞上清 20 μL に *p*-nitrophenyl-phosphate (Sigma Aldrich) 80 μL を加え、37°C にて 30 分間反応させた後、100 μL の 0.4 N 水酸化ナトリウム溶液 (和光純薬工業) を加えて反応を停止させた。反応溶液の 405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (ARVO MX) にて測定し、検量線を用いて *p*-nitrophenol 量を測定した。さらに、BCA アッセイ (BCA Protein assay Kit®, Life Technologies) を用いて上清のタンパク濃度を測定し、ALP 活性 (μmol/min/mg) を算出した。なお、RPPCs を 50 μg/ml アスコルビン酸と 10 mM β-グリセロリン酸を加えた 10% FBS 含有 α-MEM 中にて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 6 とした。

⑨ 石灰化能の評価

分解 DMCs が歯髄細胞の石灰化能に与える影響を評価するためにアリザリン

レッド染色をおこなった。5.0×10^4 cells/well になるよう調節した RPPCs を 24 穴細胞培養プレート (Becton Dickinson and Company) に播種し、50 μg/ml アスコルビン酸 (Sigma Aldrich)、10 mM β-グリセロリン酸 (Sigma Aldrich) を加えた 10% FBS 含有 α-MEM に 0.01～1 μg/ml 分解 DMCs もしくは 0.01～1 μg/ml 非分解 DMCs を添加し、21 日間培養をおこなった。培地交換は 2～3 日ごとにおこなった。

培養終了後、培地を除去し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて 15 分間固定した後、アリザリンレッド溶液 (PG リサーチ, 東京) を用いて 30 分間染色をおこなった。その後水洗し、5% ギ酸にて石灰化物を溶出し、405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (ARVO MX) にて測定することで定量化した (石灰化定量キット, PG リサーチ) 。なお、RPPCs を 50 μg/ml アスコルビン酸と 10 mM β-グリセロリン酸を加えた 10% FBS 含有 α-MEM 中にて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 6 とした。

⑩ 統計学的解析

上記の実験において統計学的有意差検定に One way ANOVA および Tukey-Kramer test を用いて危険率 5%で評価した。

3) 結果

① 分解象牙質基質タンパクプロファイルの観察 (SDS-PAGE)

MMP1 と MMP2 によって分解を受けた DMCs のタンパクプロファイルを図 3 に示す。MMP1 と DMCs を 1 時間 (図 3-A①) もしくは 24 時間 (図 3-A②) 反応させると、非分解 DMCs (図 3-A③) と比べて、図 3-A の矢印で示すように分子量の小さいバンドが出現し、DMCs は MMP1 によって分解を受けることが観察された。また、MMP1 と DMCs の反応時間は 1 時間 (図 3-A①) に比べて 24 時間 (図 3-A②) の方で DMCs の分解が進み、より分子量の小さいバンドが観察された。MMP1 のみを PBS に添加後、1 時間経過後 (図 3-A⑤) もしくは 24 時間経過 (図 3-A⑥) した試料では、1 時間経過後では MMP1 と思われるバンドが観察されたが、24 時間経過後では、同様のバンドは検出されなかった。

MMP2 を用いた場合でも DMCs は分解されることが確認され (図 3-B, 矢印)、MMP1 と同様に反応時間が 1 時間の場合に比べて 24 時間の方がより分解が進むことが観察された (図 3-B①, ②)。

なお、反応時間が 24 時間以上の場合についても同様の実験をおこなったが、反応時間が 24 時間のものとバンドの位置は変わらなかった。さらに、他の MMP 分子では MMP1 や MMP2 と得られたバンドの位置は異なるものの DMCs が分解されたタンパクプロファイルが観察された 。

② 血管新生能の評価

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である 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 4) 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 (図 4) ($p<0.05$)。

他の MMP 分子による分解 DMCs は血管新生能に影響を与えなかった ($p>0.05$)。

③ 細胞遊走能の評価

細胞遊走能を評価するために Scratch wound assay にて検討をおこなった結果、1 μg/ml の MMP1 (図 5-A)、MMP3 (図 5-B) および MMP9 (図 5-C) により生成された分解 DMCs は非分解 DMCs と比較して RPPCs の遊走能を促進した ($p<0.05$)。

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 ($p>0.05$)。

④ 細胞走化性の評価

MMP 分子によって分解を受けた DMCs が細胞走化性に与える影響について

Trans well assay にて検討をおこなった結果、1 μg/ml の MMP1、 MMP3、 MMP9 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 RPPCs の細胞走化性を促進した ($p<0.05$) (図 6)。

他の MMP 分子による分解 DMCs は細胞走化性に影響を与えなかった ($p>0.05$)。

⑤ 細胞増殖能の評価

MMP 分子によって分解を受けた DMCs が細胞増殖能に与える影響について WST-1 法を用いて検討した結果、1 μg/ml の MMP1 (図 7-A)、MMP8 (図 7-B)、MMP9 (図 7-C) および MMP13 (図 7-D) により生成された分解 DMCs は RPPCs の細胞増殖能を促進した ($p<0.05$)。

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

⑥ ALP 活性の評価

MMP 分子によって分解を受けた DMCs が細胞分化に与える影響について検討した結果、培養 7 日目において MMP1 (図 8-A) および MMP20 (図 8-B) により生成された分解 DMCs は非分解 DMCs と比較して RPPCs の ALP 活性を促進し

た (p<0.05)。また、培養 14 日目では、MMP1 (図 8-C) 、MMP20 (図 8-F) に加え MMP9 (図 8-D)、MMP13 (図 8-E) により生成された分解 DMCs は RPPCs の ALP 活性を促進することが示された (p<0.05) 。

他の MMP 分子による分解 DMCs は細胞分化に影響を与えなかった (p>0.05)。

⑦ 石灰化能の評価

MMP 分子によって分解を受けた DMCs が石灰化能に与える影響について検討し、アリザリンレッド染色像 (図 9-A, B, E, F) ならびに石灰化物を定量化したグラフを示す (図 9 -C, D, G, H)。

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 RPPCs の石灰化能を促進した (p<0.05)。

他の MMP 分子による分解 DMCs は石灰化能に影響を与えなかった (p>0.05)。

4) 小括

MMP 分子により生成された分解 DMCs は歯髄細胞の様々な機能を促進することが示された (図 10)。MMP1、MMP2、MMP3 による分解 DMCs が血管新生能を促進し、MMP1、MMP3、MMP9、MMP20 による分解 DMCs が細胞遊走能・走化性を促進した。また、MMP1、MMP8、MMP9、MMP13 による分解 DMCs

が細胞増殖を促進し、MMP1、MMP9、MMP13、MMP20 による分解 DMCs が細胞分化ならびに石灰化を促進した。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。

Ⅲ. MMP 分子により分解された象牙質基質がラット象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に与える影響の *in vivo* での検討

---

1) 目的

これまでの *in vitro* の実験で得られた結果において、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もっとも効果的であるかについて、さらに詳細な検討をおこなうため、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考えられるラット臼歯に窩洞形成後、分解 DMCs を用いて直接覆髄をおこない、第三象牙質の形成に与える影響を *in vivo* で検討した。

2) 材料および方法

①分解象牙質基質によって誘導された第三象牙質の病理組織学的評価

8 週齢雄性 Wistar 系ラットにペントバルビタールナトリウム (30 mg/kg) の腹腔内注射による全身麻酔を施し、引き続いて術後疼痛緩和のためにカルプロフェン (リマダイル®) (3 mg/kg)の投与をおこなった。窩洞形成は Yoshioka ら [29]、Tran ら [37] 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 (VIVAMATE G5, NSK, 栃木) に装着した#1 ラウンドバー (Dentsply Maillefer,

Ballaigues, スイス) を用いて、咬合面より露髄するような窩洞を形成した。露髄面を生理食塩水 (大塚製薬, 東京) で洗浄し、止血を確認後、0.01～1 μg/ml の濃度に調整した分解 DMCs および非分解 DMCs をゼラチンスポンジ (スポンゼル®, アステラス製薬, 大阪) に 20 μl 浸漬させた後、直接覆髄をおこなった。その後、グラスアイオノマーセメント (FUJI IX®, GC, 東京) にて充填をおこなった。窩洞形成から 4 週間経過後に、実験動物にペントバルビタールナトリウムを腹腔内に過剰投与することで屠殺した。続いて、マイクロ CT (R_mCT2, RIGAKU, 東京) を用いて、被験歯の断層撮影をおこない、肉眼では判別しにくい仮封の脱離の有無を確認した。撮影条件は管電流 90 kV、管電流は 160 μA、スライス幅は 10 μm に設定した。仮封の脱離を認めた試料については評価の対象から除外した。

その後、実験動物を 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (ナカライテスク, 京都) 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、10% ギ酸-クエン酸溶液中にて 1 週間の低温脱灰をおこなった。脱灰終了後、上昇アルコール系列で脱水、パラフィン包埋をおこない、厚さ 5 μm の連続切片をミクロトーム (RM 2155, Leica, Wetzlar, ドイツ) 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光学顕微鏡下にて Dentin bridge の形成量を対象におこなった。病理組織学的評価の基準は Kiba らの報告[38] を参考に作成したものを使用した (図 11)。なお、ゼラチンスポンジに PBS を 20 μl 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 統計学的解析

本実験では、Kruskal-Wallis test および Steel-Dwass test を用いて、危険率 5%にて統計学的有意差を検討した。

3) 結果

図 12 に直接覆髄から 4 週間経過後の H-E 染色像を示す。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 (表 1) ($p<0.05$)。その中でも 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、露髄部を 2/3 以上、あるいは全体を覆う第三象牙質の形成が認められ、かつ象牙細管構造を有する第三象牙質の形成が認められた (図 13, 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、形成された第三象牙質に細管構造な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)。

4) 小括

In vivo の実験系にて、どの MMP 分子による分解 DMCs が最も象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に対して効果があるのか検討した結果、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 (図 14)。

IV．考察

歯の発生過程において形成される原生象牙質は上皮組織と間葉組織の相互作用によって形成され､そのメカニズムに関する報告は比較的多く認められる[12-15]。しかし、後天的にう蝕や外傷などの結果、象牙質-歯髄複合体の防御反応として間葉組織のみから形成される第三象牙質に関する報告は少なく[16, 17]、第三象牙質の詳細な形成メカニズムは現在も明らかとなっていない。

現在の歯科臨床で、直接覆髄剤 (材) として用いられている水酸化カルシウム製剤やケイ酸カルシウム系セメントなどの作用機序としては、露髄面直下の歯髄組織に壊死層が生じ、その刺激をうけた生存歯髄組織により象牙質-歯髄複合体の創傷治癒が進んでいくと考えられている[39]。しかし、第三象牙質の形成メカニズムが明らかとなっていない以上、現在使用されている直接覆髄剤は象牙質-歯髄複合体の創傷治癒機転に基づくものではないため、生物学根拠に基づく覆髄剤が開発されれば覆髄の臨床成績がさらに向上すると考えられる。

