



Title	象牙質－歯髄複合体の創傷治癒を促進する象牙質基質分解産物の同定ならびに機能解析
Author(s)	小道, 俊吾
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61674
rights	
Note	

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 (小道 俊吾)

論文題名

象牙質-歯髄複合体の創傷治癒を促進する象牙質基質分解産物の同定ならびに機能解析

【研究目的】

う蝕の進行や外傷、窩洞形成時の偶発的露髄が生じた際に、歯髄の保護を目的としておこなう直接覆髄に用いる薬剤については、これまでに様々な研究が存在するが、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒機構が未だ完全には解明されていないことから、そのメカニズムに基づく真の生物学的な覆髄剤は存在しない。

傷害を受けた全身の組織において、細胞外基質 (extracellular matrix: ECM) が matrix metalloproteinase (MMP) 分子によって分解を受けることでその生理活性が上昇し、組織の創傷治癒を促進させるという報告がある。一方、象牙質の有機成分である象牙質基質タンパク (dentin matrix components: DMCs) は歯髄細胞にとっての ECM と考えられており、成長因子等の様々な生理活性物質を含有している。全身の組織と同様に、う蝕や外傷などにより象牙質が傷害を受けることで、象牙質中や歯髄組織中で活性化した MMP 分子により DMCs が分解を受け、生じた DMCs 分解産物が歯髄の創傷治癒を促進することが報告されている。この現象は DMCs 分解産物中のタンパクやその断片等が生理活性を持ち、歯髄組織の創傷治癒に影響を及ぼした結果と考えられるが、実際に治癒を促進している分子の詳細については不明である。

そこで本研究では、DMCs 分解産物中における象牙質-歯髄複合体の創傷治癒を促進する分子の同定ならびにその機能解析を *in vitro* と *in vivo* の双方にておこなうことで歯髄創傷治癒メカニズムの一端を明らかとし、さらに生物学的根拠に基づく覆髄剤の開発を目指すことを目的とした。

【材料と方法】

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、その上清を透析、凍結乾燥することにより得られた粉末を象牙質基質タンパク (DMCs) として以下の実験をおこなった。

実験 I. MMP 分子により分解された象牙質基質タンパク中の歯髄創傷治癒促進能を持つ分子の同定

これまでの研究で歯髄創傷治癒を促進することが明らかとなっている、MMP20 による DMCs 分解産物 (digested DMCs: dDMCs) および対照群として未処理の DMCs (untreated DMCs: uDMCs) を用いて以下の実験をおこなった。

1. 逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) を用いた試料の分離ならびに分画試料の回収
2. 得られた分画試料を用いた *in vivo* でのラット直接覆髄実験および マイクロ CT 画像解析と病理組織学的評価による第三象牙質形成促進能を持つ分画のスクリーニング (n = 3)
3. 直接覆髄実験で良好な結果を示した分画がラット歯髄初代培養細胞 (rat primary pulp cells: RPPCs) の増殖、分化、石灰化に与える影響の *in vitro* での評価 (n = 6)
4. 上記の実験で良好な結果を示した分画に含まれる歯髄創傷治癒を促進するタンパクの、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法を用いた同定

実験 II. 同定された分子が象牙質-歯髄複合体および歯髄細胞に与える影響の検討

歯髄の創傷治癒を促進する分子の候補として同定された junction plakoglobin (JUP)、protein S100-A7 (A7)、protein S100-A8 (A8) ならびに prolactin-inducible protein (PIP) を MMP20 と反応させた試料、および対照群として MMP20 単体を用いて以下の実験をおこなった。

1. MMP20 処理後タンパク試料の分解前後のプロファイルについての SDS-PAGE 解析
2. MMP20 処理後タンパク試料を用いた *in vivo* でのラット直接覆髄実験および マイクロ CT 画像解析と病理組織学的評価 (n = 3)
3. 直接覆髄実験で良好な結果を示した MMP20 処理後タンパク試料がラット歯髄初代培養細胞 (RPPCs) の増殖、分化、石灰化に与える影響の *in vitro* での評価 (n = 6)

統計学的有意差については one-way ANOVA および Tukey's test, $\alpha=5\%$ (実験 I -2, 3, 実験 II -3)、または one-way ANOVA および Dunnett's test, $\alpha=5\%$ (実験 II -2) にて検定をおこなった。本研究は英国 Birmingham 大学歯学部 Tooth Bank Ethics Committee (90/H0405/33) および大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会 (23-005-1) の承認下で実施した。

【結果および考察】

実験 I.

