The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	象牙質ー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

学　位　論　文

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

大阪大学大学院歯学研究科
口腔科学専攻
口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)
(指導教員：林 美加子教授)

小道 俊吾

本論文の一部は、第 143 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (2015 年 11 月、東京) において発表した。

目次

Ⅰ．諸言

Ⅱ．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

1) 目的

2) 材料および方法

① 象牙質基質タンパク (DMCs) の精製と MMP 分子による分解

② 逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) 解析と DMCs 分画試料の作製

③ DMCs 分画試料を用いた直接覆髄実験

④ 直接覆髄実験のマイクロ CT 画像解析

⑤ 直接覆髄実験の病理組織学的評価

⑥ ラット歯髄初代培養細胞 (RPPCs) の調整と培養

⑦ DMCs 分画試料が RPPCs の増殖能に与える影響 (*in vitro*)

⑧ DMCs 分画試料が RPPCs の分化能、石灰化能に与える影響 (*in vitro*)

⑨ DMCs 分画試料に含まれる歯髄創傷治癒を促進する分子の同定

⑩ 統計学的解析

3) 結果

① RP-HPLC による DMCs の分離および分画の回収

② DMCs 分画試料を用いた直接覆髄実験

③ DMCs 分画試料が RPPCs の細胞機能に与える影響 (*in vitro*)

④ DMCs 分画試料に含まれる歯髄創傷治癒を促進する分子の同定

4) 小括

Ⅲ．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

1) 目的

2) 材料および方法

① 候補タンパク試料の調整

② 候補タンパクのプロファイル解析

③ 候補タンパク試料を用いた直接覆髄実験

④ 候補タンパク試料が RPPCs の細胞機能に与える影響（*in vitro*）

⑤ 統計学的解析

3) 結果

① 候補タンパクのプロファイル解析

② 候補タンパク試料を用いた直接覆髄実験

③ 候補タンパク試料が RPPCs の細胞機能に与える影響（*in vitro*）

4) 小括

Ⅳ．考察

Ⅴ．結論

Ⅵ．謝辞

Ⅶ．参考文献

Ⅷ．図表

Ⅰ．諸言

象牙質－歯髄複合体は自己修復・再生能を持つことが知られている[1]。う蝕の進行により象牙質が侵襲を受けると、歯髄組織最外層の象牙芽細胞へ刺激が伝播される。これらの侵害刺激に対して歯髄組織では、生存した象牙芽細胞や歯髄幹細胞から新たに分化した象牙芽細胞様細胞により第三象牙質が形成され、象牙質－歯髄複合体という生理学的構造を修復、あるいは再生する創傷治癒機構が発揮される[2−4]。

歯科臨床においては、う蝕の進行や外傷、また窩洞形成時の偶発的露髄が生じた際に、象牙質－歯髄複合体の創傷治癒機構を賦活し、歯髄を修復・保護することを目的として直接覆髄がおこなわれる。用いられる直接覆髄剤としては、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が国内外で広く使用されているが、その長期的な成功率は 60 － 70 %[5−7] 程度と報告されており、まだまだ改善の余地はあると考えられている。より高い成功率を求めて様々な新しい材料を用いた覆髄剤の開発がおこなわれているが[8-11]、現時点で象牙質－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。

全身の組織における細胞外基質 (extracellular matrix: ECM) には成長因子やサイトカインを始めとした様々な生理活性を持つタンパクが含まれていることが知られており[12, 13]、組織が傷害を受けるとタンパク分解酵素である matrix metalloproteinase (MMP) 分子の発現が上

昇し、ECM の分解が生じる[14−19]。その結果、ECM 中に含まれる生理活性物質や、ECM の分解産物・断片が遊離し、当該組織を構成する細胞の機能に影響を与えて、組織の創傷治癒が促進されることが報告されている[20−22]。

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) は原生象牙質の発生過程において象牙芽細胞から分泌されたタンパクであり、DMCs は歯髄細胞にとっての ECM と考えられている[27]。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、本来は不活性型として存在している MMP 分子が活性化され、さらに歯髄中でも MMP 分子の発現が上昇することにより DMCs が分解を受け[23−26]、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[23, 27]。

DMCs 分解産物が歯髄創傷治癒を促進するメカニズムの一つとして、全身組織における ECM 分解産物が創傷治癒を促進するのと同様に、生理活性物質を持つ DMCs 分解産物の遊離が寄与している可能性が考えられる。DMCs は生理活性物質の貯蔵庫として機能することがこれまでに知られており[1]、骨基質や象牙質基質の産生および石灰化を調節する機能を持つ非コラーゲンタンパクファミリーである small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins[28, 29] や、transforming growth factor (TGF) beta 1、bone morphogenetic protein (BMP) 2、interleukin-1 等の成長因子やサイトカインの存在も報告されている[30–33]。MMP 分子による DMCs の分解によりこれらの生理活性を持つタンパクの遊離に加え、生理活性をもつタンパクの断片が遊離する可能性もある。象牙質の発生過程において象牙芽細胞が分泌する dentin

matrix protein-1 は BMP1 による酵素分解を受けることで象牙質の石灰化を促進し[34]、そのタンパク断片であるアミド末端 とカルボキシル末端は異なる活性を示すことが知られている[35, 36]。また、類似した報告が dentin sialophosphoprotein のタンパク断片についても存在し[37−39]、様々なタンパクやその断片が歯髄の創傷治癒促進に関与していると考えられる。

これまでの歯髄創傷治癒メカニズムを検討した一連の先行研究において、MMP20 で分解を受けて生じた DMCs 分解産物が *in vitro* において歯髄細胞の遊走・分化・石灰化能を活性化し、さらに *in vivo* におけるラットを用いた直接覆髄実験にて露髄面を完全に覆う第三象牙質を誘導し、その第三象牙質は細管構造も有していたことから、MMP20 による DMCs 分解産物が象牙質－歯髄複合体の創傷治癒を促進することが明らかとなった[40]。これらより、歯において特異的に発現する MMP 分子として知られる MMP20 が[41, 42]、傷害を受けた象牙質において DMCs の分解を引き起こし、生理活性物質の遊離を惹起することで、象牙質－歯髄複合体の創傷治癒の一端を担っていることが示唆された。しかし、MMP20 の分解基質についてはいまだ詳細な報告はなく、さらに MMP20 により生じた DMCs 分解産物中の分子の詳細についてもこれまでに研究をおこなった前例はない。

そこで本研究では、MMP20 により生じた 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。

Ⅱ. MMP 分子により分解された象牙質基質タンパクに含まれる歯髄創傷治癒促進能を持つ分子の同定

---

1) 目的

歯髄創傷治癒を促進することが報告されている MMP 分子による象牙質基質タンパク分解産物を液体クロマトグラフィーにより分画化し、*in vivo* および *in vitro* にて検討することで生理活性を持つ分子を含む分画の抽出を試みた。さらに、抽出した分画のタンパクの質量分析をおこない、その分画中に含まれる歯髄創傷治癒に関わる分子を同定することを目的として以下の実験をおこなった。

2) 材料および方法

① 象牙質基質タンパク (DMCs) の精製と MMP 分子による分解

象牙質基質タンパクの精製、および先行研究にて歯髄創傷治癒促進能が確認された MMP20 による DMCs 分解産物、およびコントロールとして未処理 DMCs を作製した。

DMCs の精製は Tomson らの方法[33]に準じおこなった。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) 含有 10 % EDTA 溶液中で 4°C にて 24 時間反応させた。続いて 3000 rpm で 10 分間遠心分離をおこない、上清を回収後、さらに EDTA

溶液を加えて計 14 日間にわたり同様の操作をおこなった。その後、回収した上清を蒸留水にて透析し、凍結乾燥したものを象牙質基質タンパク (dentin matrix components: DMCs) とした。

得られた DMCs 10 mg を PBS 5 ml 中に溶解させ、37°C にて 24 時間静置した後に濾過したものを未処理 DMCs (untreated DMCs: uDMCs) とし、同様に PBS 中に溶解した DMCs を 50 µg/ml のヒト組み換え MMP20 (フナコシ, 東京) 40 µl と 37°C にて 24 時間反応させた後に濾過したものを DMCs 分解産物 (digested DMCs: dDMCs)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 逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) 解析と DMCs 分画試料の作製

uDMCs と dDMCs に含まれる様々な分子の分離を目的に、逆相高速液体クロマトグラフィー (reverse-phase high-performance liquid chromatography : RP-HPLC) (LC-10ADVP system / SPD-M10A UV/Vis detector; 島津製作所, 京都) を用いて uDMCs と dDMCs のピーク分析および得られたピークの分画回収をおこなった。各試料 50 µl を分離カラム (COSMOSIL PBr Packed Column 4.6 mm I.D. × 250 mm; ナカライテスク, 京都) を用い、0.05 % ギ酸水溶液を移動相として、流速 0.1 ml/min. の条件で UV 検出器にて 100 分間の分析をおこなった。分離された特異的なピークを含む領域については各ピークを含むように、そしてピークを含

まない領域は 10 分毎にフラクションコレクターを用いて試料の回収をおこなった。また、回収された各分画に 0.05 % ギ酸を加え、分画試料の体積を 2.0 ml に調整し以降の実験に用いた。

③ DMCs 分画試料を用いた直接覆髄実験

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：23-005-1)。

これまで先行研究の直接覆髄実験において、覆髄剤として dDMCs を用いた場合に良好な歯髄創傷治癒促進効果が確認されているが [40]、前項で RP-HPLC にて分離された dDMCs の分画のうち、どの分画に第三象牙質形成を促進する分子が含まれているかを調べるため、dDMCs の分画 #1 から #14 を PBS にて希釈し、濃度を 2 % (v/v) とした試料を用いて直接覆髄実験をおこなった。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 (ソムノペンチル; 共立製薬, 東京) (30 mg/kg) の腹腔内注射にて全身麻酔を実施し、その後疼痛緩和のためカルプロフェン (Rimadyl; Pfizer, New York, 米国) (3 mg/kg) の投与をおこなった。処置歯にラバーダム防湿をおこない歯面および周囲をアルコール綿球にて清拭後、窩洞形成は Yoshioka らの報告をもとに以下の方法でおこなった [23]。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、咬合面より歯髄近心髄角に直径 0.06 mm 程度露髄す

るような窩洞を非注水下にて、回転数 1200 rpm で形成した。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、前項で得られた各分画試料およびコントロールとして同じ濃度のギ酸－PBS 溶液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 浸漬させたものを用い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。覆髄から 4 週間経過後に、実験動物をペントバルビタールナトリウムの腹腔内過剰投与により屠殺した後、4 % パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (ナカライテスク) にて灌流固定をおこなった。続いて被験歯を含む上顎骨を摘出し軟組織の除去後、後述のヘマトキシリン－エオジン (H-E) 染色による病理組織学的評価に供した。試料数は各条件につき 3 とした。

続いて、dDMCs の分画を用いた直接覆髄にて良好な第三象牙質形成を認めた分画 #12 と分画 #13 について、MMP20 による DMCs の分解がこれらの第三象牙質形成促進能に必要であるかを調べるため、uDMCs および dDMCs について分画 #12 と分画 #13 を合わせて作成した分画 #12 + #13 を用いて、同様の手法にて直接覆髄実験をおこなった。なお試料数は各条件につき 3 とした。

④ 直接覆髄実験のマイクロ CT 画像解析

直接覆髄から 4 週間経過後の試料に対し、形成された第三象牙質の定量評価を目的にマイクロ CT (R-mCT2; RIGAKU, 東京) を用いた画像解析をおこなった。被験歯の断層撮影を

管電圧 90 kV、管電流 160 μA、スライス幅 5 μm の条件でおこない、撮影により得られたデータに対し、X 軸は上顎第一臼歯の髄床底を通り、Y 軸は頬側根と舌側根の中心を通り、Z 軸は近心根と遠心根の中心を通るように各軸を設定し、XY 平面にて露髄部直下に認められる不透過像を新生第三象牙質とした。原生象牙質と同等の CT 値を第三象牙質抽出の閾値に設定し、2 値化画像から新生第三象牙質の面積を計算した。原生象牙質と新生象牙質の境界線については、後述の H-E 染色像を参考に設定した。各々の新生第三象牙質面積を計測し、全てを合計することで新生第三象牙質の体積を算出した。画像解析ソフトウェアは TRI 3D-BON (RATOK, 東京) を使用した。

⑤ 直接覆髄実験の病理組織学的評価

直接覆髄から 4 週間経過後の試料を灌流固定後、4 % パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にてさらに 12 時間浸漬固定した後に、10 % ギ酸－クエン酸溶液中にて 2 日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、ミクロトーム (RM 2155; Leica, Wetzlar, ドイツ) にて厚さ 5 μm の連続切片を作成したうえで、H-E 染色を行った。第三象牙質および歯髄の病理組織学的評価は光学顕微鏡 (Axioskop 40; Carl Zeiss, Oberkochen, ドイツ) 観察下にておこなった。

⑥ ラット歯髄初代培養細胞 (RPPCs) の調整と培養

RP-HPLC にて分画化され、回収された試料が歯髄細胞の機能に与える影響を *in vitro* にて評価するために、ラット歯髄由来初代培養細胞を用いて実験をおこなった。6 週齢雄性 Wistar 系ラットにペントバルビタールナトリウムの過剰投与 (200 mg/kg) を腹腔内に行い屠殺した。続いて上下顎骨内から切歯を摘出し、歯髄組織を回収した。回収された歯髄組織をメスにて細断し、Trypsin-EDTA (Sigma Aldrich) による処理後、セルストレーナーにより余剰軟組織を除去し、分離された歯髄細胞の集合体を細胞培養プレート (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, 米国) にて培養をおこなった。培養液は 20 % ウシ胎仔血清 (FBS; Sigma Aldrich) および 10μg/ml Penicillin-Streptomycin (Sigma Aldrich) を添加した α-MEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham , 米国) 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、セミコンフルエントになるまで培養をおこない、Trypsin-EDTA 処理により付着細胞として回収されたものをラット歯髄初代培養細胞 (rat pulp primary cells：RPPCs) として以降の *in vitro* の実験に用いた。

⑦ DMCs 分画試料が RPPCs の増殖能に与える影響 (*in vitro*)