そこで本研究では、象牙質-歯髄複合体の生理学的な治癒機転に基づく覆髄剤の開発を目指し、第三象牙質形成メカニズムの解明を試みた。第三象牙質を誘導する因子として、特に象牙質の約 20%程度を占める含まれる有機成分に含まれる象牙質基質[18-20] (Dentin matrix components: DMCs) に本研究では着目した。

これまでに象牙質基質中に存在する成長因子などによる骨誘導能に期待して、骨補填剤として応用した報告[40]や、象牙質中に存在するタンパクや成長因子、神経ペプチドなどが歯髄の創傷治癒に影響を与えるという報告[41]、また、それらの分子が酸や酵素と反応することで歯髄細胞の機能を促進するという報告がある[42]。

一方、象牙質中に存在する有機成分は、原生象牙質形成終了後に残留したものであると考えられ、これらは歯髄細胞にとっての細胞外基質 (Extracellular matrix: ECM) としての役割を果たしていると考えられる。ECM は体内のほぼすべての組織に存在し、組織特異的な構造を有するが[43]、ECM は各組織において、物理的な骨格としてだけでなく、成長因子などの貯蔵庫としての働きがあると言われている[44]。また、骨や腎臓や皮膚などの全身の組織において ECM が酸や酵素などによって分解を受け、分解された ECM によって各組織の創傷治癒が促進されることが報告されており[21-27]、一例として骨では、破骨細胞から分泌された酵素により骨基質が分解され、分解された骨基質中に含まれる遊離成長因子により骨組織の石灰化の促進ならびに骨代謝が促進されることが報告されている。[26, 27]

DMCs は分解を受けていない状態でも抗菌性[45]、血管新生能[46]、細胞遊走能[47]を向上させるという報告があり、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に対する効果

が期待されるが、う蝕に罹患した象牙質において、DMCs はう蝕関連細菌由来の酸や象牙質に内因性に存在する酵素によって、全身組織の ECM と同様に分解を受け、分解された DMCs が象牙質-歯髄複合体の創傷治癒を促進する可能性がある。DMCs を分解する酵素として細菌が産生する酵素についても検討を考慮したが、象牙質う蝕から検出される細菌種は多種多様であり、産生される酵素も多く存在することから、本研究ではう蝕の進行に伴い歯髄細胞に早期から影響を与える可能性が高く、窩洞形成後の象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に関わっている可能性が報告されている MMP 分子 [29] に注目した。

MMP 分子は Zn^{2+}を活性中心にもち、Ca^{2+} を必要とする金属依存的なプロテアーゼであり中性領域で機能すると言われている [48]。これまでにヒトでは 26 の MMP 分子が確認されており、一次構造と基質特異性の違いからコラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロメライシン、膜型 MMP、その他の 5 群に分類されている [49]。MMP 分子の働きは生体内で厳密に制御されており、細胞外基質の分解を通して、細胞増殖、細胞遊走、リモデリング、創傷治癒や血管新生などの生理現象に関わっている [50, 51]。一方で、ガンの浸潤 [52, 53] や関節リウマチ [54, 55] などの疾患に関係しているとされ、歯科領域ではや歯周病の進行 [56] や根尖病巣の進行 [57]、歯科材料と象牙質の接着面の破壊 [58] などにも関連があると言われている。象牙質-歯髄複合体にも MMP 分子は存在している [31] が、その役割はいまだ完全

には明らかになっていない。いくつかの MMP 分子がう蝕進行の際、象牙質の分解に関わっているのではないかと言われている[59]が詳細は不明である。そこで本研究では、全身の組織と同様に、象牙質-歯髄複合体において MMP 分子により象牙質基質が分解され、分解された象牙質基質により創傷治癒が促進されるのではないかと仮説をたて、*in vitro*、*in vivo* の両面から検証をおこなった。

MMP 分子によって分解された象牙質基質 (分解 DMCs) がラット歯髄初代培養細胞に与える影響を検討した *in vitro* での実験系より、各種 MMP 分子による分解 DMCs が歯髄細胞の様々な機能を促進することが明らかとなった。今回用いた MMP 分子はコラゲナーゼ (MMP1, MMP8, MMP13)、ゼラチナーゼ (MMP2, MMP9)、ストロメライシン (MMP3) やエナメライシン (MMP20) であり、MMP 分子としての分類は異なるが分解基質の一部は重複しており、異なる MMP 分子により分解された細胞外基質が同じ生理学的作用を持つことが報告されている[60]。一方、MMP3、MMP8、MMP12、MMP13、MMP20 は laminin を分解基質として持っているが、MMP8 はその分解切断部位が他の MMP 分子と異なり、異なる切断部位で分解された laminin はその生理学的な役割も異なることが報告されている[61]。すなわち、分解基質が同じであっても切断部位の差により生理学的な機能が異なる場合もある。また、MMP2 や MMP9 は同じゼラチナーゼであるが、歯において MMP2 は象牙質全体に広く分布し、特にエナメル象牙境に多く

存在するのに対し、MMP9 は象牙芽細胞層及び象牙前質に多く存在し、その局在が異なっていることが報告されている [62]。歯における MMP 分子の役割はいまだすべて明らかとなっていないものの、分子の局在が異なることで、組織における機能が異なっている可能性が推察される。

In vitro の実験結果より、各種 MMP 分子により分解された DMCs が歯髄細胞の機能を、創傷治癒の各過程において特異的に促進している可能性が示唆された。

そこで、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もっとも効果的であるかについて、さらに詳細な検討をおこなうため、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できると考えられる、ラットの臼歯に MMP 分子により分解された DMCs を用いて直接覆髄をおこなう *in vivo* の実験にて、その影響を検討した。

その結果、表 1 に示すように MMP1、MMP9、MMP13、MMP20 による分解 DMCs によって直接覆髄をおこなうと、他の MMP 分子による分解 DMCs や非分解 DMCs と比較して、より多くの第三象牙質形成が認められ、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に影響を与えることが明らかとなった。なかでも、MMP20 による分解 DMCs が最も第三象牙質形成を促進することが明らかとなり、他の MMP 分子による分解 DMCs では観察されなかった第三象牙質における細管構造を有

していた (図 13)。

MMP1 は上皮や筋肉の創傷治癒[63, 64]に関わっていることが報告されており、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に対しても影響をもつ可能性考えられ、*in vitro* の実験系において今回評価したすべての細胞機能を向上させたが、*in vivo* の実験系においては、コントロールと比較すると第三象牙質形成誘導効果を持つものの、MMP20 に比べるとその効果は劣っていた。これは、様々な因子が関係している生命現象は *in vitro* の実験結果を単純に反映するわけではないと考えられるが、酵素による ECM の分解産物が、そのおかれた環境によって作用が異なるという報告[65, 66]があることを考慮すると、今回のような結果も起こりうるものと推察される。また MMP9 や MMP13 により分解された DMCs も *in vivo* の実験系において、コントロールと比較すると第三象牙質誘導効果を発揮した。MMP9 や MMP13 は骨折の創傷治癒に関わっている[67, 68]との報告があり、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒においても骨組織と同様の修復メカニズムが働いた可能性が考えられる。

本研究の動物実験において最も第三象牙質誘導効果が高かった MMP20 は、全身において腎臓にその発現を認める報告があるものの[69]、それ以外の報告はほぼすべて歯に関するものであり[70-73]、歯の発生過程でエナメル関連タンパクを分解することでエナメル質の成熟に関わっていると報告されている[74]。一方、

成熟した歯においては、象牙芽細胞と象牙質基質中にその存在が確認されているが[72)]、その役割についてはいまだ不明である。MMP20 ノックアウトマウスやヒトにおける遺伝子変異の表現型が歯に限定的であり、他の組織に認められないこと[75, 76)]から、歯に特異的な MMP 分子であると考えられている[77)]。また、う蝕の進行に伴って象牙芽細胞における MMP20 の発現が上昇することや象牙質の脱灰に伴い象牙質基質から MMP20 が放出され活性を持つことがこれまでに報告されている[78)]。このように、歯に特異的な発現を示す MMP20 により生成された分解 DMCs が象牙質-歯髄複合体の創傷治癒を促進しているという本研究結果を合わせて考えると、MMP20 は石灰化を伴う特殊な治癒様式を経る歯髄の修復メカニズムを特徴づけている可能性がある。

なお、本研究では MMP 分子によって分解された DMCs に焦点を当てており、MMP 分子単独による歯髄への作用の検討はおこなっていないが、MMP 分子はプロテアーゼ活性化受容体を通して細胞に直接働きかけている可能性もあるため[79, 80)]今後さらなる検討が必要である。

また、歯には MMP 分子以外の内因性酵素も存在しており、セリンプロテアーゼやシステインプロテアーゼが細胞外基質の分解に関わっているとの報告がある[81)]。セリンプロテーゼの一種であるキモトリプシン C は歯の発生過程に関わっているとの報告もある[82)]。また歯と類似した硬組織である骨において破骨細

胞が分泌するシステインプロテアーゼの一種であるカテプシン K と MMP9 が同調して骨基質の分解に関わっていると言われている[83)]。よって、MMP 分子と同様に、これらのプロテアーゼによる象牙質基質の分解産物が歯髄の創傷治癒に影響を与えている可能性があり、今後の検討が必要であると考えられる。

今後、新たな覆髄剤の開発を検討するにあたり、本研究では分解 DMCs の担体としてゼラチンスポンジを用いており、ゼラチンスポンジは直接覆髄剤が本来具備すべき機械的強度や辺縁封鎖性がそれほど高くないことから、今後の課題として、より適切な担体の選択をすることで、なお効率的に第三象牙質の誘導が可能になると考えられる。また、MMP 分子による分解 DMCs は様々な物質を含んだ複合体であり、分解されたどの物質が象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に直接的に影響を与えたかはいまだに不明である。今後、分解 DMCs の構造解析や同定をおこない、歯髄の創傷治癒を促進する物質を特定することで、新規の生物学的根拠に基づく覆髄剤の開発が可能になると考えられる。

また、歯髄の治癒過程において免疫担当細胞の M2 マクロファージが重要な役割を果たす可能性がこれまでに報告されている[84, 85)]。これらのことから、本研究で用いた分解 DMCs によって組織修復に有効な免疫反応を惹起することで歯髄の創傷治癒を促進している可能性がある。今後、各種分解 DMCs の組成を明らかにし、その各々の因子と免疫担当細胞との関連を検討することが必要であ

ると考えらえる。

本研究をさらに展開して、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒機転に基づく覆髄剤の開発が実現すれば、覆髄の臨床成績をさらに向上させることによって歯の寿命を延ばすことにつながるため、広義の Minimum intervention dentistry に大きく貢献できるものと考えられる。また、創傷治癒機転に基づく覆髄剤の開発に伴い明らかになる象牙質-歯髄複合体の修復メカニズムの解明は、近年研究が進められている歯髄の再生研究を理解するうえでも非常に重要であると考えられる[86, 87]。

V. 結論

MMP 分子によって分解された象牙質基質は、*in vitro* の実験系において象牙質-歯髄複合体の創傷治癒過程を時期特異的に促進する可能性が示された。また、MMP1、MMP9、MMP13 および MMP20 により生成された分解象牙質基質は *in vivo* の実験系において象牙質-歯髄複合体の創傷治癒を促進した。なかでも、MMP20 により分解された象牙質基質は、他の MMP 分子よりも歯髄の創傷治癒を有意に促進することがわかり、第三象牙質の形成メカニズムの一端が明らかとなった。

VI. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、終始ご指導とご鞭撻を賜りました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) 恵比須繁之教授ならびに林美加子教授に、深甚なる感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり終始ご懇篤なるご指導を賜りました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) 高橋雄介博士に心より感謝申し上げます。

最後に本研究に際し、多大なる御協力と御助言を頂いた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) の皆様に、厚くお礼申し上げます。

VII. 参考文献

1) Hilton TJ, Ferracane JL, Mancl L, Northwest Practice-based Research Collaborative in Evidence-based Dentistry (NWP) (2013). Comparison of CaOH with MTA for direct pulp capping: a PBRN randomized clinical trial. *J Dent Res*. 92:16-22.

