

| | |
|--------------|---|
| 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 | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (岡本 基岐)

論文題名

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

【研究目的】

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、直接覆髄剤として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が用いられているが、このような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くない。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から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が、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、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少なく、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、現在使用さ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いため、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には、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒メカニズムの解明とそれに基づく生物学的な覆髄剤の開発が必要であると考えられる。

近年、骨や腎臓などの全身の組織において、細胞外基質 (Extracellular matrix: ECM) が酸や酵素によって分解を受け、分解されたECMによって組織の創傷治癒が促進されることが多く報告されている。う蝕に罹患した象牙質においても、歯髄にとってのECMと考えられる象牙質基質 (Dentin matrix components: DMCs) が他の組織のECMと同様に酸や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。また、これまでに窩洞形成後の象牙質-歯髄複合体の創傷治癒にMatrix metalloproteinase (MMP) 分子が関わっていることが報告されているが、その詳細は明らかとなっていない。

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*で検討をおこなった。

【材料および方法】

I. 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. 象牙質基質の精製とMMP分子による分解

ヒト象牙質粉末をプロテアーゼ阻害剤含有10% EDTA溶液にて脱灰後、上清を回収し、透析、凍結乾燥したものを非分解DMCsとした。象牙質-歯髄複合体に存在が報告されているMMP分子 (MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP13およびMMP20) と得られた非分解DMCsを37°Cで24時間反応させて分解DMCsを作製した。分解タンパクのプロファイルはSDS-PAGEにて観察した。なお、ヒト象牙質由来試料は英国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. ラット歯髄初代培養細胞の調製と培養

6週齢雄性Wistar系ラットの上下顎切歯から歯髄を採取し、20% FBSと抗生物質を含む α -MEM中にて培養をおこない、10日後にTrypsin-EDTA溶液処理をした後、付着細胞を回収した。回収した細胞をラット歯髄初代培養細胞 (Rat primary pulp cells: RPPCs) として以下の実験に用いた。なお、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)。

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®を用いて検討した。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞とヒト皮膚線維芽細胞を分解DMCs (0.01~1 μ g/ml) を添加した血管新生専用培地中で11日間共培養後、CD31に対する免疫組織化学的染色をおこない、画像解析にて新生血管管腔面積を定量化し、比較した。

4. 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Scratch wound assayにて検討した。RPPCsをセミコンフルエントに到達するまで培養後、細胞増殖を阻害するmitomycin-Cを1時間作用させ、ピペットチップにて細胞培養皿

底部に傷を作成した。続いて、分解DMCs (0.01~1 µg/ml) を添加した1% FBS含有α-MEM中で36時間培養を行い、傷を作成した直後と36時間培養後の細胞の縁端部間の距離の差を等間隔の8点について測定後、平均値を算出し、比較した。

5. 細胞走化性の評価

分解DMCsが歯髄細胞の遊走能に与える影響をTrans well assay にて検討した。RPPCsをupper chamberに5,000 cells/wellで播種し、lower chamberに分解DMCs (0.01~1 µg/ml) を添加した1% FBS含有α-MEMを加え、培養後、メンブレンを通過してlower chamberに移動した細胞を剥離、蛍光染色を施し、蛍光強度を測定、比較した。

6. 細胞増殖能の評価

RPPCsを10,000 cells/wellで播種し、分解DMCs (0.01~1 µg/ml) を添加した1% FBS含有α-MEM中で5日間培養し、WST-1法にて細胞増殖能を評価した。

7. Alkaline Phosphatase (ALP) 活性の評価

20,000 cells/wellで播種したRPPCsを分解DMCs (0.01~1 µg/ml) を添加したアスコルビン酸とβグリセロリン酸および10% FBS含有α-MEMで、7日間もしくは14日間培養し、ALP活性測定をおこない、評価した。

8. 石灰化能の評価

20,000 cell/wellで播種したRPPCsを分解DMCs (0.01~1 µg/ml) を添加した前項と同じ培地中で21日間培養後、アリザリンレッド染色を施し、石灰化評価キットを用いて定量化することで石灰化能を評価した。

なお上記の3~8の実験において、非分解DMCsを添加したもの、およびDMCs非含有の試料をコントロールとした。

II. 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

9週齢雄性Wistar系ラットに全身麻酔下で左上顎第一臼歯咬合面に#1ラウンドバーで露髄するような窩洞を形成し、洗浄・止血後、分解DMCs (0.01~1 µg/ml) に浸漬させたゼラチンスポンジを用いて直接覆髄後、グラスアイオノマーセメントを充填した。窩洞形成から4週間経過したのちに、4% パラホルムアルデヒド溶液にてラットを灌流固定し、被験歯を上顎骨ごと摘出、10% 胃酸にて脱灰後、脱水、パラフィン包埋し、連続切片を作成、ヘマトキシリン-エオジン染色を施して、形成された第三象牙質について病理組織学的評価を行った。コントロールとして非分解DMCsおよびPBSを用いて直接覆髄をおこなったものを用いた。

【結果】

I. 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. MMP1、MMP2およびMMP3で分解されたDMCsによって血管新生能が促進された。
2. MMP1、MMP3およびMMP9で分解されたDMCsによって細胞遊走能が促進された。
3. MMP1、MMP3、MMP9およびMMP20で分解されたDMCsによって走化性が促進された。
4. MMP1、MMP8、MMP9およびMMP13で分解されたDMCsによって細胞増殖能が促進された。
5. MMP1、MMP9、MMP13およびMMP20で分解されたDMCsによってALP活性が促進された。
6. MMP1、MMP9、MMP13およびMMP20で分解されたDMCsによって石灰化能が促進された。

II. 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

MMP1、MMP9、MMP13およびMMP20による分解DMCsはコントロールに比べて第三象牙質の形成を促進した。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形成能を示し、形成された第三象牙質には細管構造を有していることが観察された。

【考察と結論】

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の実験より、MMP分子により分解されたDMCsは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。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in vivoの実験をおこなった結果、MMP1、MMP9、MMP13およびMMP20で分解されたDMCsを用いて覆髄した場合、第三象牙質形成が促進されることがわかった。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、歯髄の創傷治癒をもっとも促進していることが明らかとなった。

以上の結果は、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒メカニズムの一部を解明し、その治癒機転に基づく覆髄材開発への端緒となるものである。

論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 (岡 本 基 岐) | | | |
|--|-----|-----|-------|
| | (職) | 氏 名 | |
| 論文審査担当者 | 主 査 | 教授 | 林 美加子 |
| | 副 査 | 教授 | 豊澤 悟 |
| | 副 査 | 准教授 | 北村 正博 |
| | 副 査 | 准教授 | 橋本 正則 |
| 論文審査の結果の要旨 | | | |
| <p>本研究は、象牙質に内在しているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 分子によって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を評価したものである。</p> <p>その結果、MMP 分子により分解された象牙質基質は、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、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 分子よりも象牙質-歯髄複合体の創傷治癒を有意に促進することがわかった。</p> <p>以上の研究成果は、第三象牙質の形成メカニズムの一端を明らかとし、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につながるものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。</p> | | | |