覆髄実験 (Ⅱ－結果②) で第三象牙質形成能を促進した分画試料が歯髄細胞増殖能に与える影響を WST-1 法にて検討した。RPPCs を 5,000 cells/well となるように 96 穴細胞培養プレート (Becton Dickinson and company) に播種し、uDMCs および dDMCs の分画 #12 + #13、またはコントロールとして 0.05 % ギ酸水溶液を 1 % FBS 含有 α-MEM にて希釈し、最終体

積濃度を 2 % (v/v) に調整した培養液を用いて 37°C、5 % CO_2 気相下で 5 日間培養をおこなった。培養液の交換は 3 日毎におこなった。培養終了後、WST-1 試薬 (Premix WST-1; タカラバイオ, 滋賀) を培養液中に添加し、37°C、5 % CO_2 気相下で 2 時間培養した。続いて室温で 1 分間振盪の後、マイクロプレートリーダー (ARVO MX; Perkin Elmer, Waltham, 米国) を用い 450 nm における吸光度を測定し、uDMC と dDMC 添加条件下における細胞の増殖能について比較をおこなった。試料数は各条件につき 6 とした。

⑧ DMCs 分画試料が RPPCs の分化能、石灰化能に与える影響 (*in vitro*)

分画試料が歯髄細胞の分化、石灰化能に与える影響を評価するために、RPPCs を 50,000 cells/well となるように 24 穴細胞培養プレート (Becton Dickinson and company) に播種し、uDMCs および dDMCs の分画 #12 + #13、またはコントロールとして 0.05 % ギ酸水溶液を石灰化誘導培地 (50 μg/ml アスコルビン酸 (Sigma Aldrich), 10 mM β-グリセロリン酸 (Sigma Aldrich), 10 % FBS 含有 α-MEM) にて希釈し最終体積濃度を 2 % (v/v) に調整した培養液にて 37°C、5 % CO_2 気相下で培養をおこなった。培養液の交換は 3 日毎におこなった。

分化能に与える影響の評価のために RPPCs を 12 日間培養し、培溶液を除去後 PBS にて洗浄し、10 % 中性ホルマリン溶液にて 15 分間固定した後、アルカリフォスファターゼ染色キット (コスモバイオ, 東京) を用い 20 分間染色をおこなった。染色後、十分に水洗をおこない、倒立顕微鏡 (ECLIPSE TS100; ニコン, 東京) にて得られた画像に対して画像解析

ソフト (Image J; NIH) [37] を用い染色面積の定量評価をおこなった。試料数は各条件につき 6 とした。

石灰化能に与える影響の評価のために RPPCs を 21 日間培養し、培溶液を除去後 PBS にて洗浄し、10 % 中性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 30 分間染色をおこなった。染色後十分に水洗をおこない、5 % ギ酸溶液にて石灰化物を溶解し、マイクロプレートリーダー (ARVO MX) を用い 405 nm における吸光度を測定した。試料数は各条件につき 6 とした。

⑨ DMCs 分画試料に含まれる歯髄創傷治癒を促進する分子の同定

dDMCs の分画 #12 + #13 に含まれる歯髄創傷治癒を促進するタンパクを同定するために、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry : LC-MS/MS) を用い、分画試料に含まれるタンパクの同定および定量解析をおこなった。0.5 μg/μl のペプチド濃度に調整されたトリプシン処理後の各試料 10 μl について LC-20AD nano HPLC (島津製作所, 京都) 、C18 trap column (200 μm I.D. × 2.0 cm; BGI, Shenzhen, 中国)、および analytical C18 column (75 μm I.D. × 10cm; BGI) を用いて分析をおこなった。移動相は 2 % アセトニトリルを含む 0.1 % ギ酸水溶液を用い、最初の 4 分は 15 μl/min の流速で分析し、続く 44 分間は流量を 400 nl/min に変更したうえで、一定の割合でアセトニトリルの濃度を 35 % まで増加させながら実施した。さらにその後 2 分間でアセト

ニトリルの濃度を一定の割合で 80 % まで増加させ、4 分間維持した。ペプチドのイオン化および分析は Nanospray III source (AB SCIEX, Framingham, 米国)、TripleTOF 5600 System (AB SCIEX) を用いた。得られた MS/MS スペクトルに対し MaxQuant version 1.5.3.8 (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, ドイツ) および UniProt を用いたペプチドマスフィンガープリンティングによるタンパク質の同定、および定量解析をおこなった。

さらに、uDMCs および dDMCs の両試料間に共通して存在が確認されたタンパクについては protein ratio ([protein ratio] = [dDMCs でのピーク強度] / [uDMCs でのピーク強度]) を計算することにより、どちらの試料により多くの分子が存在しているかを確認した。その結果、uDMCs と比較して dDMCs 中に量的に多く存在するタンパクについては、文献検索より細胞機能や創傷治癒に関連があるものを特定し、歯髄創傷治癒を促進する分子の候補を抽出した。

⑩ 統計学的解析

上記の実験において得られた結果は、One way ANOVA および Tukey's 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

① RP-HPLC による DMCs の分離および分画の回収

DMCs 分解産物は象牙質－歯髄複合体中の有機成分を構成する様々な分子を含有する集合体から成り、その中に歯髄の創傷治癒を促進する分子が存在すると考えられるため、RP-HPLC を用いて uDMCs、dDMCs の内容物の分離ならびに回収をおこなった。その結果、両試料の内容物が保持時間に応じて分離され、各試料において特異的なピークが観察された（図 1)。特に、矢印で示すように保持時間 90 分付近において観察されるピークの形態が両試料間で大きく異なっており、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。

さらに分離された試料のどの分画が歯髄の創傷治癒を促進するかを検討するために、uDMCs、dDMCs ともそれぞれ 14 の分画に分け、フラクションコレクターを用いて各分画の回収をおこなった。

② DMCs 分画試料を用いた直接覆髄実験

前項にて dDMCs から得られた 14 の分画のうち、歯髄の創傷治癒を促進する分子が含まれる分画を特定するために、各分画を用いて直接覆髄実験をおこなった。

覆髄から 4 週間経過後の H-E 染色像の代表例を図 2 に示す。前項の RP-HPLC 解析にて試料特異的なピークが認められた分画 #12 もしくは #13 を覆髄剤として用いた試料では露髄部を完全に覆う第三象牙質の形成が認められた (図 2A) 。一方、その他の分画 (図 2B) およびコントロールとして 0.001 % ギ酸溶液を覆髄剤として用いた試料 (図 2A) では、一部

第三象牙質の形成を認める試料もあるものの、露髄部を覆うほどの第三象牙質の形成は認められなかった。これらの結果より、第三象牙質形成を促進する分子が dDMCs から得られた分画 #12 ならびに #13 に存在していることが明らかとなった。

続いて、これらの第三象牙質形成促進能を持つ分子が dDMCs に特異的であるかを確認するために、MMP20 処理前の試料である uDMCs と MMP20 処理後の試料である dDMCs について、各分画の持つ第三象牙質形成能の比較をおこなった。uDMCs と dDMCs の双方において分画 #12 と分画 #13 を完全に分離することは不可能であることから、分画 #12 と分画 #13 を合わせた分画 #12 + #13 を用いて、同様の手法にて直接覆髄実験をおこない、結果を比較した。マイクロ CT 解析の結果、dDMCs を用いた試料では露髄面を完全に覆う緻密な第三象牙質が認められたが、uDMCs を用いた場合、第三象牙質に欠損が認められた (図 3A)。形成された第三象牙質の体積を定量すると、dDMCs は、uDMCs およびコントロールと比較して有意に多くの第三象牙質形成を促進することがわかった ($P < 0.05$) (図 3B)。一方、病理組織学的評価の結果、dDMCs の分画を用いた試料の H-E 染色像の弱拡大観察から、露髄面を覆う緻密な第三象牙質とその直下に象牙芽細胞様細胞層が認められ (図 3C)、そして強拡大観察から、形成された第三象牙質に向かって突起を伸ばしているような象牙芽細胞様細胞ならびに象牙細管様構造が認められた (図 3D)。

以上の結果から、dDMCs の分画 #12 + #13 中には、DMCs 分解産物に特異的で、かつ歯髄創傷治癒を促進する分子が含まれることが示唆された。

③　DMCs 分画試料が RPPCs の細胞機能に与える影響 (*in vitro*)

前項の直接覆髄実験で歯髄創傷治癒を促進した dDMCs の分画 #12 + #13 が歯髄細胞機能に与える影響を *in vitro* で評価した。

細胞増殖能に与える影響について WST-1 法により検討した結果、dDMCs、uDMCs の分画はともにコントロールと比較し有意に細胞増殖を促進した ($P < 0.05$) が、dDMCs と uDMCs の間に有意差は認めなかった ($P > 0.05$) (図 4A)。

一方、細胞分化能および石灰化能に与える影響については、dDMCs の分画は uDMCs およびコントロールと比較し、これらの機能を有意に促進した ($P < 0.05$) (図 4B, C)。

④　DMCs 分画試料に含まれる歯髄創傷治癒を促進する分子の同定

これまでの *in vivo* および *in vitro* の実験において、歯髄創傷治癒の促進もしくは歯髄細胞の機能促進を認めた dDMCs の分画試料の内容物において、作用の主要因となっている分子を同定するためにタンパク質量分析をおこなった (図 5)。

ベン図における青色の円に示す uDMCs 中には 32 種類 (3 + 29) のタンパクの存在が確認され、赤色の円で示す dDMCs 中には 51 種類 (29 + 22) のタンパクが確認された。両試料に共通して存在した 29 種類のタンパクのうち 9 種類が「protein ratio > 1」となり、uDMCs よりも dDMCs 中に多く含まれることがわかった。これらより、dDMCs のみに含まれる 22 種

類と共通タンパク中で「protein ratio > 1」を示した 9 種類の合計 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、創傷治癒を促進する分子の候補と考えられた。これら 31 種類のタンパクについて文献的検索より細胞の様々な機能を促進し、創傷治癒に関連する報告のある候補分子を抽出し、表に示す 4 種類の候補、junction plakoglobin、protein S100-A7、protein S100-A8、prolactin-inducible protein を同定した。

4) 小括

RP-HPLC 解析により回収された DMCs 分画試料について、分解を受けていない uDMCs から得られた分画 #12 + #13 は歯髄細胞の増殖を促進し、直接覆髄剤として用いることにより欠損を伴う第三象牙質を誘導したが、MMP20 による分解を受けた後の dDMCs から得られた分画 #12 + #13 は歯髄細胞の増殖に加え、分化と石灰化も促進し、直接覆髄剤として用いることで露髄面を完全に閉鎖する第三象牙質を誘導した。これらの結果から、DMCs が MMP20 による分解を受けることで遊離した生理活性を持つ分子が dDMCs から得られた分画 #12 + #13 に存在し、歯髄創傷治癒を促進していることが示された。

さらに、これらの分画中に含まれるタンパクの解析により、歯髄創傷治癒を促進する可能性を持つ 4 種類の候補タンパク、junction plakoglobin、protein S100-A7、protein S100-A8、prolactin-inducible protein が同定された。

そこで、これらの候補タンパクが歯髄組織の創傷治癒または歯髄細胞に与える影響を検

討するため、ヒト組み換えタンパクを用いた実験をおこなうこととした。

Ⅲ．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証

1)　目的

これまでの実験で同定された、MMP20 による象牙質基質タンパク分解産物中に存在する 4 種類の歯髄創傷治癒を促進する候補タンパクについて、MMP20 による処理後のタンパク構造の変化と、象牙質－歯髄複合体および歯髄細胞の創傷治癒に与える影響を検討するために以下の実験をおこなった。

2)　材料および方法

①　候補タンパク試料の調整

これまでに同定された歯髄創傷治癒を促進する可能性を持つ候補タンパクを用いて、その機能解析をおこなうために、組み換えタンパクを用いた実験をおこなった。ヒト組換えタンパクである junction plakoglobin (JUP) (Abnova, Taipei, 中華民国) (コムギ胚芽由来)、protein S100-A7 (A7) (PROSPEC, Ness-Ziona, イスラエル) (大腸菌由来)、protein S100-A8 (A8) (PROSPEC) (大腸菌由来)、prolactin-inducible protein (PIP) (Abcam, Cambridge, 英国) (コムギ胚芽由来) を PBS 中に溶解し 37°C にて 24 時間静置したものを MMP20 処理前タンパク試料とし、これら 4 つのタンパクを MMP20 と 37°C にて 24 時間反応させたものを MMP20 処

理後タンパク試料とし、以降の実験に用いた。

② 候補タンパクのプロファイル解析

「Ⅱ－結果④」において同定されたタンパクが MMP20 の分解基質となりうるかを調べるため、MMP20 処理前および処理後タンパク試料 (40 µg/ml) と、MMP20 を PBS 中に溶解した直後の試料 5 µg/ml ならびに PBS に溶解後、37°C にて 24 時間静置した試料を用い、タンパクプロファイルを観察するために SDS-PAGE にて解析をおこなった。

Loading buffer (Thermo Fisher Scientific) に溶解した各試料 30 µl を、85 °C にて 2 分間温熱処理をおこない、10-20 % Tris-Glycine Mini Gels (Thermo Fisher Scientific) に 200 V で 40 分間電気泳動をおこなった。その後、銀染色 (Silver Express; Thermo Fisher Scientific) によりバンドを可視化し、観察をおこなった。ラダーには mark12 unstained standard (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

③ 候補タンパク試料を用いた直接覆髄実験

「Ⅱ－結果④」において同定されたタンパクが歯髄組織の第三象牙質形成能に与える影響を評価するために、先行研究を参考に 1 µg/ml および 0.1 µg/ml の濃度に調整された[40] MMP20 による処理後のタンパク試料、コントロールとして MMP20 を PBS にて希釈し、各タンパク試料と反応させた MMP20 と同濃度に調整した溶液を用い、「Ⅱ－材料および方

法③」と同様の手法を用い直接覆髄実験をおこなった。覆髄から 4 週間経過後、「Ⅱ－材料および方法④、⑤」と同様の手法を用いてマイクロ CT 画像解析および病理組織学的評価をおこなった。試料数は各条件につき 3 とした。

④ 候補タンパク試料が RPPCs の細胞機能に与える影響（*in vitro*）

前項で第三象牙質形成能を促進した試料が歯髄細胞の遊走能、増殖能、分化能および石灰化能に与える影響を *in vitro* で検討した。実験群には MMP20 による処理後のタンパク試料を培養液にて希釈し、それぞれの試料が覆髄実験で良好な第三象牙質形成能を認めた濃度と、その 10 倍希釈濃度に調整した試料を用い、コントロール群として MMP20 を培養液にて希釈し、各タンパク試料と反応させた MMP20 と同濃度に調整した試料を用いた。試料調整に用いた培養液は、遊走能と増殖能の評価には 1 % FBS 含有 α-MEM を、分化能と石灰化能の評価には石灰化誘導培地を用いた。