2) Bjørndal L, Reit C, Bruun G, Markvart M, Kjaeldgaard M, Näsman P, Thordrup M, Dige I, Nyvad B, Fransson H, Lager A, Ericson D, Petersson K, Olsson J, Santimano EM, Wennström A, Winkel P, Gluud C (2010) . Treatment of deep caries lesions in adults: randomized clinical trials comparing stepwise vs. direct complete excavation, and direct pulp capping vs. partial pulpotomy. *Eur J Oral Sci*. 118:290-7.

3) Aguilar P, Linsuwanont P (2011). Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. *J Endod*. 37:581-7.

4) Mente J, Hufnagel S, Leo M, Michel A, Gehrig H, Panagidis D, Saure D, Pfefferle T (2014). Treatment outcome of mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: long-term results. *J Endod.* 40:1746-51.

5) Mori GG, Teixeira LM, de Oliveira DL, Jacomini LM, da Silva SR.

Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats (2014). *J Endod.* 40:1485-8.

6) Yang Y, Huang L, Dong Y, Zhang H, Zhou W, Ban J, Wei J, Liu Y, Gao J, Chen J (2014). In vitro antibacterial activity of a novel resin-based pulp capping material containing the quaternary ammonium salt MAE-DB and portland cement. *PLoS One*. 9:e112549.

7) Chang SW, Lee SY, Kum KY, Kim EC (2014). Effects of ProRoot MTA, Bioaggregate, and Micromega MTA on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod*. 40:113-8.

8) Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A (2004). Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res*. 83:590-5.

9) Decup F, Six N, Palmier B, Buch D, Lasfargues JJ, Salih E, Goldberg M (2000). Bone sialoprotein induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin Oral Investig*. 4:110-9.

10) Yang IS, Lee DS, Park JT, Kim HJ, Son HH, Park JC (2010). Tertiary dentin formation after direct pulp capping with odontogenic ameloblast-associated protein in rat teeth. *J Endod*. 36:1956-62.

11) Hayashi K, Handa K, Koike T, Saito T (2013). The possibility of genistein as a new direct pulp capping agent. *Dent Mater J*. 32:976-85.

12) Couve E (1986). Ultrastructural change during the life cycle of human odontoblasts. *Arch Oral Biol.* 3:643-51.

13) Yoshida S,Ohshima H (1996). Distribution and organization of peripheral capillaries in dental pulp and their relationship to odontoblast. *Anat Rec*. 245:313-26.

14) Jernvall J, Thesleff I (2000). Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech De*v. 92:19-29.

15) Goldberg M, Septier D, Lécolle S, Chardin H, Quintana MA, Acevedo AC, Gafni G, Dillouya D, Vermelin L, Thonemann B (1995). Dental mineralization. *Int J Dev Biol*. 39:93-110.

16) Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O (2014). Reactionary dentinogenesis and neuroimmune response in dental caries. *J Dent Res*. 93:788-93.

17) Xie X, Ma S, Li C, Liu P, Wang H, Chen L, Qin C (2014). Expression of small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) in the reparative dentin of rat molars. *Dent Traumatol*. 30:285-95.

18) Yamakoshi Y, Kinoshita S, Izuhara L, Karakida T, Fukae M, Oida S (2014). DPP

and DSP are necessary for maintaining TGF-β1 activity in dentin. *J Dent Res*. 93:671-7

19) Lee HK, Lee DS, Park SJ, Cho KH, Bae HS, Park JC (2014). Nuclear actor I-C (NFIC) regulates dentin sialophosphoprotein (DSPP) and E-cadherin via control of Krüppel-like factor 4 (KLF4) during dentinogenesis. *J Biol Chem*. 289:28225-36.

20) Guo S, Lim D, Dong Z, Saunders TL, Ma PX, Marcelo CL, Ritchie HH (2014). Dentin Sialophosphoprotein: A regulatory protein for dental pulp stem cell Identity and Fate. *Stem Cells Dev*. 23:2883-94.

21) Hattori N, Mochizuki S, Kishi K, Nakajima T, Takaishi H, D'Armiento J, Okada Y (2009). MMP-13 plays a role in keratinocyte migration, angiogenesis, and contraction in mouse skin wound healing. *Am J Pathol*. 175:533-46.

22) Adair-Kirk TL, Atkinson JJ, Broekelmann TJ, Doi M, Tryggvason K, Miner JH, Mecham RP, Senior RM (2003). A site on laminin alpha 5, AQARSAASKVKVSMKF, induces inflammatory cell production of matrix metalloproteinase-9 and chemotaxis. *J Immunol*. 171:398-406.

23) Brennan EP, Tang XH, Stewart-Akers AM, Gudas LJ, Badylak SF (2008). Chemoattractant activity of degradation products of fetal and adult skin extracellular matrix for keratinocyte progenitor cells. *J Tissue Eng Regen Med*.

2:491-8.

24) Tang SY, Herber RP, Ho SP, Alliston T (2012). Matrix metalloproteinase-13 is required for osteocytic perilacunar remodeling and maintains bone fracture resistance. *J Bone Miner Res*. 27:1936-50.

25) Chow AK, Cena J, Schulz R (2007). Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol.* 152:189–205.

26) Xian L, Wu X, Pang L, Lou M, Rosen CJ, Qiu T, Crane J, Frassica F, Zhang L, Rodriguez JP, Xiaofeng Jia, Shoshana Yakar, Shouhong Xuan, Argiris Efstratiadis, Mei Wan, Xu Cao (2012). Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells. *Nat Med*. 18:1095-101.

27) Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, Zhao L, Nagy TR, Peng X, Hu J, Feng X, Van Hul W, Wan M, Cao X (2009).TGF-β1 induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med*. 15:757-65.

28) Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR (2012). Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Arch Oral Biol*. 57:109-21.

29) 高橋雄介，吉岡靖介，今里 聡，恵比須繁之 (2010). 象牙質基質タンパクが歯髄細胞に与える影響. 非特定営利活動法人日本歯科保存学会 2010 年度秋

季学術大会 (第 133 回) プログラムおよび講演抄録集. 32

30) Yoshioka S, Takahashi Y, Abe M, Michikami I, Imazato S, Wakisaka S, Hayashi M, Ebisu S (2013). Activation of the Wnt/β-catenin pathway and tissue inhibitor of metalloprotease 1 during tertiary dentinogenesis. *J Biochem*. 153:43-50.

31) Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V (1997). Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science*. 277:225–8.

32) Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T (2003). Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci*. 111:117-27.

33) Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR (2007). Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent*. 35:636-42.

34) Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJ, Cooper PR. (2013). Histone deacetylase inhibitors epigenetically promote reparative events in primary dental pulp cells. *Exp Cell Res*. 319:1534-43.

35) Xue M, McKelvey K, Shen K, Minhas N, March L, Park SY, Jackson CJ (2014). Endogenous MMP-9 and not MMP-2 promotes rheumatoid synovial fibroblast

survival, inflammation and cartilage degradation. *Rheumatology*. 53:2270-9.

36) Hasegawa T, Isobe K (2000). Characterization of a murine gene encoding an acidic-basic dipeptide repeat that interacts with GADD34. *J Cell Biochem*. 77:596-603.

37) Tran XV, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Decup F, Opsahl Vital S, Chaussain C, Boukpessi T (2012). Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res*. 91:1166-71.

38) Kiba W, Imazato S, Takahashi Y, Yoshioka S, Ebisu S, Nakano T (2010). Efficacy of polyphasic calcium phosphates as a direct pulp capping material. *J Dent*. 38:828-37.

39) 須田 英明, 中村 洋 (2000). 第 3 版エンドドンティクス. 永末書店: 京都: 167-8.

40) Nampo T, Watahiki J, Enomoto A, Taguchi T, Ono M, Nakano H, Yamamoto G, Irie T, Tachikawa T, Maki K (2010). A new method for alveolar bone repair using extracted teeth for the graft material. *J Periodontol*. 81:1264-72.

41) Chaussain C, Eapen AS, Huet E, Floris C, Ravindran S, Hao J, Menashi S, George A (2009). MMP2-cleavage of DMP1 generates a bioactive peptide promoting differentiation of dental pulp stem/progenitor cell. *Eur Cell Mater*. 18:84-95.

42) Yamakoshi Y, Hu JC, Iwata T, Kobayashi K, Fukae M, Simmer JP (2006). Dentin sialophosphoprotein is processed by MMP-2 and MMP-20 in vitro and in vivo. *Biol Chem*. 281:38235-43.

43) Ravindran S, George A (2014). Multifunctional ECM proteins in bone and teeth. *Exp Cell Res*. 325:148-54.

44) Mott JD, Werb Z (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol*. 16:558-64.

45) Smith JG, Smith AJ, Shelton RM, Cooper PR (2012). Antibacterial activity of dentine and pulp extracellular matrix extracts. *Int Endod J*. 45:749-55.

46) Zhang R, Cooper PR, Smith G, Nör JE, Smith AJ (2011). Angiogenic activity of dentin matrix components. *J Endod*. 37:26-30.

47) Smith JG, Smith AJ, Shelton RM, Cooper PR (2012). Recruitment of dental pulp cells by dentine and pulp extracellular matrix components. *Exp Cell Res*. 318:2397-406.

48) Amălinei C, Căruntu ID, Bălan RA (2007). Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol*. 48:323-34.

49) Overall CM, López-Otín C (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*. 2:657-72.

50) Ii M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y (2006). Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med*. 231:20-7.

51) Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otín C (2004). Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol*.48:411-24.

52) Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J*. 278:16-27.