1. RP-HPLC 解析により uDMCs と dDMCs それぞれの試料が 14 の分画に分離・回収された。特に、保持時間 90 分付近に両試料間で著しく形態の異なるピークが認められ、これらのピークに uDMCs と dDMCs において異なる分子が含有されていることが示唆された。
2. dDMCs から得られた特定の分画試料を覆髄剤として用いた直接覆髄実験において、同じ保持時間における uDMCs から得られた分画試料および DMCs 非含有試料と比較し第三象牙質形成が有意に促進された (dDMCs: $7.43 \pm 2.12 \times 10^{-2} \text{ mm}^3$, uDMCs: $2.67 \pm 1.92 \times 10^{-2} \text{ mm}^3$, DMCs 非含有: $1.17 \pm 0.51 \times 10^{-2} \text{ mm}^3$, $p<0.05$)。この分画は RP-HPLC 解析において uDMCs と dDMCs 両試料間で形態の異なるピークが観察された分画でもあり、これらのことから、DMCs の分解によって生じた歯髄創傷治癒を促進する分子が dDMCs に特異的に存在していることが示唆された。
3. 実験 I -2 の直接覆髄実験で良好な第三象牙質形成を誘導した dDMCs 由来の分画は uDMCs から得られた分画と比較して、RPPCs の分化と石灰化を有意に促進した ($p<0.05$) が、増殖には影響を与えなかった。
4. LC-MS/MS 解析の結果、31 種類のタンパクが uDMCs と比較し dDMCs 中に量的に多く含まれており、その中から 4 種類のタンパク (JUP、A7、A8、PIP) が、文献検索からも細胞の様々な機能を促進し創傷治癒に関連する報告があることから、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒を促進する分子の候補として抽出された。

実験 II.

1. 実験 I で同定された候補タンパクを MMP20 処理の有無でプロファイルと比較した SDS-PAGE の結果から、JUP では MMP20 処理後に新たなバンドが観察され、MMP20 の分解基質となる可能性が示された。一方、A7、A8、PIP については MMP20 処理による新たなバンドは観察されなかった。
2. マイクロ CT 画像解析の結果、MMP20 処理後の JUP、A7、PIP を覆髄剤として用いた試料では露髄面を完全に覆う第三象牙質形成が誘導された。また病理組織学的評価の結果、第三象牙質の窩洞側に生細胞が認められなかったことからこれらの試料の露髄面の閉鎖は確認された。
3. 実験 II -2 の直接覆髄実験で良好な第三象牙質形成を誘導した MMP20 処理後の JUP、A7、PIP は各試料に含まれる MMP20 と同濃度の MMP20 単体と比較し、RPPCs の分化と石灰化を促進した ($p<0.05$) が、遊走と増殖には影響を与えなかった。

以上の結果から、MMP20 による DMCs 分解の結果、JUP、PIP ならびに A7 の全長タンパク、またはタンパクの断片が遊離し、歯髄細胞の分化および石灰化を促進することにより第三象牙質の形成を促進することが示され、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒メカニズムに一端が明らかとなった。本研究で得られた知見を応用することで象牙質-歯髄複合体の創傷治癒機構に基づいた生物学的覆髄剤の開発へと展開できれば、歯髄の保存にとどまらず歯の保存、ひいては口腔健康の保全に大きく貢献できるものと期待される。

【結論】

象牙質基質分解産物の質量分析および機能解析をおこなうことで、MMP20により分解された象牙質基質タンパク中に存在する junction plakoglobin、protein S100-A7 ならびに prolactin-inducible protein の全長タンパクあるいはこれらのタンパクの断片が象牙質-歯髄複合体の創傷治癒を促進することが明らかとなり、第三象牙質形成メカニズムの一端が解明された。今後は、同定されたタンパクの機能ドメインや関連するシグナル経路を明らかにし、覆髄剤への臨床応用へと展開する予定である。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (小 道 俊 吾)			
	(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	野村 良太
	副 査	講師	山田 聡
論文審査の結果の要旨			
<p>本研究は、matrix metalloproteinase (MMP) によって分解された象牙質基質タンパク中に存在する象牙質－歯髄複合体の創傷治癒を促進する分子を同定し、それらの分子が歯髄に与える影響を詳細に検討したものである。</p> <p>その結果、MMP 分子による分解をうけた象牙質基質から junction plakoglobin、protein S100-A7 ならびに prolactin-inducible protein の 3 種のタンパク全長あるいは断片が遊離し、歯髄細胞の分化および石灰化機能を促進することによって、第三象牙質形成を伴う象牙質－歯髄複合体の創傷治癒を促進することが明らかとなった。</p> <p>以上の研究成果は、象牙質－歯髄複合体の創傷治癒メカニズムに基づく直接覆髄剤を開発するうえで重要な知見を提供するものであり、本研究は博士（歯学）の学位に値するものと認める。</p>			