細胞遊走能の評価は Trans well 法 (Cytoselect; Cell Biolabs, San Diego,米国) を用いておこなった。上段ウェルには無血清培地中で一晩培養した RPPCs を 1 % FBS 含有 α-MEM とともに 20,000cells / well となるように播種し、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下段ウェルに各試料を加え、37°C、5 %CO_2 気相下で 2 時間培養後、メンブレンを通過した細胞を、下段ウェルに detachment buffer を加え 30 分作用させることで剥離し、蛍光染色 (CyQuant; Cell Biolabs) 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) を用い測定した。増殖能、分化能、石灰化能の評価は「Ⅱ－材料および方法⑦、⑧」と同様の手法でおこなった。試料数は各条件につき 6 とした。

⑤ 統計学的解析

上記の実験において得られた結果は、One way ANOVA および Tukey's test または Dunnett's 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

① 候補タンパクのプロファイル解析

MMP20 による DMCs の分解を受けて、歯髄創傷治癒を促進する分子の候補として同定されたタンパクが、dDMCs 中に存在する際に、全長タンパクとして存在するのか、個々のタンパクが MMP20 の分解基質となり分解を受け、そのタンパク断片もしくはペプチドとして存在するのかを調べるために、SDS-PAGE による各タンパクのプロファイル解析をおこなった (図 6)。

その結果、MMP20 単体は 37°C で 24 時間静置することで最初は観察されていたバンドが消失することが確認された (図 6A)。JUP は MMP20 で処理することにより処理前に観察されていた部分よりも低分子の領域に新たなバンドが観察された (図 6B)。一方、PIP、A7 お

よび A8 については新たなバンドは確認されなかった (図 6C, D)。

② 候補タンパク試料を用いた直接覆髄実験

「Ⅱ－結果④」において歯髄創傷治癒を促進する分子の候補として同定されたタンパクが第三象牙質形成に与える影響を調べるため、dDMCs の作製時と同様の方法にて各組み換えタンパク試料を MMP20 で処理したものを覆髄剤として用いて、直接覆髄実験をおこなった。直接覆髄から 4 週間経過後におこなったマイクロ CT 画像解析の結果、0.1 μg/ml の JUP と PIP、1 μg/ml の A7 を用いた場合、露髄面を完全に覆うような第三象牙質形成がマイクロ CT にて観察された (図 7) が、その他の試料では露髄面を閉鎖するほどの第三象牙質形成は認められなかった。形成された第三象牙質の体積を定量した結果、それぞれの試料に対応する MMP20 単体を覆髄剤として用いたコントロールと比較し、1 μg/ml の A7 のみが有意に第三象牙質形成を促進した ($P < 0.05$) が、0.1 μg/ml の PIP および JUP も促進傾向が認められた ($P > 0.05$) (図 8)。一方、A8 に関してはコントロールと比べて第三象牙質形成の促進ならびに露髄面の完全な閉鎖は認められなかった。

マイクロ CT 解析にて露髄面の完全な閉鎖が認められた試料については、結果の検証のためにおこなった H-E 染色像から、形成された第三象牙質の窩洞側に生細胞は存在せず、露髄面の完全閉鎖が観察された (図 9)。

③　候補タンパク試料が RPPCs の細胞機能に与える影響（*in vitro*）

前項における直接覆髄実験で第三象牙質形成を促進した MMP20 処理後の候補タンパク試料と、その 10 倍希釈した試料を用いて歯髄細胞の機能に与える影響を *in vitro* で評価した。

その結果、いずれの試料も歯髄細胞の遊走能には影響を与えなかった (図 10A)。細胞増殖能については、0.1 μg/ml の JUP と 1 μg/ml の A7 は培地のみと比較すると有意に細胞増殖を促進したが ($P < 0.05$)、MMP20 のみを含有するコントロールと比較すると有意差は認められなかった ($P > 0.05$) (図 10B)。一方、細胞分化能、石灰化能についてはすべての候補タンパク試料がコントロールと比較して有意にこれらの機能を促進した ($P < 0.05$) (図 11, 12)。

4)　小括

「Ⅱ－結果④」において歯髄創傷治癒を促進する分子の候補として同定された 4 種類のタンパクのうち、JUP、PIP、および A7 を覆髄剤として用いて直接覆髄実験をおこなった結果、露髄面を完全に覆うような第三象牙質が形成された。また、*in vitro* の実験系から、これらの良好な第三象牙質形成能を認めた候補タンパクが歯髄細胞の分化、石灰化を促進することが明らかとなった。

ⅡおよびⅢの結果から、象牙質基質タンパクを MMP20 により分解することで JUP、PIP、および A7 の全長タンパクまたは断片化したタンパクが遊離して、歯髄細胞の分化および石灰化を促進することで露髄面を完全に覆う第三象牙質の形成を誘導し、象牙質－歯髄複合

体の創傷治癒を促進することが示唆された。

Ⅳ．考察

う蝕の進行や外傷、また窩洞形成時の偶発的露髄が生じた際におこなわれる直接覆髄法は、歯髄組織が本来備える創傷治癒メカニズムを賦活することで、露髄により一部が破綻した象牙質－歯髄複合体の修復、あるいは再生を促進することを目的としている。しかし象牙質－歯髄複合体の創傷治癒メカニズムは未だ完全には解明されていない。

これまでの歯髄創傷治癒メカニズムを検討した一連の先行研究から、う蝕の進行や窩洞形成等の刺激により象牙質、または歯髄中で活性化された matrix metalloproteinase (MMP) 分子によって象牙質の有機成分が分解され[23−26]、生じた象牙質基質の分解産物が歯髄創傷治癒を促進することを報告してきた[23, 27]。歯髄の最外側に配列している象牙芽細胞から分泌された象牙質の有機成分である象牙質基質（dentin matrix components：DMCs）は、歯髄細胞にとっての extracellular matrix (ECM) であり[27]、様々な種類の生理活性物質が含まれていることが知られている[28−33]。骨のリモデリングの際に破骨細胞による骨基質の分解の結果、遊離した TGF-β1 が骨芽細胞の増殖および分化を促進するのと同様に[21]、前述の活性化された MMP 分子による DMCs の分解が生じた結果、糖タンパクやその他のタンパクの集合体から遊離したタンパクやタンパク断片がさらに高い生理活性を持ち、歯髄組織の創傷治癒を促進している可能性がある。特に DMCs が MMP20 により分解され、生じた DMCs 分解産物（digested DMCs: dDMCs）が *in vitro* において歯髄細

胞の機能を促進し、さらには象牙質－歯髄複合体の創傷治癒を *in vivo* で促進した[40]ことから、dDMCs 中に歯髄創傷治癒に関わる重要な分子が存在すると考えられるが、その分子の詳細については現在も不明である。そこで本研究では、MMP20 による分解を受けた DMCs 中に存在し、歯髄組織の創傷治癒を促進する分子の同定、および同定された分子が歯髄細胞および象牙質－歯髄複合体に与える影響の検討をおこなった。

DMCs 中には MMPs 分子以外にもセリンプロテアーゼやシステインプロテアーゼといった内因性の酵素が存在している[43, 44]。本研究で dDMCs の調整にあたり使用した MMP20 は歯に特異的に発現する MMP 分子と考えられており[41, 42]、エナメル関連タンパクを分解することでエナメル質形成への関与が報告されている[45]他、dentin sialophosphoprotein を分解することで象牙質形成に関与する可能性が報告されている[46]。しかし MMP20 の分解基質についての報告は少なく、dDMCs 中に含まれる分子については過去に報告がない。本研究では dDMCs のコントロールとして untreated DMCs (uDMCs) を用いた。その場合、uDMCs の粉末を PBS に溶解後、37°C にて dDMCs と同じ時間静置し、MMP20 を加えていないこと以外は同じ条件で調整することで dDMCs の効果を特異的に検討した。

まず、dDMCs 中の生理活性を持つ分子を含む分画を得るために、RP-HPLC を用いた分析をおこなった。その結果、検出されたすべてのピークは 100 分以内に観察された。これは象牙質に由来するタンパクを RP-HPLC にて分離しヒト歯根膜細胞の ALP 活性に与える影響を調べた報告[46, 47]と類似する傾向を示した。RP-HPLC 分析の結果、uDMCs と dDMCs

からそれぞれ回収された 14 の分画のうち、分画 #12 と #13 において両試料のピーク形態が著しく異なっていたことから、この分画に uDMCs、dDMCs 間で異なる分子の存在が示唆された（図 1）。

これまでの研究で、dDMCs が第三象牙質形成能を促進することが明らかとなっていることから[40]、前項で得られたどの分画が本現象に重要な役割を果たしているかを検索するため、また、その分画中の分子が DMCs 分解産物に特異的なものであるかを検証するために、得られた分画を用いた直接覆髄実験をおこなった。その結果、RP-HPLC 分析にて特異的なピークが認められた dDMCs 由来の分画 #12 および #13 中に第三象牙質の形成を促進する分子が含まれていることが明らかとなった（図 2)。次に、これらの分画 #12、#13 の分離が不完全であるピークに含まれる生理活性を持つ分子が DMCs を MMP20 で分解することにより特異的に生じた分子であることを確認するために、uDMCs と dDMCs から得られたそれぞれの分画 #12 と #13 を合わせた分画 #12 + #13 が第三象牙質形成に与える影響を直接覆髄実験後のマイクロ CT による画像解析と病理組織学的評価にて比較をおこなった。誘導された第三象牙質の評価にマイクロ CT を使用することで、従前よりおこなわれてきた病理組織学的評価のみでの評価と比較し、第三象牙質中の欠損の有無について、より客観的にかつ三次元的に評価できるようになり[48]、さらに第三象牙質の体積の定量評価も可能となったが、軟組織である歯髄の覆髄に対する生体反応の評価と、解像度の問題によりマイクロ CT では評価不可能な象牙細管構造などの硬組織の微小構造については病理組織学的評

価と併せて評価をおこなった。その結果、dDMCs 由来の分画を直接覆髄剤として用いた場合は uDMCs と比較して、より高い第三象牙質形成促進能を示し（図 3A, B)、さらに新生第三象牙質直下の歯髄では細胞体に突起状構造を有する象牙芽細胞様細胞層が認められた(図 3C, D)。これらの結果から、MMP20 により分解を受けた DMCs 分解産物中に存在する歯髄創傷治癒を促進する分子が RP-HPLC によって特定の分画にて検出され、直接覆髄実験にて示された良好な第三象牙質形成を誘導したと考えられる。

また、本研究では RP-HPLC 解析の際の移動相として 0.05 % ギ酸水溶液を用い、直接覆髄実験に用いた試料はそれを 50 倍希釈しているため、0.001 % ギ酸を含んでいる。ギ酸は細胞毒性を持つことが報告されている[49, 50]が、本研究で用いた程度の濃度では細胞機能に影響を与えないことも報告されている[46, 47]。本研究ではコントロールとして 0.001 % ギ酸を含む PBS を用いた直接覆髄もおこなったが、第三象牙質の形成は認められなかった一方で、歯髄壊死なども認めなかった（図 2A)。さらに直接覆髄剤の担体として用いたゼラチンスポンジは、生体に対して活性を持たず、硬組織形成に影響を与えないことが知られているが[51]、むしろ機械的強度や辺縁封鎖性が不良であることから新生硬組織を誘導するための担体としては創傷治癒の促進に不利であると考えられる。従って、今回の直接覆髄実験において新たに形成された第三象牙質は、dDMCs の分画 #12 + #13 中に含まれる生理活性物質が強く影響を及ぼした結果であると考えられる。

次に *in vivo* の動物実験で確認された象牙質－歯髄複合体の創傷治癒のメカニズムを検

討するためにdDMCsから得られた分画 #12 + #13がラット歯髄初代培養細胞（RPPCs）の増殖、分化そして石灰化に与える影響を *in vitro* で検討をおこなった。WST-1法の結果、dDMCsの分画とuDMCsの分画は、ともにDMCs非含有のコントロールと比較して細胞増殖を促進したが、dDMCsとuDMCsの間に有意差は認められなかった（図4A)。これまでの研究で、dDMCsとuDMCsはともに細胞増殖を促進しなかったことが報告されている[40]が、本研究ではRP-HPLC解析により得られた分画を用いて実験をおこなうことによって、細胞増殖を促進する分子の濃縮、あるいは細胞増殖を抑制する分子の排除が生じたためと考えられる。一方、dDMCs由来の分画が細胞分化および石灰化に与える影響については、 uDMCsの分画およびDMCs非含有のコントロールと比較して有意にこれらの機能は促進され（図4B, C)、過去の報告と一致する結果が得られた[40]。これらより、*in vivo*での直接覆髄実験において、歯髄内に存在する歯髄幹細胞の細胞増殖がdDMCsの分画とuDMCsの分画の両試料で促進されるものの、象牙芽細様細胞への分化とそれに引き続く石灰化基質分泌の過程においては、dDMCs由来の分画中に含まれる特定の分子の影響で第三象牙質の形成が促進されたと考えられる。

続いて、dDMCs由来の分画 #12 + #13中に含まれる創傷治癒を促進する分子の同定をLC-MS/MSを用いておこなった。これまでの *in vivo* および *in vitro* の実験結果から、歯髄創傷治癒を促進する分子はuDMCsの分画と比較してdDMCsの分画に多く含まれていると考えられ、uDMCs とdDMCsの分画中に含まれるタンパク数を示すベン図において、

dDMCs の分画に特異的に検出された 22 種類のタンパクは創傷治癒を促進する分子の候補の一部として考えられた（図 5)。また、uDMCs と dDMCs に共通する 29 種類のタンパクにおいて、「protein ratio > 1 」を満たす 9 種類のタンパクも dDMCs 中に uDMCs 中よりも量的に多く検出された分子であり、創傷治癒を促進する分子の候補の一部として考えられた。これらの候補として抽出された 31 種類のタンパクの中から、過去の文献から生理活性を持つことが報告されているものを検索した結果、JUP、A7、A8、PIP が歯髄創傷治癒を促進する分子の候補として同定された。