53) Vandenbroucke RE, Libert C (2014). Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition?. *Nat Rev Drug Discov*. 13:904-27.

54) Goldring MB (2000). The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 43:1916–26.

55) Borden P, Solymar D, Sucharczuk A, Lindman B, Cannon P (1996). Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-3 gene expression in human chondrocytes. *J Biol Chem.* 271:23577-81.

56) Gursoy UK, Könönen E, Pradhan-Palikhe P, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Suominen-Taipale L (2010). Salivary MMP-8, TIMP-1, and ICTP as markers of

advanced periodontitis. *J Clin Periodontol*. 37:487-93.

57) Wan C, Yuan G, Yang J, Sun Q, Zhang L, Zhang J, Zhang L, Chen Z (2014). MMP9 deficiency increased the size of experimentally induced apical periodontitis. *J Endod*. 40:658-64.

58) Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, Tezvergil-Mutluay A (2011). State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater.* 27:1-16.

59) Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S (2006). The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res*. 85:22-32.

60) Suhr F, Brixius K, Bloch W (2009). Angiogenic and vascular modulation by extracellular matrix cleavage products. *Curr Pharm Des*. 15:389-410.

61) Pirilä E, Sharabi A, Salo T, Quaranta V, Tu H, Heljasvaara R, Koshikawa N, Sorsa T, Maisi P (2003). Matrix metalloproteinases process the laminin-5 gamma 2-chain and regulate epithelial cell migration. *Biochem Biophys Res Commun*. 303:1012-7.

62) Niu LN, Zhang L, Jiao K, Li F, Ding YX, Wang DY, Wang MQ, Tay FR, Chen JH (2011). Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. *J Dent*. 39:536-42.

63) Mu X, Bellayr I, Pan H, Choi Y, Li Y (2013). Regeneration of soft tissues is

promoted by MMP1 treatment after digit amputation in mice. *PLoS One.* 8:e59105.

64) Wang W, Pan H, Murray K, Jefferson BS, Li Y (2009). Matrix metalloproteinase-1 promotes muscle cell migration and differentiation. *Am J Pathol.* 174: 541-9

65) Lee B, Clarke D, Al Ahmad A, Kahle M, Parham C, Auckland L, Shaw C, Fidanboylu M, Orr AW, Ogunshola O, Fertala A, Thomas SA, Bix GJ (2011). Perlecan domain V is neuroprotective and proangiogenic following ischemic stroke in rodents. *J Clin Invest*. 121:3005-23.

66) Ricard-Blum S, Salza R (2014). Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of the extracellular matrix. *Exp Dermatol*. 23:457-63.

67) Colnot C, Thompson Z, Miclau T, Werb Z, Helms JA (2003). Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development*. 130:4123-33.

68) Tang SY, Herber RP, Ho SP, Alliston T (2012). Matrix metalloproteinase-13 is required for osteocytic perilacunar remodeling and maintains bone fracture resistance. *J Bone Miner Res*. 27:1936-50.

69) Wheeler HE, Metter EJ, Tanaka T, Absher D, Higgins J, Zahn JM, Wilhelmy J, Davis RW, Singleton A, Myers RM, Ferrucci L, Kim SK (2009). Sequential use of transcriptional profiling, expression quantitative trait mapping, and gene

association implicates MMP20 in human kidney aging. *PLoS Genet*. 5:e1000685.

70) Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, Birkedal-Hansen H, Bartlett JD (2002). Enamelysin (matrix metalloproteinase 20) -deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem*. 277:49598-604.

71) Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC, Bartlett JD, Simmer JP (2008). Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem*. 389:695-700.

72) Shin M, Hu Y, Tye CE, Guan X, Deagle CC, Antone JV, Smith CE, Simmer JP, Bartlett JD (2014). Matrix metalloproteinase-20 over-expression is detrimental to enamel development: a Mus musculus model. *PLoS One*. 9:e86774.

73) Horvath JE, Ramachandran GL, Fedrigo O, Nielsen WJ, Babbitt CC, St Clair EM, Pfefferle LW, Jernvall J, Wray GA, Wall CE (2014). Genetic comparisons yield insight into the evolution of enamel thickness during human evolution. *J Hum Evol*. 73:75-87.

74) Bartlett JD, Simmer JP (1999). Proteinases in developing dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med*. 10:425-41.

75) Kim JW, Simmer JP, Hart TC, Hart PS, Ramaswami MD, Bartlett JD, Hu JC (2005). MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturation

amelogenesis imperfecta. *J Med Genet*. 42:271-5.

76) Bartlett JD, Simmer JP, Xue J, Margolis HC, Moreno EC (1996). Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ. *Gene*. 183:123-8.

77) Turk BE, Lee DH, Yamakoshi Y, Klingenhoff A, Reichenberger E, Wright JT, Simmer JP, Komisarof JA, Cantley LC, Bartlett JD (2006). MMP-20 is predominately a tooth-specific enzyme with a deep catalytic pocket that hydrolyzes type V collagen. *Biochemistry*. 45:3863-74.

78) Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L (2002). The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res*. 81:603-7.

79) Syggelos SA, Aletras AJ, Smirlaki I, Skandalis SS (2013). Extracellular matrix degradation and tissue remodeling in periprosthetic loosening and osteolysis: focus on matrix metalloproteinases, their endogenous tissue inhibitors, and the proteasome. *Biomed Res Int*. 2013:230805.

80) Trivedi V, Boire A, Tchernychev B, Kaneider NC, Leger A J, O'Callaghan K, Covic L, Kuliopulos A (2009). Platelet matrix metalloprotease-1 mediates thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic ligand site. *Cell*. 137:332-43.

81) Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT (2010). Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod.* 36: 475-81.

82) Lacruz RS, Smith CE, Smith SM, Hu P, Bringas P Jr, Sahin-Tóth M, Moradian-Oldak J, Paine ML (2011). Chymotrypsin C (caldecrin) is associated with enamel development. *J Dent Res*. 90:1228-33.

83) Takeshita S, Kaji K, Kudo A (2000). Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *J Bone Miner Res*. 15:1477-88.

84) Gordon S (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 3:23-35.

85) Murray PJ, Wynn TA (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 11:723-37.

86) Rosa V, Zhang Z, Grande RH, Nör JE (2013). Dental pulp tissue engineering in full-length human root canals. *J Dent Res*. 92:970-5.

87) Verma K, Bains R, Bains VK, Rawtiya M, Loomba K, Srivastava SC (2014). Therapeutic potential of dental pulp stem cells in regenerative medicine: An overview. *Dent Res J*. 11:302-8.

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

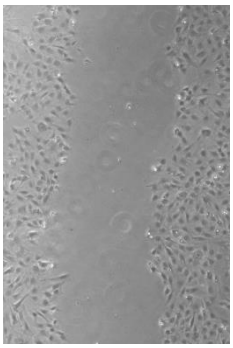
（n=6）

MMP1、MMP9、MMP13およびMMP20により生成された分解DMCsでは有意にDentin bridgeの誘導が認められた。中でも、MMP20により生成された分解DMCsが最も良好なDentin bridgeが認められた。同一色で示される群間で有意差は認められないことを示す(Kruskal-Wallis test, Steel-Dwass test, α=0.05)

96穴プレートにRPPCsを播種し、コンフルエントまで培養

10 μg/ml mitomycin-C 含有 α-MEMを添加

37 ℃　1時間



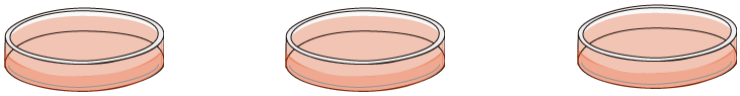
ピペットチップにて傷を作成

PBSにて洗浄

1%FBS
+
0.01~1 μg/ml
分解DMCs

1%FBS
+
0.01~1 μg/ml
非分解DMCs

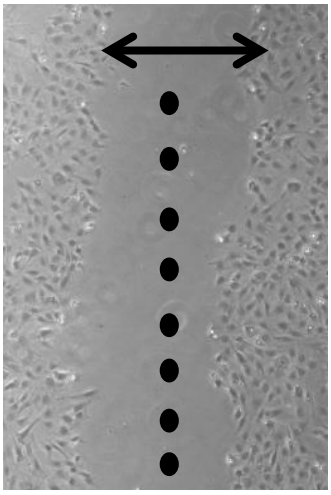
1% FBS



(n=3)

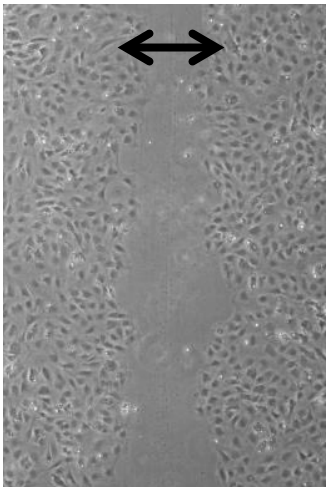
36時間

a



0h

b

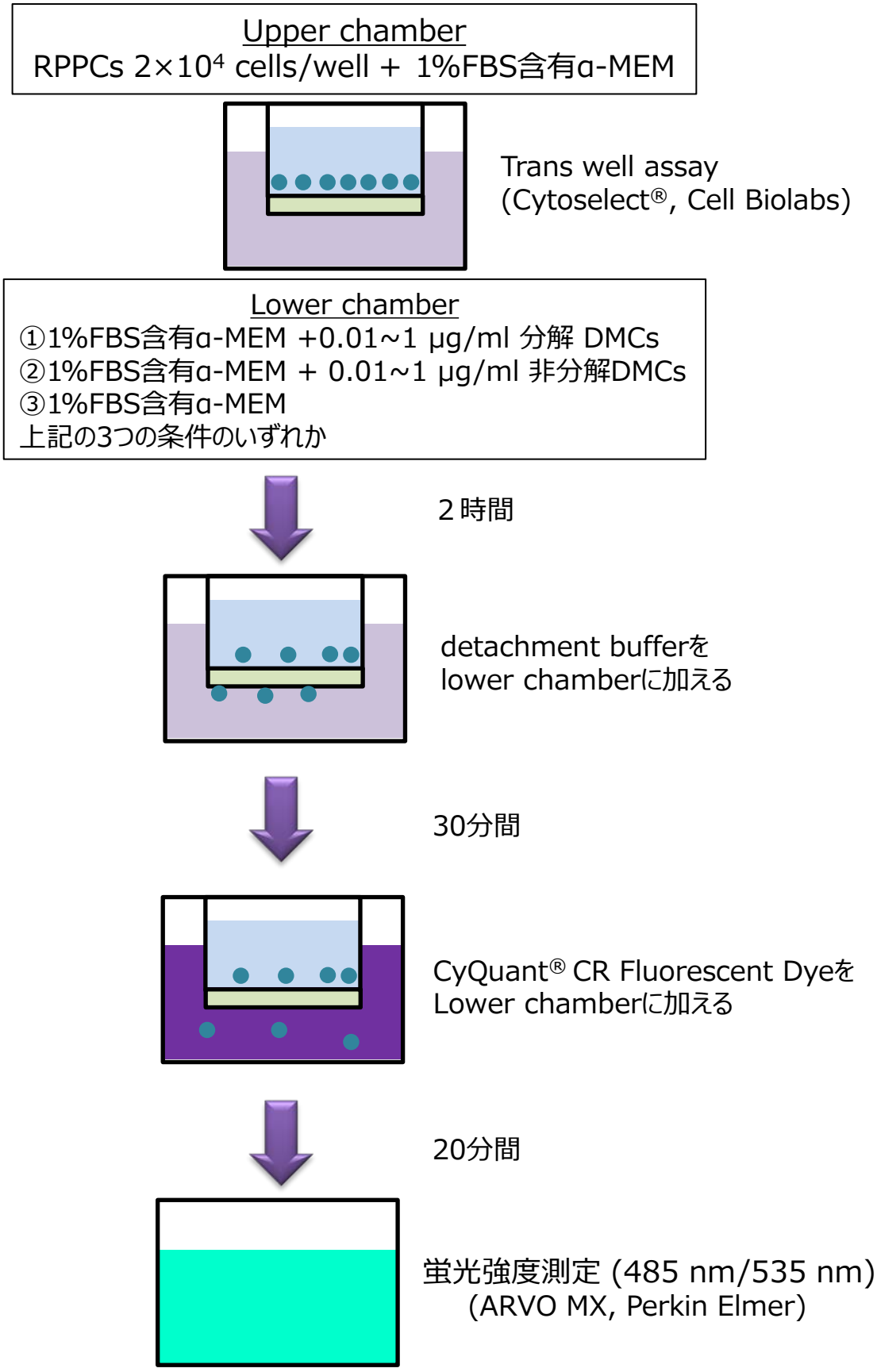


36h

顕微鏡像の画像解析
(Image J (NIH))

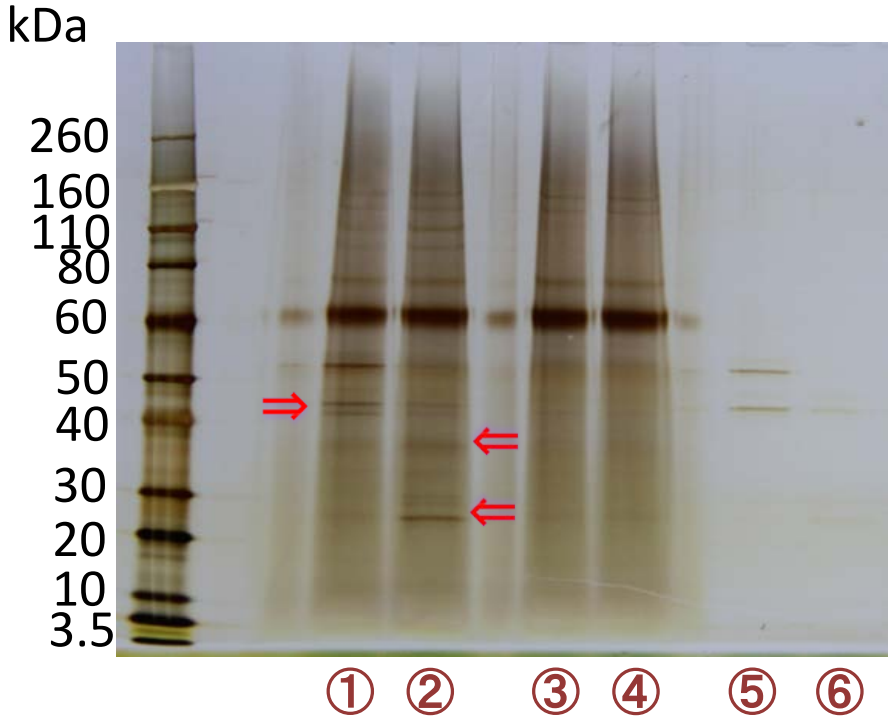
a-b=移動量
画像上の8点について測定し,
平均値算出

図1　細胞遊走能の評価 Scratch wound assay

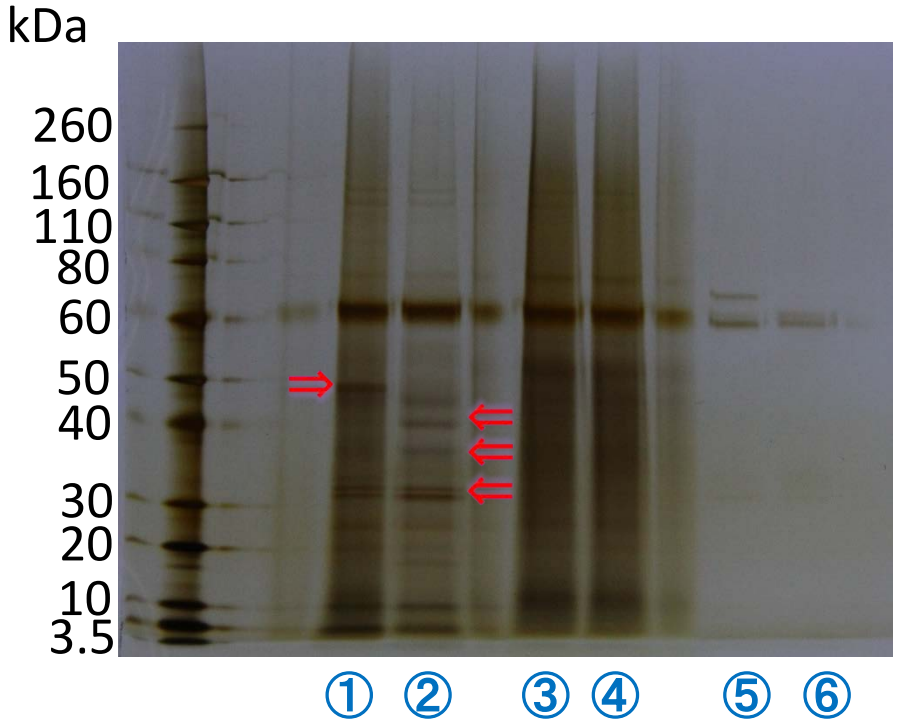


(n=8)

図2 細胞走化性の評価 Trans well assay



A MMP1



B MMP2

図3 MMP分子により分解されたDMCsのタンパクプロファイル (SDS-PAGE)

MMP分子による分解DMCsのタンパクプロファイルをSDS-PAGEと銀染色をおこない観察した結果を示す。①分解DMCs (反応時間1h)、② 分解DMCs (反応時間24h)、③非分解DMCs (反応時間1h)、④非分解DMCs (反応時間24h)、⑤MMP単体 (反応時間1h)、⑥MMP単体 (反応時間24h) を示す。矢印で示すようにMMP分子によりDMCsは分解を受けること、また反応時間が1hに比べて24hの方がより分解が進むことが観察された。

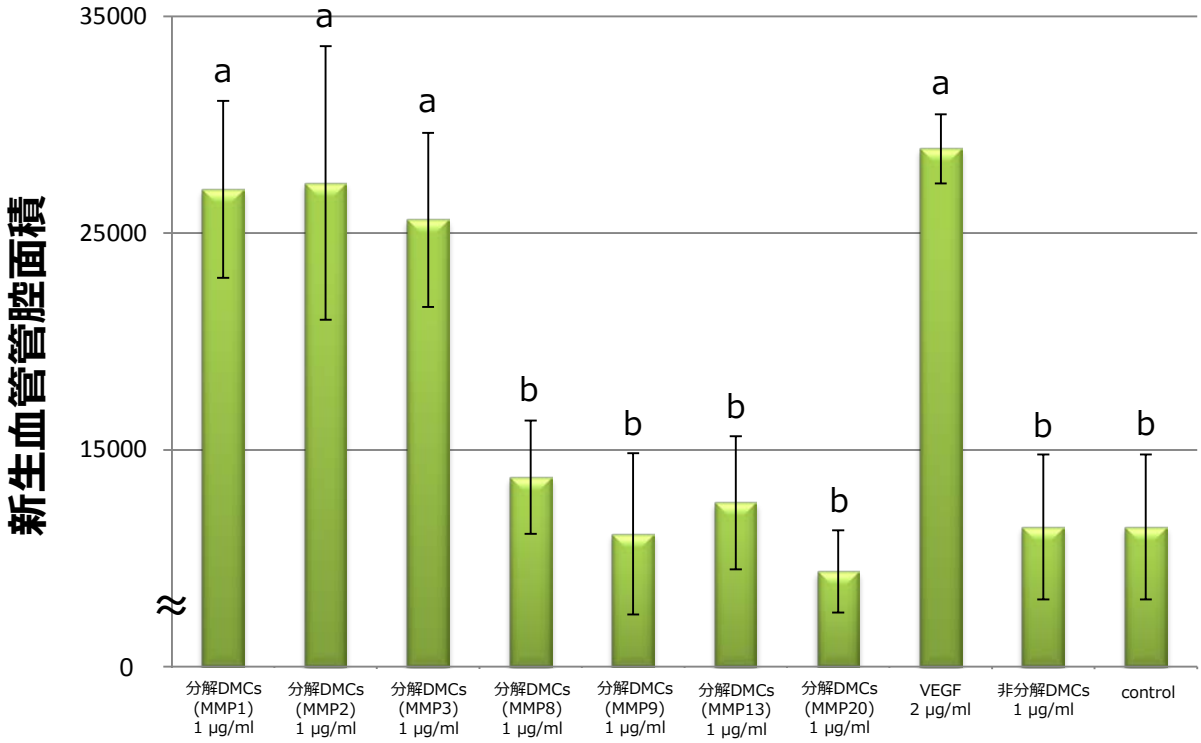
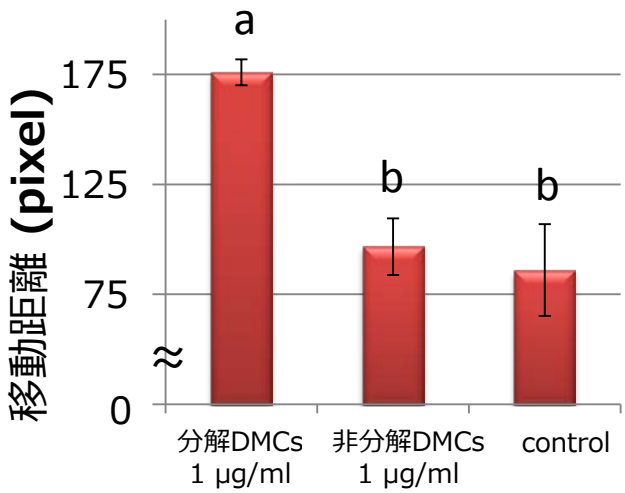
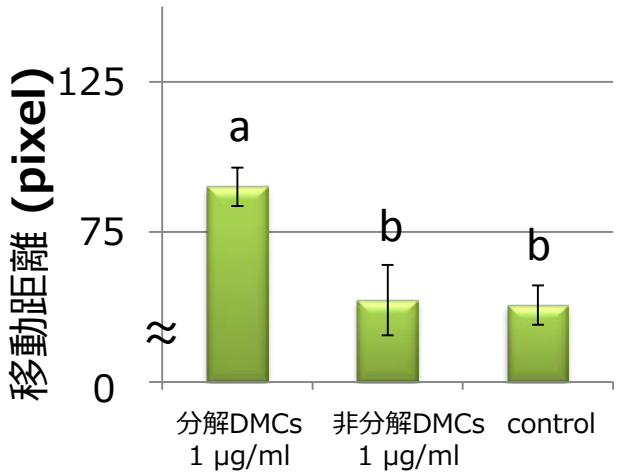