JUP はカテニンタンパクファミリーの一つで象牙質中での存在に加え[52, 53]、ゼブラフィッシュとヒトの歯に歯胚発生期の段階から発現が確認されている[54, 55]。JUP は γ-カテニンとも呼ばれており、構造および機能について β-カテニンと相同性を持ち、転写因子として機能し Wnt/Tcf シグナルに関与することが報告されていることから[56]、候補タンパクの一つとして抽出した。また、S100 タンパクはカルシウム結合タンパクのファミリーであり、細胞質内においてカルシウムイオン濃度の調節以外にも細胞増殖、分化に関与しているほか、細胞質外では細胞遊走、抗菌作用や炎症制御に関わるという報告がある[57]。さらに S100 タンパクは象牙質う蝕直下の歯髄組織において発現が上昇することも知られており[58]、本実験で同定された S100-A7 ならびに A8 は象牙質中にも存在が確認されている。A7 ならびに A8 は傷害関連分子パターン（damage-associated molecular patterns: DAMPs）として機能し、好中球や単球、マクロファージの走化性因子として作用する[59−61]ほか、NF-κB シグ

ナルを経由し創傷治癒の初期に必要な炎症を促進することが知られている[57]。また、A8 はマウスマクロファージの Wnt シグナルを促進するという報告もある[62]ことから候補タンパクとして抽出した。PIP は乳ガンのマーカー分子として知られており[63, 64]、乳ガン細胞の細胞増殖を促進する[65]。また PIP の発現は骨系分化に必須の転写因子である RUNX2 によって制御されることが報告されており[64]、本研究においては歯髄創傷治癒を促進する分子の候補として抽出した。これらのタンパクが歯髄細胞に与える影響についてはこれまでに報告がなく、検証が必要であると考え、*in vivo* および *in vitro* において実験をおこなった。

本研究において同定、抽出されたタンパクが MMP20 による分解を受け、dDMCs 中に存在する際に、全長タンパクとして存在するのか、あるいは MMP20 による切断を受けタンパク断片として存在するのかを調べるために、上記で抽出された各種タンパクが MMP20 による処理の前後で構造が変化するかを SDS-PAGE にて検証をおこなった。その結果、JUP のみ MMP20 処理によるタンパクの断片化が確認できた（図 6）が、他のタンパクについてはタンパク分解による新たなバンドは確認できなかった。しかし、実験に用いたゲルの検出範囲を超えて低分子化した断片化ペプチドの存在や、検出限界以下の低濃度で可視化に至らなかったバンドの存在も否定はできない。そこで以降の候補組み換えタンパクを用いた *in vitro* および *in vivo* での機能解析には MMP20 処理後のタンパクを用い、コントロールとしてタンパク試料分解に用いた MMP20 と同濃度の MMP20 を 24 時間静置した試料を用いて実験をおこなった。

候補タンパクを用いた *in vivo* での直接覆髄実験の結果、0.1 μg/ml の JUP と PIP、1 μg/ml の A7 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が形成され、歯髄の創傷治癒を促進することが示された（図 7-9)。そこで、これらの試料と 10 倍希釈された試料を用いて、歯髄細胞に与える影響を *in vitro* にて解析をおこなったところ、すべての候補タンパクは歯髄細胞の遊走能には影響を与えなかった一方で、JUP と A7 は添加濃度によっては細胞増殖能を促進する傾向にはあったが有意差は認められなかった。また、JUP、PIP ならびに A7 は歯髄細胞の分化および石灰化能を有意に促進することが明らかになった（図 10)。これらの *in vitro* の実験の結果より、dDMCs の分画が uDMCs の分画と比較し細胞分化および石灰化を促進した（図４）理由は、dDMCs の分画中に存在する JUP、PIP ならびに A7 の影響によるものであることが示唆された。本現象のメカニズムとして、JUP は細胞質内で集積し核内移行することにより転写因子として働くこと [54]、あるいは β-カテニンと競合してグリコーゲン合成酵素キナーゼ（glycogen synthase kinase: GSK) 3β によるリン酸化を受ける [66] ことで間接的に β-カテニンの核内移行を促進することが挙げられる。すなわち β-カテニンのエクソソームによる細胞質内濃度調整機構 [67] と同様の JUP 濃度調整機構あるいはトランスポーターが存在し、細胞質外で JUP の濃度が上がることにより JUP の細胞質内集積が起こり、上記の直接的、または間接的な Wnt / TCF シグナル経路の活性化が生じた可能性や、歯髄細胞に未知の JUP の受容体が存在している可能性がある。本研究により JUP が MMP20 により分解を受けること明らかとなったので（図 6B)、JUP の構

造のうちTCFに結合するアルマジロ反復配列[56]および転写活性を持つカルボキシル末端[66]が細胞質内に集積することにより直接的なWnt / TCFシグナル経路の活性化、そしてGSK3βによりリン酸化を受けるアミド末端[68]が細胞質内に集積することにより間接的なWnt / TCFシグナル経路の活性化を引き起こす可能性がある。一方、PIPはCD4分子に親和性を持ち[69]Th1およびマクロファージの活性化に関与すると考えられている[70]が、その受容体やその下流のシグナル経路については完全には解明されていない。歯髄細胞にPIPが結合する受容体が存在するかも未だ不明であるが、細胞分化や石灰化と関連するシグナル経路が存在する可能性もあるため、今後検証する必要があると考えられる。A7は免疫担当細胞に対する走化性因子と報告されているが[59−61]、本研究においては歯髄幹細胞や、その他の非特異的な歯髄細胞に対する走化性因子としての機能は確認できなかった。しかし、歯髄細胞にもパターン認識受容体（pattern recognition receptors: PRRs）が存在することは報告されており[71]、A7がDAMPsとして歯髄細胞のPRRsに作用することで細胞分化ならびに石灰化を促進するシグナル経路の活性化や他の現象が発生している可能性もあると考えられる。その場合はアミノ酸配列ではなくタンパクの立体構造が重要であるが、A7の立体構造のうちどの部分がDAMPsとしてPRRsに認識されるかは未だ解明していない。これらのタンパクが象牙質－歯髄複合体および歯髄細胞に与える影響の評価は著者が知る範囲内では本研究が初であり、今後さらなる詳細なメカニズムの解析へと展開していきたいと考えている。

以上の結果から、MMP20 による DMCs の分解の結果、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し、歯髄の創傷治癒に寄与していることが明らかとなった。う蝕の侵襲による影響を受けた歯髄における MMP20 の発現量の変化についてはこれまでに報告がないものの、歯髄創傷治癒メカニズムの一端として本現象が起こっていることが示唆された。また本研究では検証しきれなかったが、タンパクが MMP 分子などの酵素による切断を受け、機能ドメインが三次元構造の表面に露出することやタンパクの三次元構造が変化することで活性が上昇したり、タンパクの断片が全長のタンパクと異なる活性を持つ場合があることが知られている[72−74]。今回は全長の組み換えタンパクを MMP20 にて処理した試料について解析をおこなっているが、それぞれのタンパクの機能ドメインや機能的なモチーフを明らかにすることで象牙質－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。

Ⅴ．結論

本研究により、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、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わかり、第三象牙質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、本研究をおこなう機会を与えて頂き、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）林 美加子教授に、謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる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致します。また、本研究の遂行にあたり様々な御指導と御協力を賜りました大阪市立工業研究所有機材料研究部 中井 猛夫博士に厚く御礼申し上げます。最後に本研究に対して御理解、御協力頂き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）の諸先生方に心から感謝致します。

Ⅶ. 参考文献

1. Smith, A. J., Scheven, B. A., Takahashi, Y., Ferracane, J. L., Shelton, R. M. & Cooper, P. R. Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Arch. Oral Biol.* **57**, 109–121 (2012).
2. Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P. G. & Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA).* **97**, 13625–13630 (2000).
3. Ten Cate, A. R. Dentinogenesis in *Oral histology, development, structure, and function* (ed. Ten Cate, A. R.) 191–238 (Mosby, 1994).
4. Simon, S. R. J., Smith, A. J., Lumley, P. J., Berdal, A., Smith, G., Finney, S. & Cooper, P. R. Molecular characterization of young and mature odontoblasts. *Bone.* **45**, 693–703 (2009).
5. Çalışkan, M. K. & Güneri, P. Prognostic factors in direct pulp capping with mineral trioxideaggregate or calcium hydroxide: 2- to 6-year follow-up. *Clin. Oral Investig.* 10.1007/s00784-016-1798-z (2016).
6. Miles, J. P., Gluskin, A. H., Chambers, D. & Peters, A. O. Pulp capping with mineral trioxide aggregate (MTA): a retrospective analysis of carious pulp exposures treated by undergraduate dental students. *Oper Dent*. **35**, 20–28 (2010).
7. Barthel, C. R., Rosenkranz, B., Leuenberg, A. & Roulet, J. F. Pulp capping of carious exposures: treatment outcome after 5 and 10 years: a retrospective study. *J. Endod.* 26, 525–528 (2000).

8. Saito, T., Ogawa, M., Hata, Y. & Bessho, K. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J. Endod.* **30**, 205-208 (2004).

9. Decup, F. *et al.* Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin. Oral Investig.* **4**, 110–119 (2000).

10. Yang, I. S. Tertiary dentin formation after direct pulp capping with odontogenic ameloblast-associated protein in rat teeth. *J. Endod.* **36**, 1956–1962 (2010).

11. Hayashi, K., Handa, K., Koike, T. & Saito, T. The possibility of genistein as a new direct pulp capping agent. *Dent. Mater. J.* **32**, 976–985 (2013).

12. Schönherr, E & Hausser, H.J. Extracellular matrix and cytokines: a functional unit. *Dev. Immunol.* **7**, 89–101 (2000).

13. Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M. & Werb, Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10.1101/cshperspect.a005058 (2011).

14. Corry, D. B., Kiss, A., Song, L. Z., Song, L., Xu, J., Lee, S. H., Werb, Z. & Kheradmand, F. Overlapping and independent contributions of MMP2 and MMP9 to lung allergic inflammatory cell egression through decreased CC chemokines. *FASEB J.* **18**, 995–997 (2004).

15. Saarialho-Kere, U., Kerkelä, E., Jahkola, T., Suomela, S., Keski-Oja, J. & Lohi, J. Epilysin (MMP-28) expression is associated with cell proliferation during epithelial repair. *J. Invest.*

Dermatol. **119**, 14–21 (2002).

16. Salmela, M. T., Pender, S. L., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Puolakkainen, P., Macdonald, T. T. & Saarialho-Kere, U. Collagenase-1 (MMP-1), matrilysin-1 (MMP-7), and stromelysin-2 (MMP-10) are expressed by migrating enterocytes during intestinal wound healing. *Scand. J. Gastroenterol.* **39**, 1095–1104 (2004).

17. Warner, R. L., Bhagavathula, N., Nerusu, K. C., Lateef, H., Younkin, E., Johnson, K. J. & Varani, J. Matrix metalloproteinases in acute inflammation: induction of MMP-3 and MMP-9 in fibroblasts and epithelial cells following exposure to pro-inflammatory mediators in vitro. *Exp. Mol. Pathol.* **76**, 189–195 (2004).

18. Maryam, G. R. & William, C. P. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biol.* **44–46**, 113–121 (2015).

19. Sean, E. G. & William, C. P. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1334–1347 (2008).

20. Hattori, N., Mochizuki, S., Kishi, K., Nakajima, T., Takaishi, H., D'Armiento, J. & Okada, Y. MMP-13 plays a role in keratinocyte migration, angiogenesis, and contraction in mouse skin wound healing. *Am. J. Pathol.* **175**, 533–546 (2009).

21. Tang, Y., Wu, X., Lei, W., Pang, L., Wan, C., Shi, Z., Zhao, L., Nagy, T. R., Peng, X., Hu, J., Feng, X., Van Hul, W., Wan, M. & Cao, X. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal

stem cells couples bone resorption with formation. *Nat. Med.* **15**, 757–765 (2009).

22. Brennan, E. P., Tang, X. H., Stewart-Akers, A. M., Gudas, L. J. & Badylak, S. F. Chemoattractant activity of degradation products of fetal and adult skin extracellular matrix for keratinocyte progenitor cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2**, 491–498 (2008).
23. Yoshioka, S., Takahashi, Y., Abe, M., Michikami, I., Imazato, S., Wakisaka, S., Hayashi, M. & Ebisu, S. Activation of the Wnt/β-catenin pathway and tissue inhibitor of metalloprotease 1 during tertiary dentinogenesis. *J. Biochem.* **153**, 43–50 (2013).
24. Chaussain-Miller, C., Fioretti, F., Goldberg, M. & Menashi, S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J. Dent. Res.* **85**, 22–32 (2006).
25. Mazzoni, A. Tjäderhane, L., Checchi, V., Di Lenarda, R., Salo, T., Tay, F. R., Pashley, D. H. & Breschi, L. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J. Dent. Res.* **94**, 241–251 (2015).
26. Kato, M. T., Hannas, A. R., Leite, A. L., Bolanho, A., Zarella, B. L., Santos, J., Carrilho, M., Tjäderhane, L. & Buzalaf, M. A. Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine. *Caries Res.* **45**, 429–434 (2011).
27. Smith, J. G., Smith, A. J., Shelton, R. M. & Cooper, P. R. Recruitment of dental pulp cells by dentine and pulp extracellular matrix components. *Exp. Cell Res.* **318**, 2397–2406 (2012).
28. Fisher, L. W., Torchia, D. A., Fohr, B., Young, M. F. & Fedarko, N. S. Flexible structures of

SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **280**, 460–465 (2001).

29. Butler, W. T., Brunn, J. C., Qin, C. & McKee, M. D. Extracellular matrix proteins and the dynamics of dentin formation. *Connect. Tissue Res*. **43**, 301–307 (2002).

30. Magloire, H., Romeas, A., Melin, M., Couble, M. L., Bleicher, F. & Farges, J. C. Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. *Adv. Dent. Res.* **15**, 46–50 (2001).

31. Howard, C., Murray, P. E. & Namerow, K. N. Dental pulp stem cell migration. *J. Endod.* **36**, 1963–1966 (2010).

32. Cooper, P. R., Takahashi, Y., Graham, L. W., Simon, S., Imazato, S. & Smith, A. J. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J. Dent.* **38**, 687–697 (2010)

33. Tomson, P. L., Grover, L. M., Lumley, P. J., Sloan, A. J., Smith, A. J. & Cooper, P. R. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J. Dent.* **35**, 636–642 (2007).