図4 血管新生能の評価

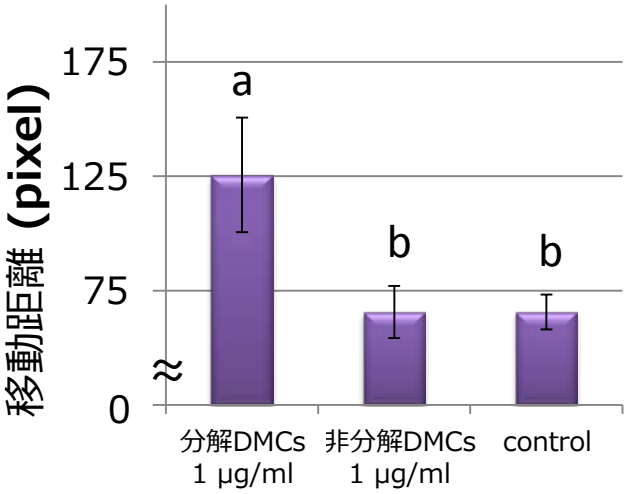
MMP分子による分解DMCs (0.01~1 μg/ml) が血管新生能に与える影響を検討した。MMP1、MMP2、MMP3により生成された1 μg/mlの分解DMCsおよびVEGFは血管新生を促進した。他のMMP分子による分解DMCsは血管新生を促進しなかった。同一文字 (a, b)で示された群間に有意差はないことを示す (One way ANOVA, Tukey-Kramer test, α=0.05) 。



A MMP1



B MMP3



C MMP9

図5 細胞遊走能の評価

MMP分子による分解DMCs (0.01~1 μg/ml) 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。他のMMP分子による分解DMCsは細胞遊走を促進しなかった。
同一文字 (a, b) で示された群間に有意差がないことを示す (One way ANOVA, Tukey-Kramer test, α=0.05）。

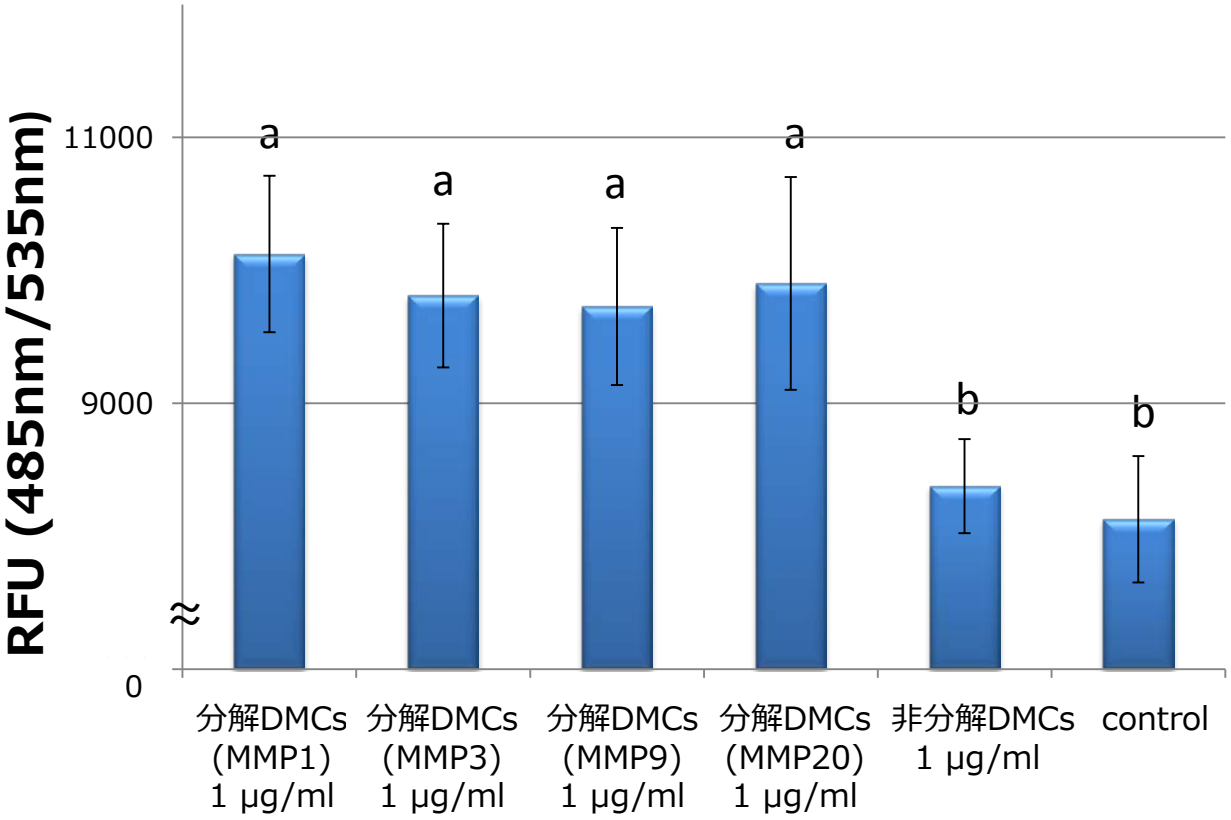


図6 細胞走化性の評価

MMP分子による分解DMCs (0.01~1 μg/ml) が細胞走化性に与える影響を検討した。MMP1、MMP3、MMP9およびMMP20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。他のMMP分子による分解DMCsは走化性を促進しなかった。同一文字 (a, b)で示された群間に有意差がないことを示す (One way ANOVA, Tukey-Kramer test, α=0.05）。

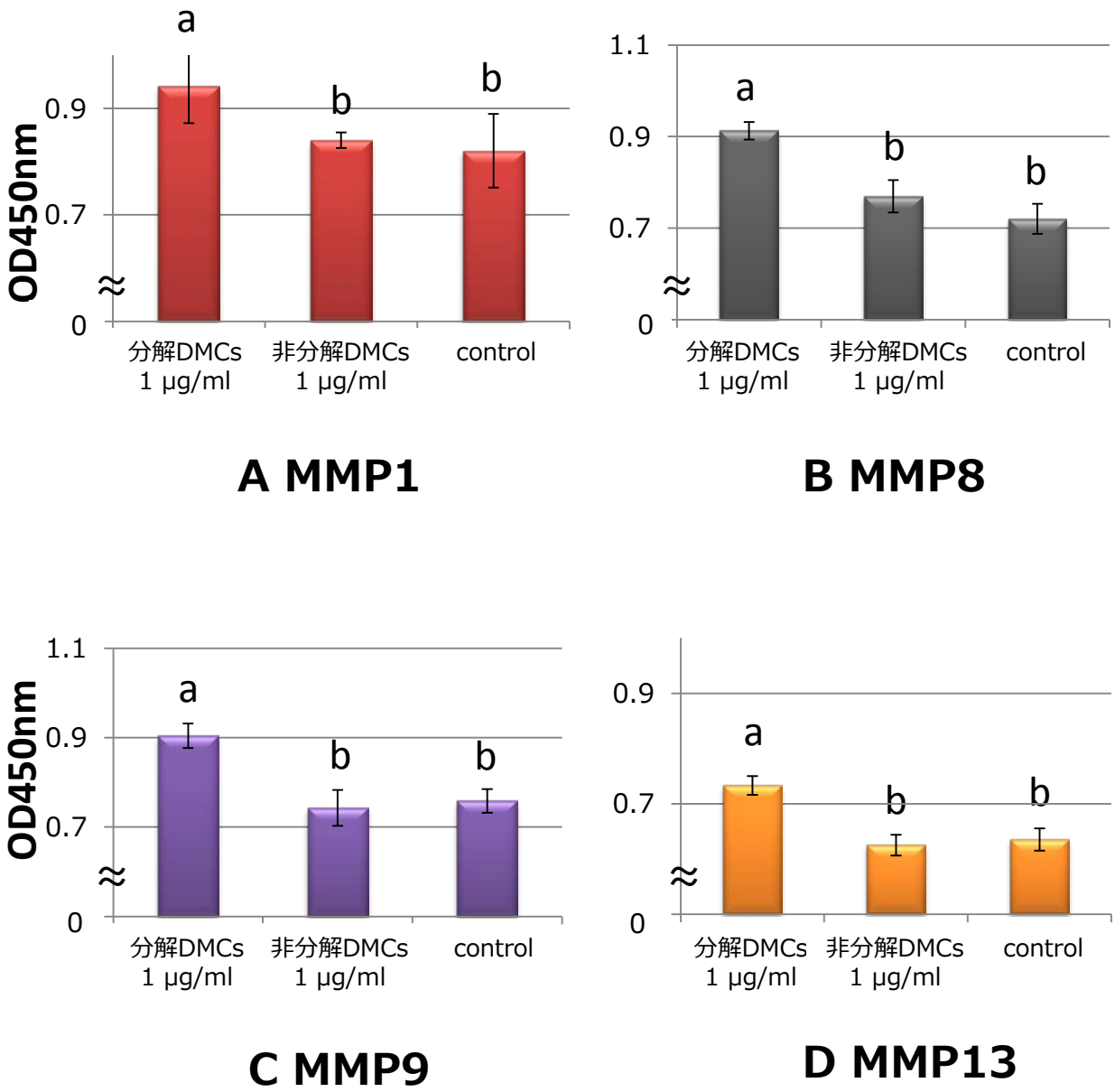


図7 細胞増殖能の評価

MMP分子による分解DMCs (0.01~1 μg/ml)が細胞増殖能に与える影響を検討した。MMP1 (A)、MMP8 (B) 、MMP9 (C)およびMMP13 (D)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。他のMMP分子による分解DMCsは細胞増殖を促進しなかった。同一文字 (a,b) で示された群間に有意差がないことを示す (One way ANOVA, Tukey-Kramer test, α=0.05）。