34. Sun, Y., Lu, Y., Chen, L., Gao, T., D'Souza, R., Feng, J. Q. & Qin, C. DMP1 processing is essential to dentin and jaw formation. *J. Dent. Res.* **90**, 619–624 (2011).

35. Oya, K., Ishida, K., Nishida, T., Sato, S., Kishino, M., Hirose, K., Ogawa, Y., Ikebe, K., Takeshige, F., Yasuda, H., Komori, T. & Toyosawa, S. Immunohistochemical analysis of dentin matrix protein 1 (Dmp1) phosphorylation by Fam20C in bone: implications for the induction of

biomineralization. *Histochem. Cell Biol.* 10.1007/s00418-016-1490-z (2016).

36. Gericke, A., Qin, C., Sun, Y., Redfern, R., Redfern, D., Fujimoto, Y., Taleb, H., Butler, W. T., & Boskey, A. L. Different forms of DMP1 play distinct roles in mineralization. *J. Dent. Res.* **89**, 355–359 (2010).

37. Suzuki, S., Sreenath, T., Haruyama, N., Honeycutt, C., Terse, A., Cho, A., Kohler, T., Müller, R., Goldberg, M. & Kulkarni, A. B. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol.* **28**, 221–229 (2009).

38. Gibson, M. P., Liu, Q., Zhu, Q., Lu, Y., Jani, P., Wang, X., Liu, Y., Paine, M. L., Snead, M. L., Feng, J. Q. & Qin, C. Role of the NH2 -terminal fragment of dentin sialophosphoprotein in dentinogenesis. *Eur. J. Oral Sci.* **121**, 76–85 (2013).

39. Zhu, Q., Gibson, M. P., Liu, Q., Liu, Y., Lu, Y., Wang, X., Feng, J. Q. & Qin, C. Proteolytic processing of dentin sialophosphoprotein (DSPP) is essential to dentinogenesis. *J. Biol. Chem.* **287**, 30426–30435 (2012).

40. Okamoto, M., Takahashi, Y., Komichi, S., Cooper, P. R. & Hayashi, M. The effect of dentin matrix components digested with matrix metalloproteinases on dentin regeneration. *Matrix Biol.* （投稿中）.

41. Caterina, J.J., Skobe, Z., Shi, J., Ding, Y., Simmer, J. P., Birkedal-Hansen, H. & Bartlett, J. D. Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta

phenotype. *J. Biol. Chem*. **277**, 49598-49604 (2002).

42. Turk, B. E., Lee, D. H., Yamakoshi, Y., Klingenhoff, A., Reichenberger, E., Wright, J. T., Simmer, J. P., Komisarof, J. A., Cantley, L. C. & Bartlett, J. D. MMP-20 is predominately a tooth-specific enzyme with a deep catalytic pocket that hydrolyzes type V collagen. *Biochemistry*. **45**, 3863–3874 (2006).
43. Smith, A. J. & Smith, G. Proteolytic activity of rabbit incisor dentine. *Arch. oral. Biol.* **29**, 1049–1050 (1984).
44. Lacruz, R.S., Smith , C. E., Smith, S. M., Hu, P., Bringas, P. Jr., Sahin-Tóth, M., Moradian-Oldak, J. & Paine, M. L. Chymotrypsin C (caldecrin) is associated with enamel development. *J. Dent. Res.* **90**, 1228-1233 (2011).
45. Shin, M., Hu, Y., Tye, C. E., Guan, X., Deagle, C. C., Antone, J. V., Smith, C. E., Simmer, J. P , & Bartlett, J. D. Matrix metalloproteinase-20 over-expression is detrimental to enamel development: a Mus musculus model. *PLoS One*. **9** e86774 (2014).
46. Yamakoshi, Y., Hu, J. C., Iwata, T., Kobayashi, K., Fukae, M. & Simmer, J. P. Dentin sialophosphoprotein is processed by MMP-2 and MMP-20 in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **281**, 38235–38243 (2006).
47. Yamakoshi, Y., Kinoshita, S., Izuhara, L., Karakida, T., Fukae, M. & Oida, S. DPP and DSP are necessary for maintaining TGF-b1 activity in dentin. *J. Dent. Res.* **93**, 671 (2014).

48. Ishimoto, K., Hayano, S., Yanagita, T., Kurosaka, H., Kawanabe, N., Itoh, S., Ono, M., Kuboki, T., Kamioka, H. & Yamashiro, T. Topical application of lithium chloride on the pulp induces dentin regeneration. *Plos One* **10**, e0121938; 10.1371/journal.pone.0121938 (2015).

49. Tephly, T. R. & McMartin, K. E. Methanol metabolism and toxicity in *Aspartame, physiology and biochemistry*. (ed. Stegink, L. K. & Filer, L. J.) 111–140 (Marcel, Dekker, 1984).

50. Hayreh, M. M., Hayreh, S. S., Baumbach, G. L., Cancilla, P., Martin-Amat, G. & Tephly, T. R. Ocular toxicity of methanol: An experimental study in *Neurotoxicity of the visual system* (ed. Merigan, W. & Weiss, B.) 35–53 (Raven Press, 1980).

51. Yang, Z., Chen, W., Xia, Z., Liu, Y., Peggrem, S., Geng, T., Yang, Z., Li, H., Xu, B., Zhang, C., Triffitt, J. T. & Zhang, Y. Local application of ibandronate/gelatin sponge improves osteotomy healing in rabbits. *Plos One* **10**, e0125807; 10.1371/journal.pone.0125807 (2015).

52. Eckhardt, A., Jágr, M., Pataridis, S. & Mikšík, I. Proteomic analysis of human tooth pulp: proteomics of human tooth. J. Endod. 40, 1961–1966 (2014).

53. Jágr, M., Eckhardt, A., Pataridis, S. & Mikšík, I. Comprehensive proteomic analysis of human dentin. Eur. J. Oral Sci.120, 259–268 (2012).

54. Sawa, Y., Kuroshima, S., Yamaoka, Y. & Yoshida, S. Intracellular distribution of desmoplakin in human odontoblasts. *J. Histochem. Cytochem.* **53**, 1099–1108 (2005).

55. Verstraeten, B., van Hengel, J. & Huysseune, A. Beta-catenin and plakoglobin expression during

zebrafish tooth development and replacement. *Plos One* **11**, e0148114; 10.1371/journal.pone.0148114 (2016).

56. Maeda, O., Usami, N., Kondo, M., Takahashi, M., Goto, H., Shimokata, K., Kusugami, K. & Sekido, Y. Plakoglobin (c-catenin) has TCF/LEF family-dependent transcriptional activity in b-catenin-deficient cell line. *Oncogene* **23**, 964–972 (2004).

57. Zackular, J. P., Chazin, W. J. & Skaar, E. P. Nutritional immunity: S100 proteins at the host-pathogen interface. *J. Biol. Chem.* **290**, 18991–18998 (2015).

58. McLachlan, J. L., Sloan, A. J., Smith, A. J., Landini, G. & Cooper, P. R. S100 and cytokine expression in caries. *Infect. Immun.* **72**, 4102–4108 (2004).

59. Wolf, R., Howard, O. M., Dong, H. F., Voscopoulos, C., Boeshans, K., Winston, J., Divi, R., Gunsior, M., Goldsmith, P., Ahvazi, B., Chavakis, T., Oppenheim, J. J. & Yuspa, S. H. Chemotactic activity of S100A7 (Psoriasin) is mediated by the receptor for advanced glycation end products and potentiates inflammation with highly homologous but functionally distinct S100A15. *J. Immunol.* **181**, 1499–1506 (2008).

60. Lackmann, M., Cornish, C. J., Simpson, R. J., Moritz, R. L. & Geczy, C. L. Purification and structural analysis of a murine chemotactic cytokine (CP-10) with sequence homology to S100 proteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 7499–7504 (1992).

61. Devery, J. M., King, N. J. & Geczy, C. L. Acute inflammatory activity of the S100 protein

CP-10: activation of neutrophils in vivo and in vitro. *J. Immunol.* **152**, 1888 –1897 (1994).

62. van den Bosch, M. H., Blom, A. B., Schelbergen, R. F., Vogl, T., Roth, J. P., Slöetjes, A. W., van den Berg, W. B., van der Kraan, P. M. & van Lent, P. L. Induction of Canonical Wnt Signaling by the Alarmins S100A8/A9 in Murine Knee Joints: Implications for Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.***68**, 152–163 (2016).

63. Clark, J. W., Snell, L., Shiu, R. P., Orr, F. W., Maitre, N., Vary, C. P., Cole, D. J. & Watson, P. H. The potential role for prolactin-inducible protein (PIP) as a marker of human breast cancer micrometastasis. *Br. J. Cancer.* **81**, 1002–1008 (1999).

64. Baniwal, S. K., Little, G. H., Chimge, N. O. & Frenkel, B. Runx2 controls a feed-forward loop between androgen and prolactin-induced protein (PIP) in stimulating T47D cell proliferation. *J. Cell Physiol.* **227**, 2276–2282 (2012).

65. Cassoni, P., Sapino, A., Haagensen, D. E., Naldoni, C. & Bussolati, G. Mitogenic effect of the 15-kDa gross cystic disease fluid protein (GCDFP-15) on breast-cancer cell lines and on immortal mammary cells. *Int. J. Cancer.* **60**, 216–220 (1995).

66. Zhurinsky, J., Shtutman, M. & Ben-Ze'ev, A. Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J. Cell Sci.* **113**, 3127-3139 (2000).

67. Chairoungdua, A., Smith, D. L., Pochard, P., Hull, M. & Caplan, M. J. Exosome release of β-catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J. Cell Biol.***190**, 1079–1091

(2010).

68. Sadot, E., Simcha, I., Iwai, K., Ciechanover, A., Geiger, B. & Ben-Ze'ev,A. Differential interaction of plakoglobin and b-catenin with theubiquitin-proteasome system. *Oncogene.* **19**, 1992-2001 (2000).

69. Gaubin, M., Autiero, M., Basmaciogullari, S., Metivier, D., Mishal, Z., Culerrier, R., Oudin, A., Guardiola, J., & Piatier-Tonneau, D. Potent inhibition of CD4/TCR-mediated T cell apoptosis by a CD4-binding glycoprotein secreted from breast tumor and seminal vesicle cells. *J. Immunol.* **162**, 2631–2638 (1999).

70. Ihedioha, O. C., Shiu, R. P., Uzonna, J. E. & Myal, Y. Prolactin-Inducible Protein: From Breast Cancer Biomarker to Immune Modulator-Novel Insights from Knockout Mice. *DNA Cell Biol.* **35**, 537–541 (2016).

71. Fawzy, E. Sayed, K. M., Klingebiel, P., Dörfer, C. E. Toll-like Receptor Expression Profile of Human Dental Pulp Stem/Progenitor Cells. *J. Endod.* **42**, 413–417 (2016).

72. Ricard-Blum, S. & Vallet, S. D. Proteases decode the extracellular matrix cryptome. *Biochimie.* **122**, 300–313(2016).

73. Ricard-Blum, S. & Salza, R. Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of the extracellular matrix. *Exp. Dermatol.* **23**, 457–463 (2014).

74. Davis, G. E., Bayless, K. J., Davis, M. J. & Meininger, G. A. Regulation of tissue injury

responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am. J. Pathol.* **156** 1489–1498 (2000).

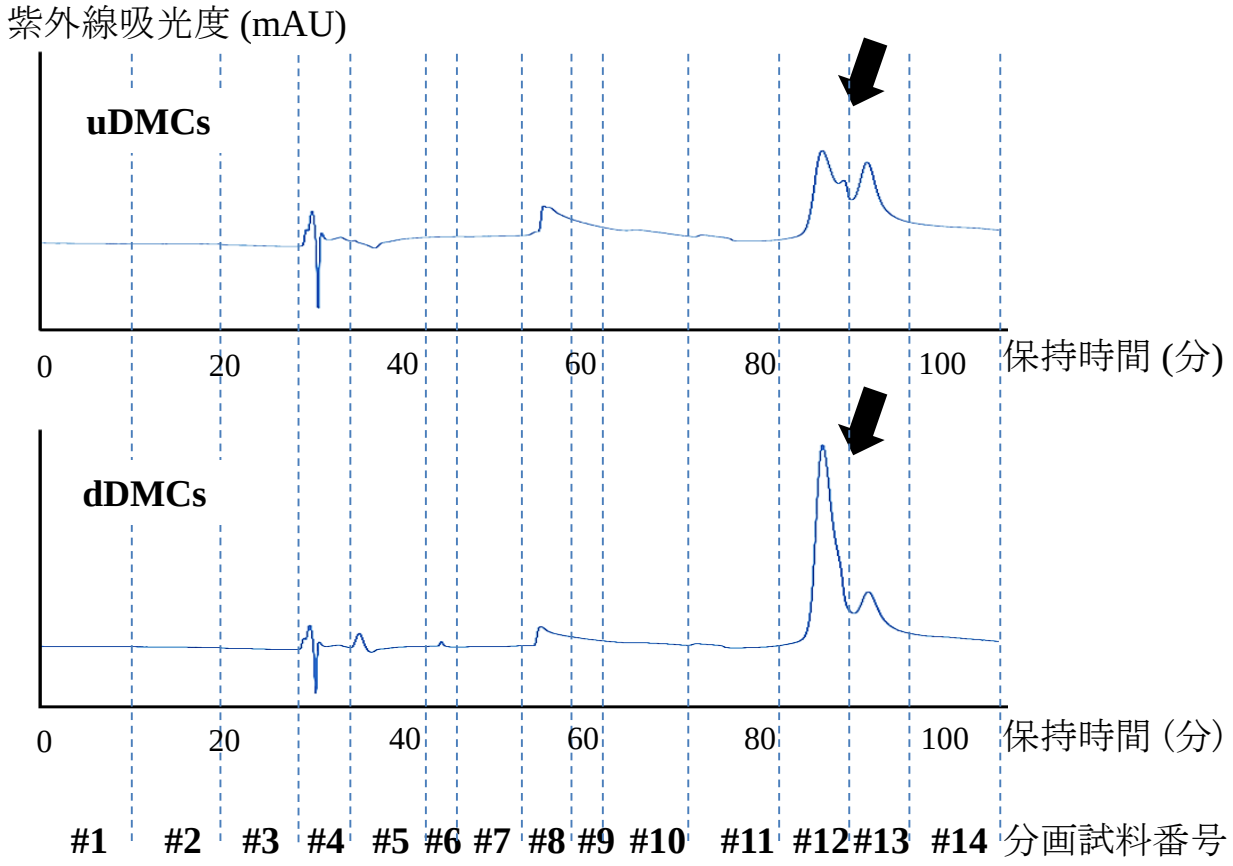


図1　uDMCs および dDMCs の RP-HPLC によるピーク分析

RP-HPLC による uDMCs 、dDMCs のピーク分析の結果を示す。両試料間で得られたピークの形態が大きく異なる部位を矢印で示す (保持時間 90 分付近)。破線で示す保持時間ごとに両試料から分画の回収をおこない、分画 #1～ #14 を得た。