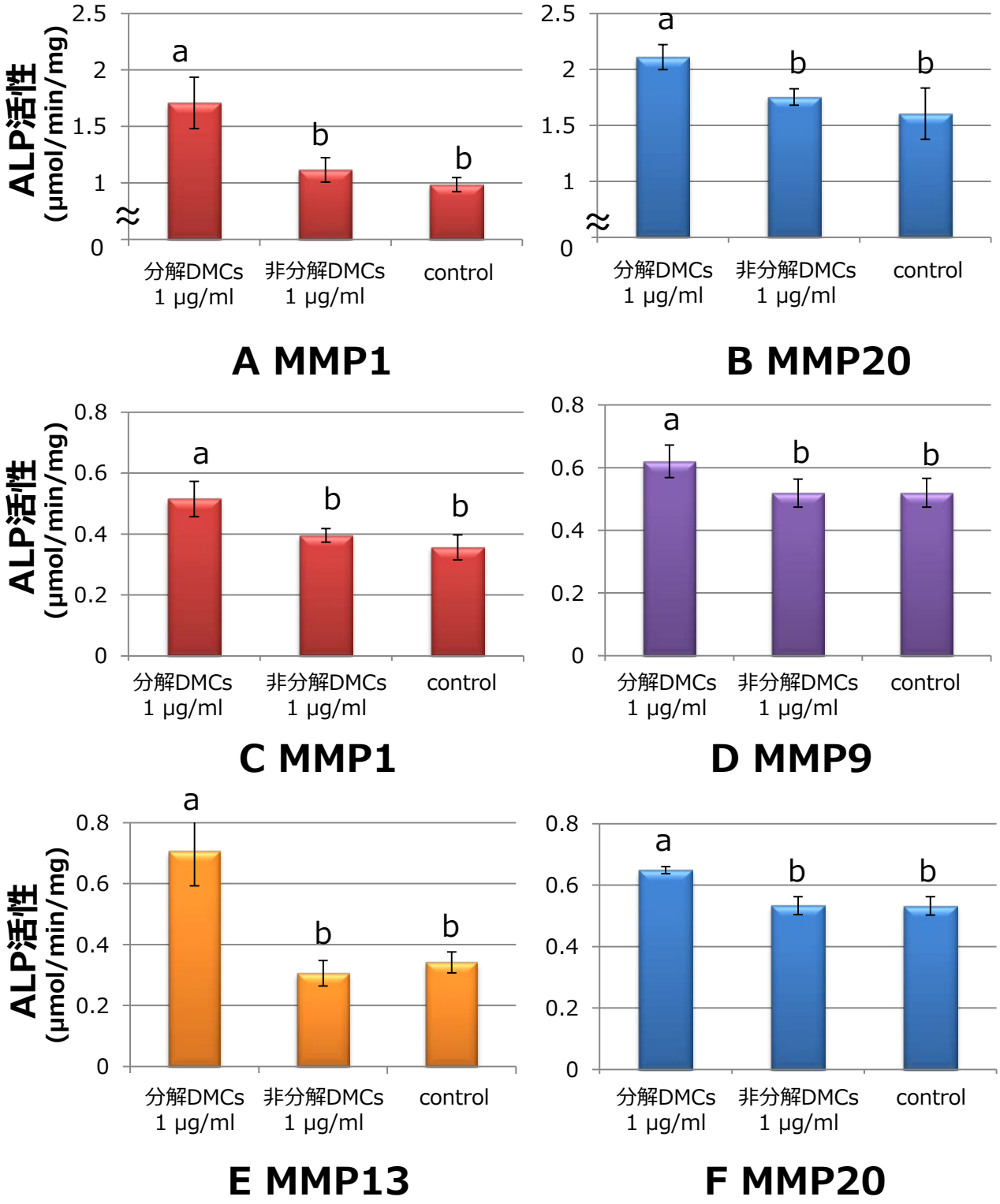


図8 ALP (Alkaline Phosphatase)活性の評価

MMP分子による分解DMCs (0.01~1 μg/ml)が細胞分化能に与える影響を用いて検討した。培養7日目ではMMP1 (A)およびMMP20 (B) により生成された1 μg/mlの分解DMCsはALP活性を促進した。培養14日目ではMMP1 (C)、MMP20(E)に加え、MMP9 (D)およびMMP13 (E)により生成された分解DMCsもALP活性を促進した。他のMMP分子による分解DMCsはALP活性を促進しなかった。同一文字 (a,b)で示された群間に有意差がないことを示す (One way ANOVA, Tukey-Kramer test, α=0.05)。

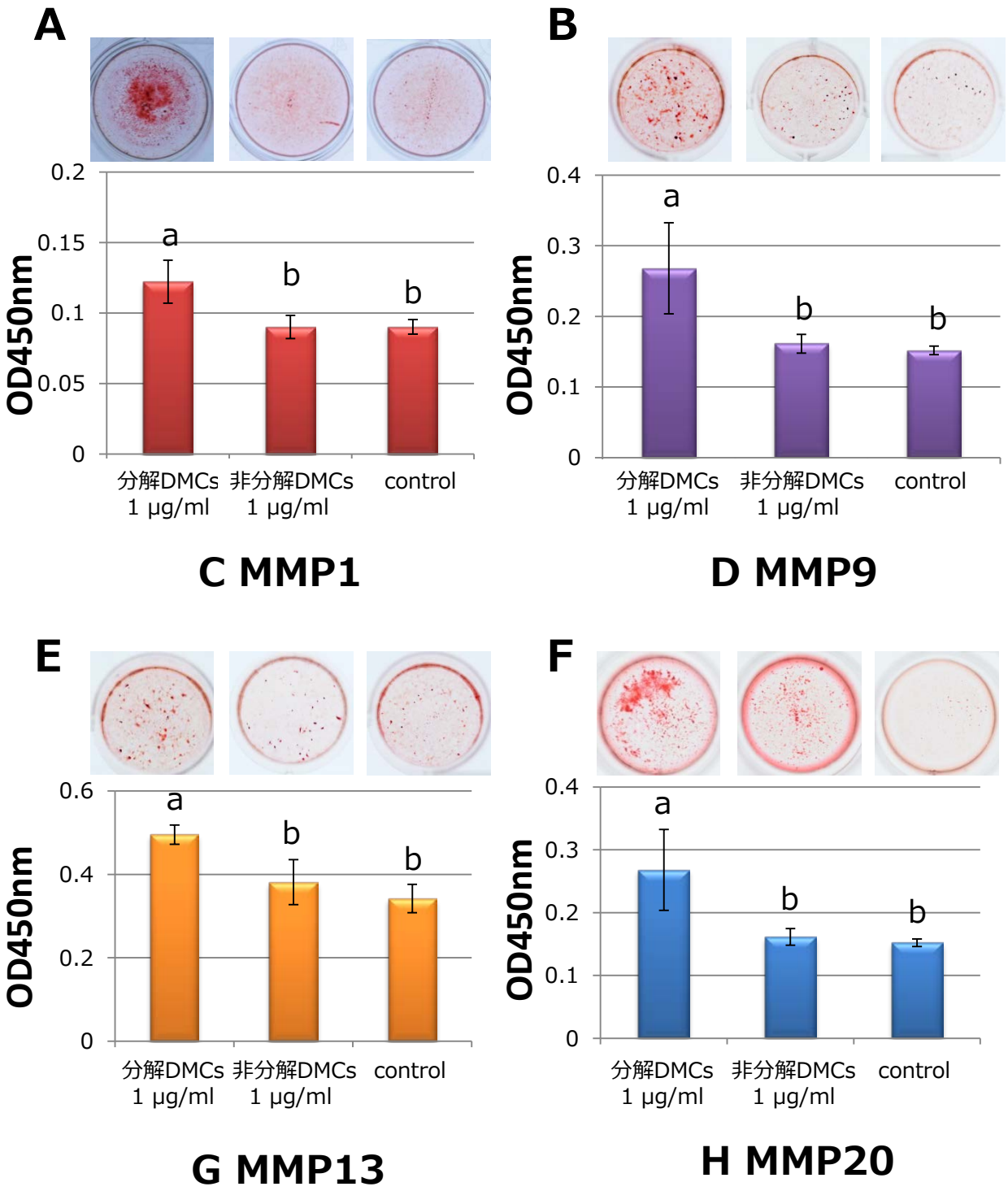


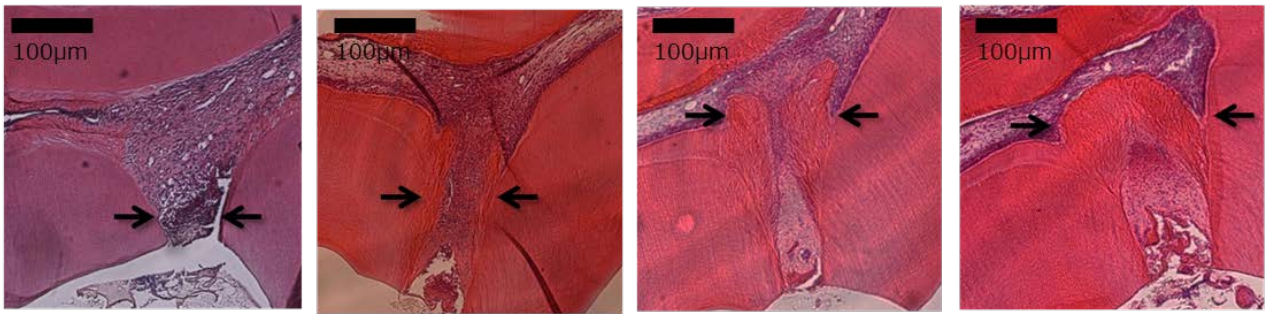
図9 石灰化能の評価

MMP分子による分解DMCs (0.01~1 μg/ml)が石灰化能に与える影響を評価した。MMP1 (A)、MMP9 (B)、MMP13 (E)および、MMP20 (F)によるアリザリンレッド染色像を示す。MMP1 (C)、MMP9 (D)、MMP13 (G)およびMMP20 (H)による1 μg/mlの分解DMCsは石灰化能を促進した。他のMMP分子による分解DMCsは石灰化を促進しなかった。同一文字 (a,b)で示された群間に有意差がないことを示す (One way ANOVA, Tukey-Kramer test,α=0.05)。

図10 *in vitro*の実験のまとめ

MMP1、MMP2およびMMP3による分解DMCsは血管新生能を促進した。
MMP1、MMP3、MMP9、およびMMP20による分解DMCsは細胞遊走能を促進した。
MMP1、MMP8、MMP9およびMMP13による分解DMCsは細胞増殖を促進した。
MMP1、MMP9、MMP13およびMMP20による分解DMCsは分化能および石灰化能を促進した。

-組織学的評価基準-	
Grade	Dentin bridge形成
0	Dentin bridge形成は認めない
1	一部dentin bridge形成を認める (dentin bridge形成量が露髄部の1/3を占める)
2	不完全な dentin bridgeの形成を認める (dentin bridge形成が露髄部の2/3を占める)
3	完全なdentin bridgeの形成を認める (露髄部を完全に覆う)