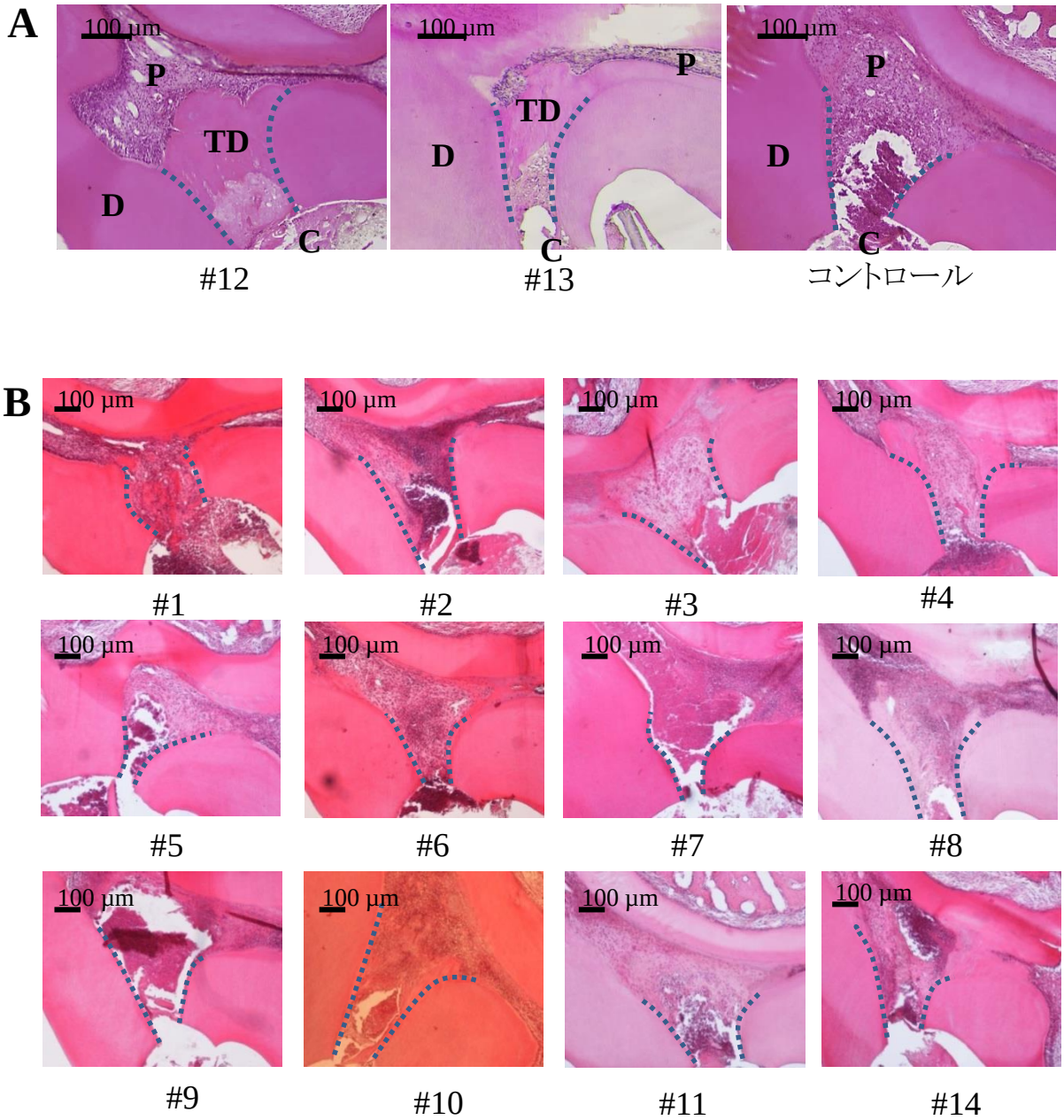


図2 dDMCs 分画試料を用いた直接覆髄実験の病理組織学的評価

A：dDMCs の分画 #12 および #13 を用いて直接覆髄実験をおこなった試料のH-E染色像を示す。コントロールには 0.001% のギ酸を含む PBS を用いた。**B**：dDMCs の分画 #1 ～ #11、および #14 を用いて直接覆髄実験をおこなった試料の H-E 染色像。
露髄部直下に本来存在した髄角と原生象牙質の境界を点線で示す。
P=pulp, D=dentin, TD=tertiary dentin, C=cavity

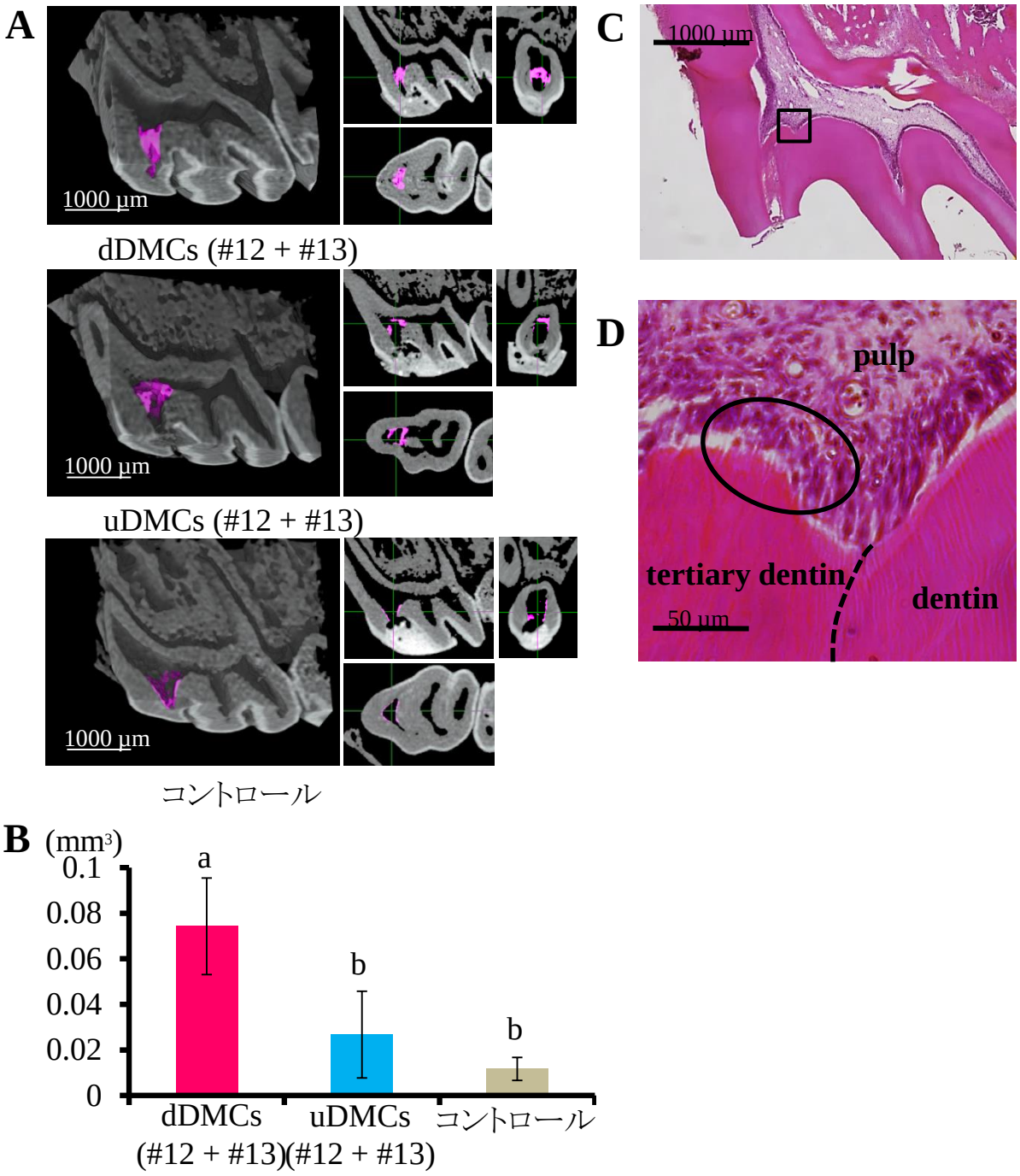


図3 uDMCs と dDMCs 分画試料を用いた直接覆髄実験の
マイクロ CT 画像解析と病理組織学的評価

A:uDMCs と dDMCs の分画 #12 + #13 を用いた直接覆髄 4 週間後のマイクロCT画像解析による三次元構築画像と矢状、体軸、冠状断面像を示す。第三象牙質をピンク色で示す。コントロールとして 0.001% のギ酸を含むPBSを用いた。**B**:第三象牙質体積の定量結果。同一文字で示された群間に有意差がないことを示す (One way ANOVA, Tukey's test, $P < 0.05$)。**C, D**:dDMCsの分画 #12 + #13 を用いて覆髄をおこなった試料のH-E染色像の弱拡大 **(C)** と四角で囲んだ部位の強拡大 **(D)** を示す。破線は第三象牙質と原生象牙質の境界を示し、丸で囲む部位に突起様構造を持つ象牙芽細胞様細胞が認められる。

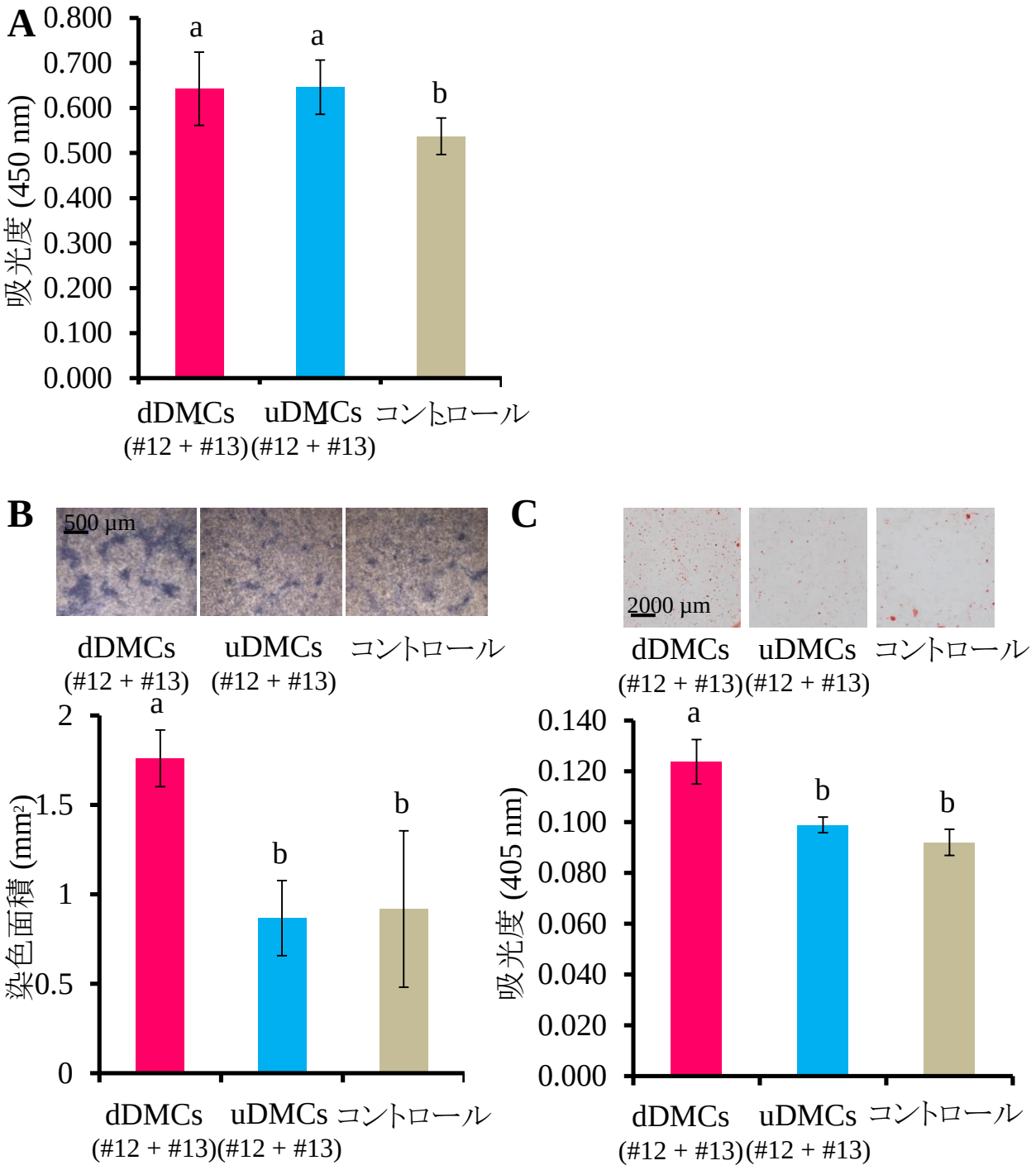


図4 DMCs 分画試料が歯髄細胞機能に与える影響の評価 (*in vitro*)

uDMCs と dDMCs の分画 #12 + #13 が歯髄細胞の **A** 増殖能、**B** 分化能、**C** 石灰化能に与える影響を示す。コントロールとして 0.001% のギ酸を含むPBSを用い、**B**、**C**については上段に染色画像、下段に定量結果を示す。同一文字で示された群間に有意差がないことを示す (One way ANOVA, Tukey's test, $P < 0.05$)

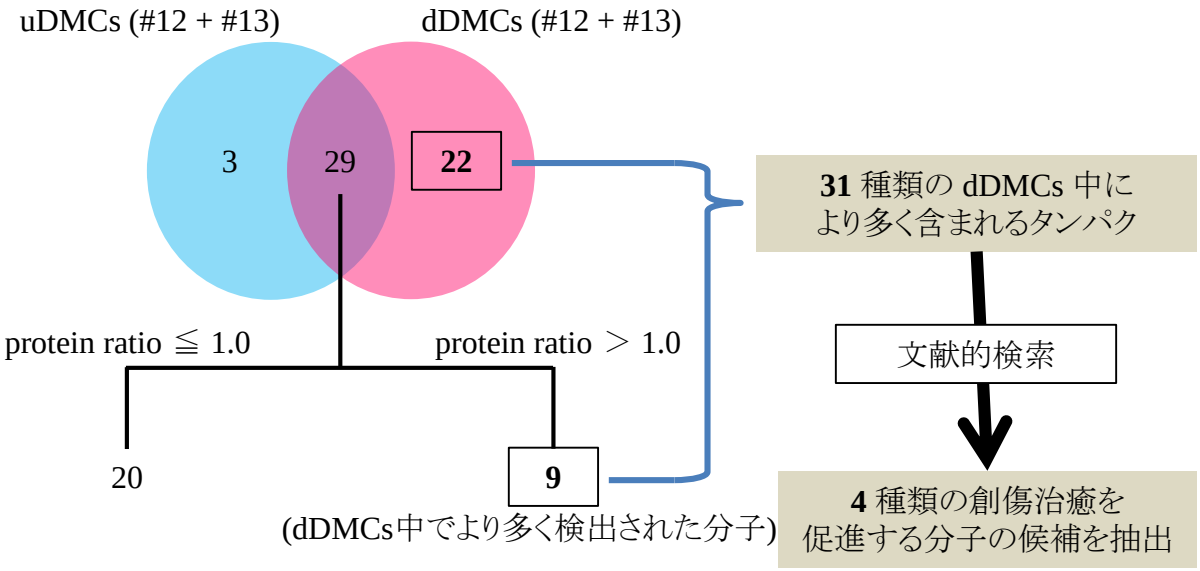


図5 DMCs 分画試料中に含まれる歯髄創傷治癒を促進する分子の同定

uDMCs と dDMCs の分画 #12 + #13 中に含まれるタンパク解析の結果を表したベン図。青色の円は uDMCs、赤色の円は dDMCs の分画中に含まれるタンパクの数を示す。uDMCs と dDMCs に共通して存在するタンパクについては [protein ratio] を計算した ([protein ratio] = [dDMCs でのピーク強度] / [uDMCs でのピーク強度])。dDMCs 特異的に検出された四角で囲まれた 22 種類のタンパクと、「proteinratio > 1」を示した四角で囲まれた 9 種類のタンパクは、uDMCs と比較し dDMCs の分画中に多く検出されたタンパクであり、それらの中から文献的検索をおこなうことで 4 種類の創傷治癒を促進する分子の候補を抽出した。

表 歯髄創傷治癒を促進する分子

Protein ID	Protein description	Protein ratio
tr|A0A024R1X8|A0A024R1X8_HUMAN	Junction plakoglobin	9999
sp|P31151|S10A7_HUMAN	Protein S100-A7	9999
sp|P05109|S10A8_HUMAN	Protein S100-A8	dDMCs のみに存在
sp|P12273|PIP_HUMAN	Prolactin-inducible protein	dDMCs のみに存在

LC-MS/MSの結果、歯髄創傷治癒を促進する候補タンパクとして同定されたタンパクの詳細を示す。
Protein ID：データベース (Uniplot) 上での各タンパクのID
Protein ratio = [dDMCs でのピーク強度] / [uDMCs でのピーク強度]

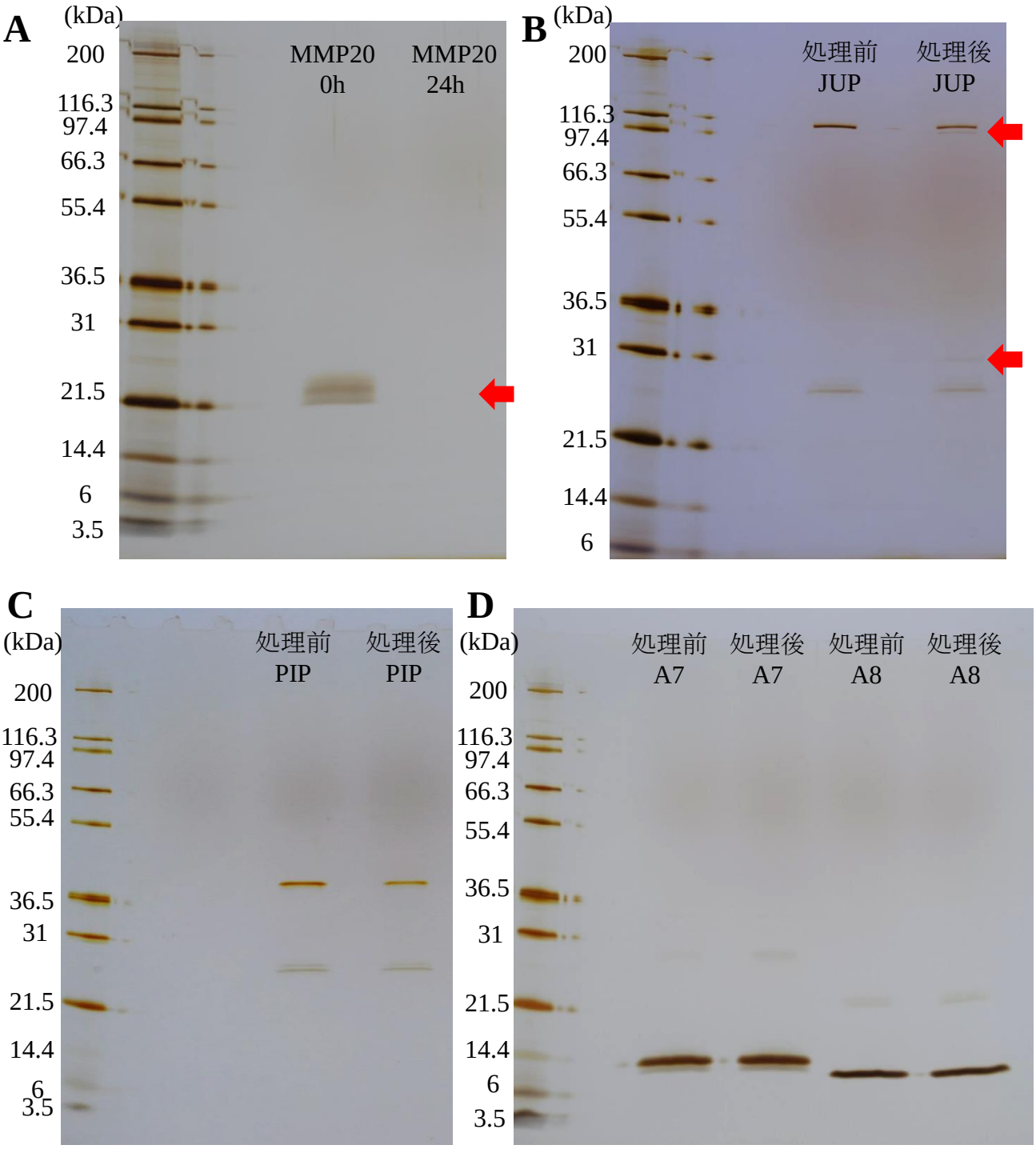
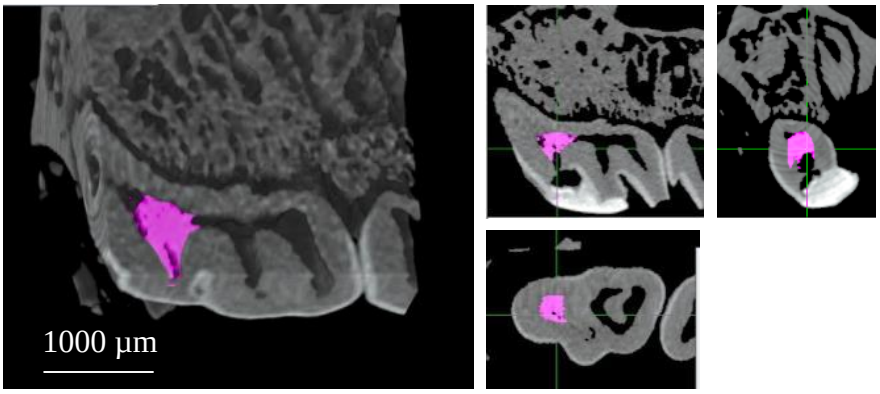


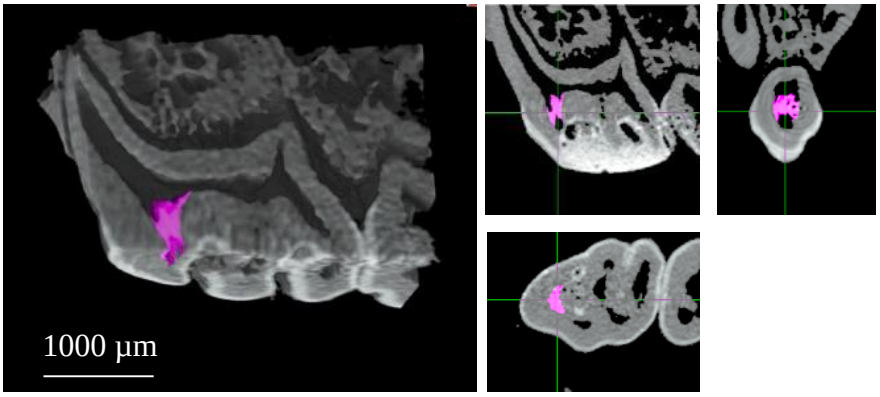
図6　歯髄創傷治癒を促進する候補タンパクのプロファイル解析

A:MMP20 単体の 0, 24 時間静置後、**B**:MMP20 による処理前後の JUP、**C**: MMP20 による処理前後の PIP 、**D**:MMP20 による処理前後の A7 および A8 のプロファイル解析の結果を示す。24 時間静置、あるいは MMP20 処理によりバンドに変化が認められた部位を赤矢印で示す。

JUP 0.1 µg/ml



PIP 0.1 µg/ml



A7 1 µg/ml

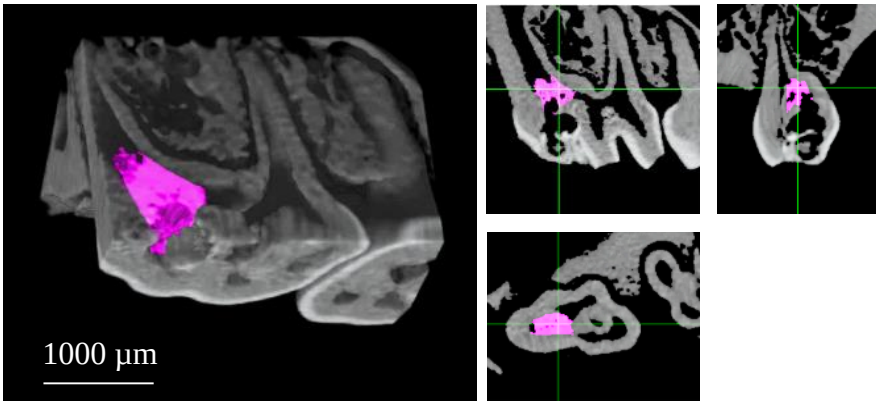


図7　歯髄創傷治癒を促進する可能性のある候補タンパクを用いた直接覆髄実験のマイクロ CT 画像解析

第三象牙質による露髄面の閉鎖が認められた試料 (JUP 0.1 µg/ml、PIP 0.1 µg/ml、A7 1 µg/ml) のマイクロ CT 画像解析による三次元構築画像と矢状、体軸、冠状断面像を示す。第三象牙質をピンク色で示す。

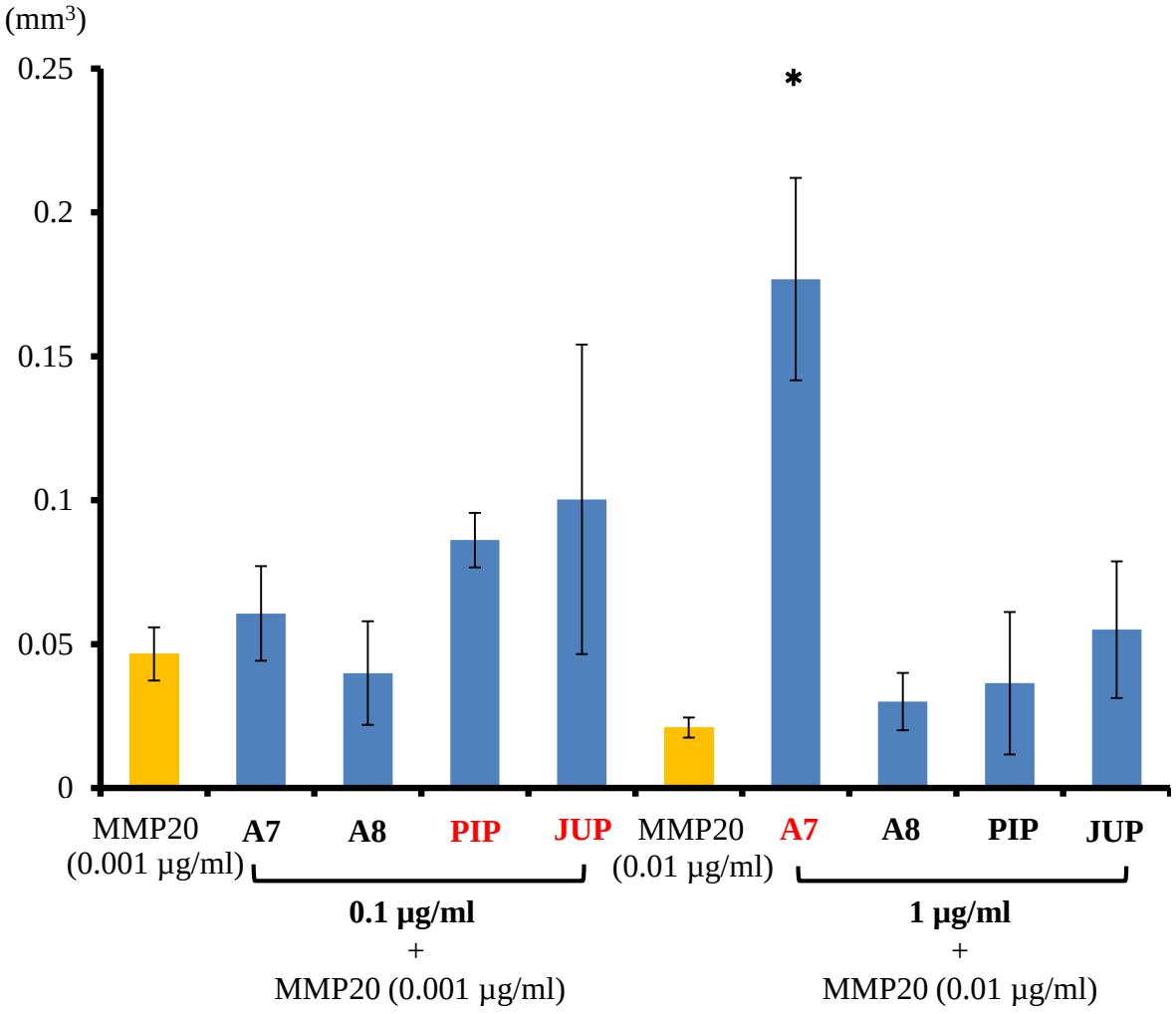


図8　歯髄創傷治癒を促進する可能性のある候補タンパクを用いた直接覆髄実験のマイクロ CT による第三象牙質の体積の定量評価

A7、A8、PIP および JUP (1 μg/ml または 0.1 μg/ml) を用いた直接覆髄により誘導された第三象牙質体積の定量結果を示す。各タンパク試料と反応させた MMP20 と同濃度の MMP20 含有 PBS をコントロールとして用いた。なお、図7 にて露髄面の完全な閉鎖を認めた試料は赤字で示す。
コントロールと比較し有意差がある試料を＊で示す。(One way ANOVA, Dunnett's test, $P < 0.05$)