Grade 0　Grade 1　Grade 2　Grade 3

図11　第三象牙質形成に関する病理組織学的評価基準

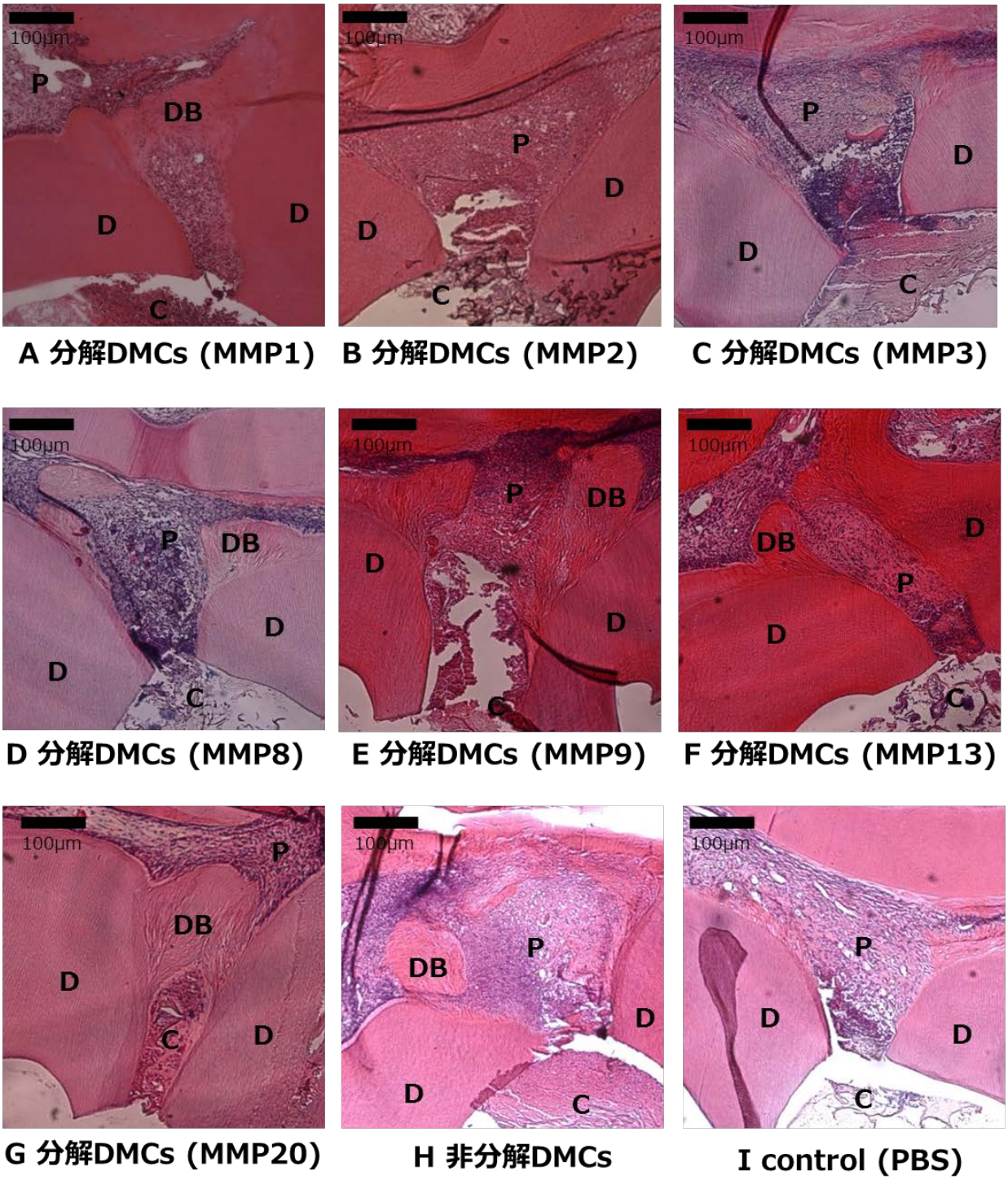


図12 直接覆髄後4週間で形成された第三象牙質の病理組織学的評価

MMP分子による分解DMCsを用いて直接覆髄を行った4週間経過後のH-E染色像を示す。C=Cavity, DB=Dentin Bridge, P=Pulp, D=Dentin

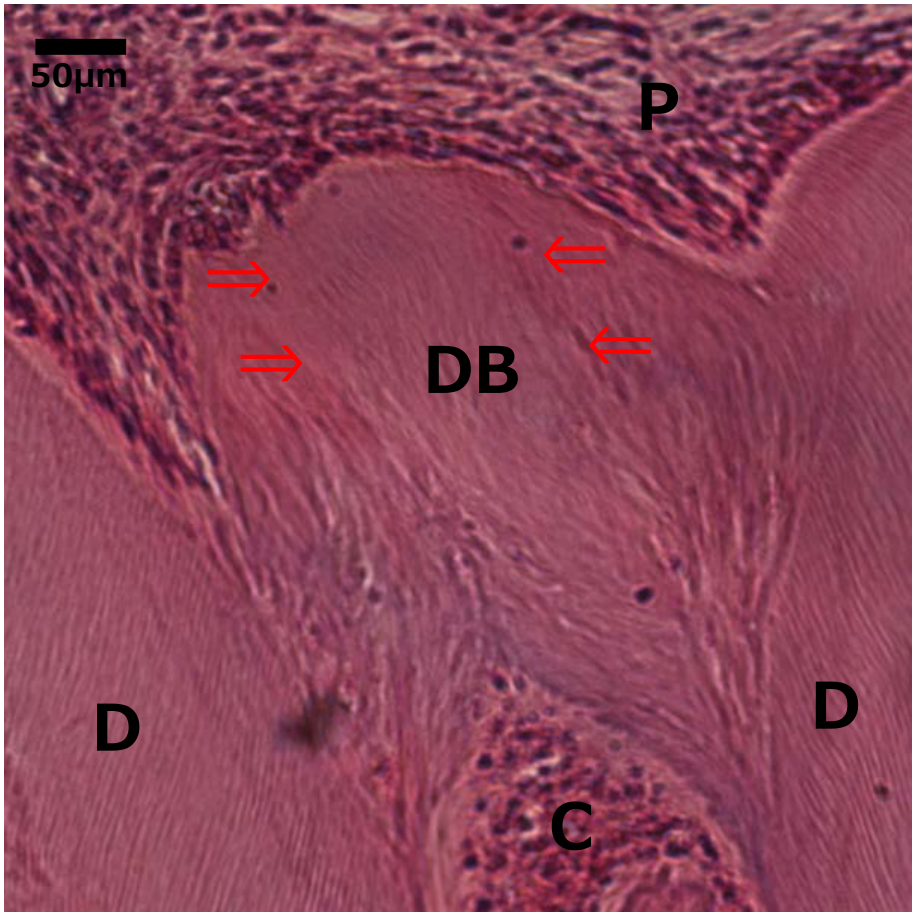


図13 MMP20によって分解されたDMCsにて直接覆髄後4週間で形成された第三象牙質形成の病理組織学的評価

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

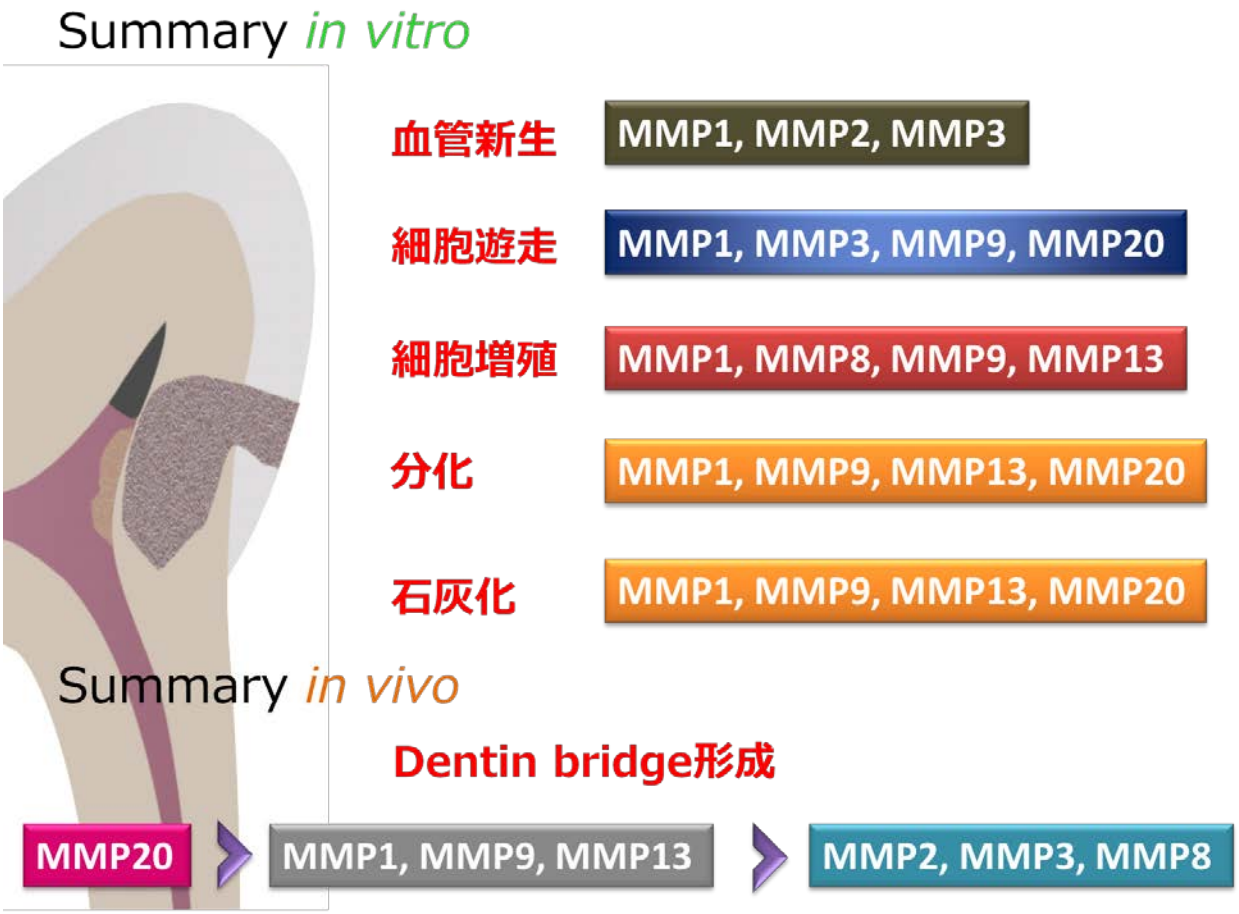


図14 *In vitro* と *in vivo*の実験のまとめ

*In vivo*の実験より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誘導した。また、*in vitro*の実験結果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。