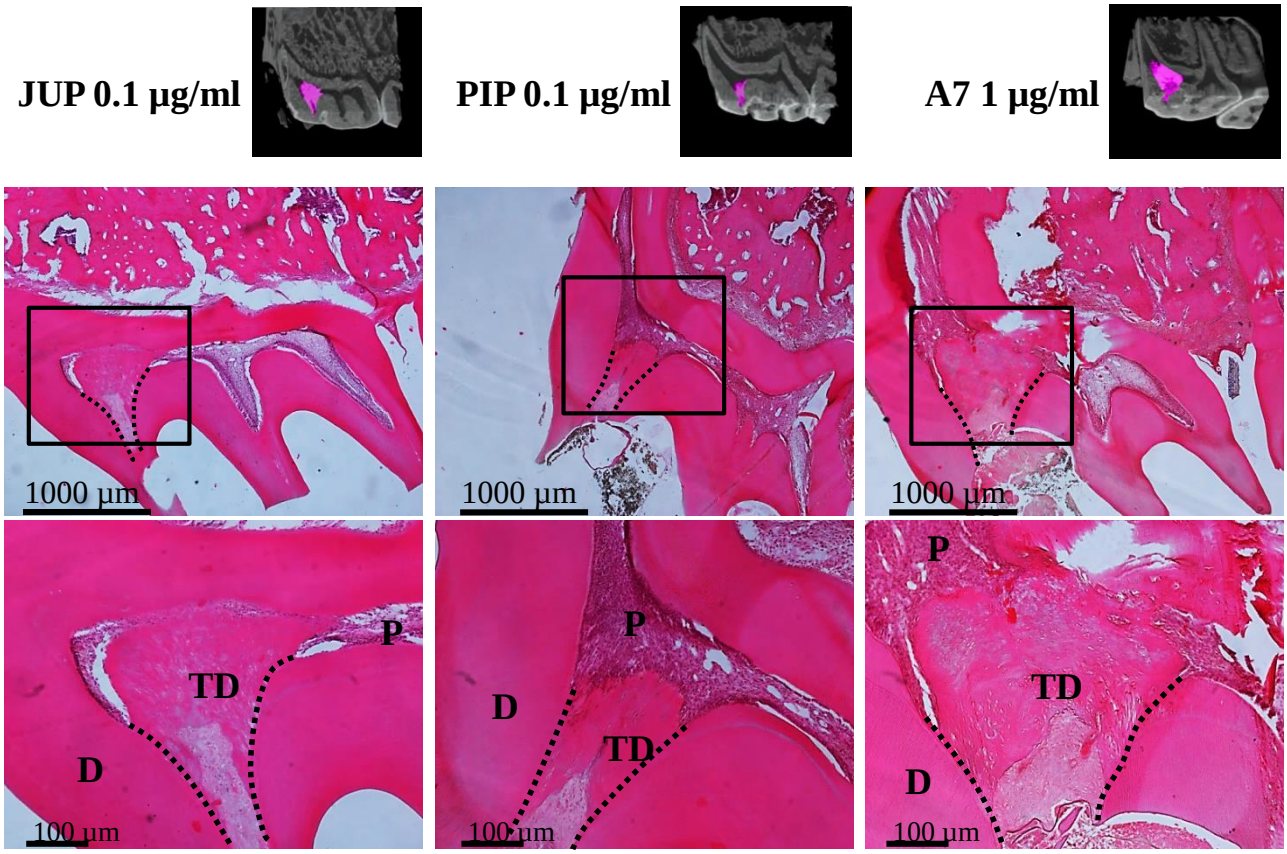


図9　歯髄創傷治癒を促進する可能性のある候補タンパクを用いた直接覆髄実験の病理組織学的評価

マイクロ CT にて露髄面を覆う第三象牙質が確認された試料 (図上部) のH-E染色像と四角で囲まれた部位の強拡大像を示す。
露髄部直下に本来存在した髄角と象牙質の境界を点線で示す。
P=pulp, D=dentin, TD=tertiary dentin

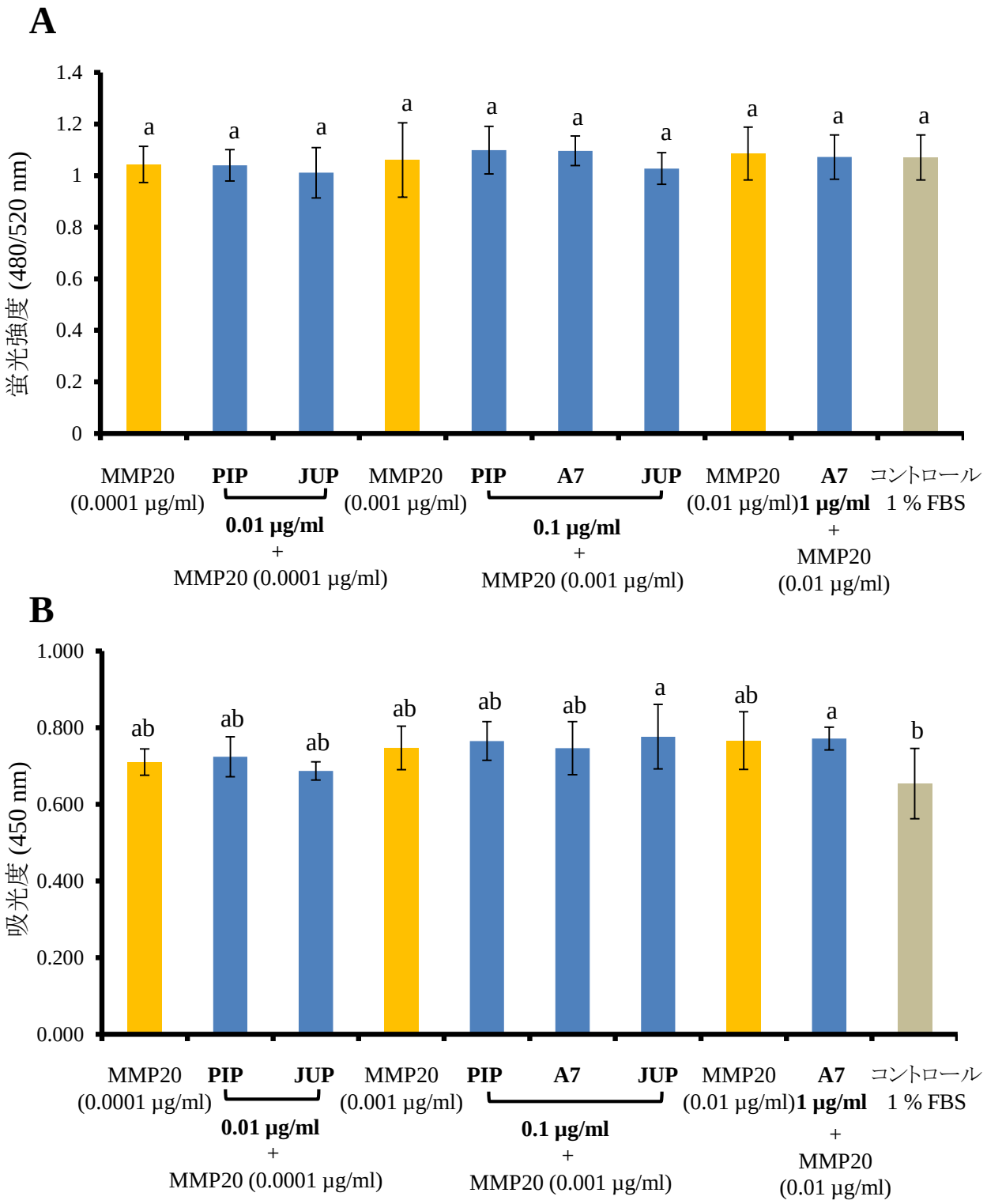


図10 歯髄創傷治癒を促進する可能性のある候補タンパクが歯髄細胞の遊走能および増殖能に与える影響の評価 (*in vitro*)

A7 (1 μg/ml または 0.1 μg/ml)、PIP および JUP (0.1 μg/ml または 0.01 μg/ml) が歯髄細胞の**A**:遊走能、**B**:増殖能に与える影響を示す。各タンパク試料と反応させた MMP20 と同濃度の MMP20 含有 PBS および1% FBS のみを含む培地をコントロールとして用いた。同一文字で示された群間に有意差がないことを示す (One way ANOVA, Tukey's test, $P < 0.05$)。

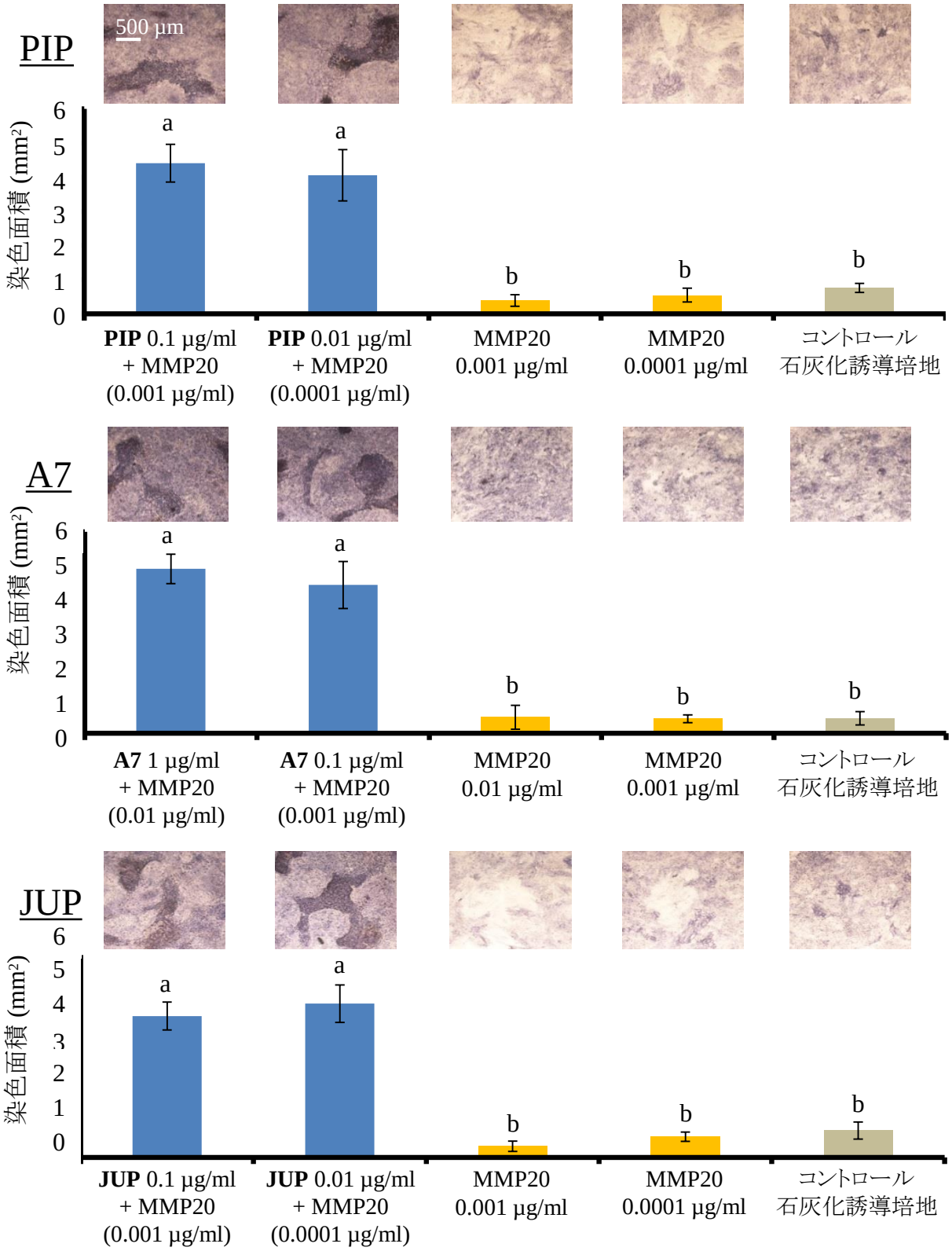


図11 歯髄創傷治癒を促進する可能性のある候補タンパクが歯髄細胞の分化能に与える影響の評価 (*in vitro*)

A7 (1 μg/ml または 0.1 μg/ml)、PIP および JUP (0.1 μg/ml または 0.01 μg/ml) が歯髄細胞の分化能に与える影響を示す。上段に染色画像、下段に定量結果を示す。各タンパク試料と反応させた MMP20 と同濃度の MMP20 含有 PBS および 1 % FBS のみを含む培地をコントロールとして用いた。同一文字で示された群間に有意差がないことを示す (One way ANOVA, Tukey's test, $P < 0.05$)。

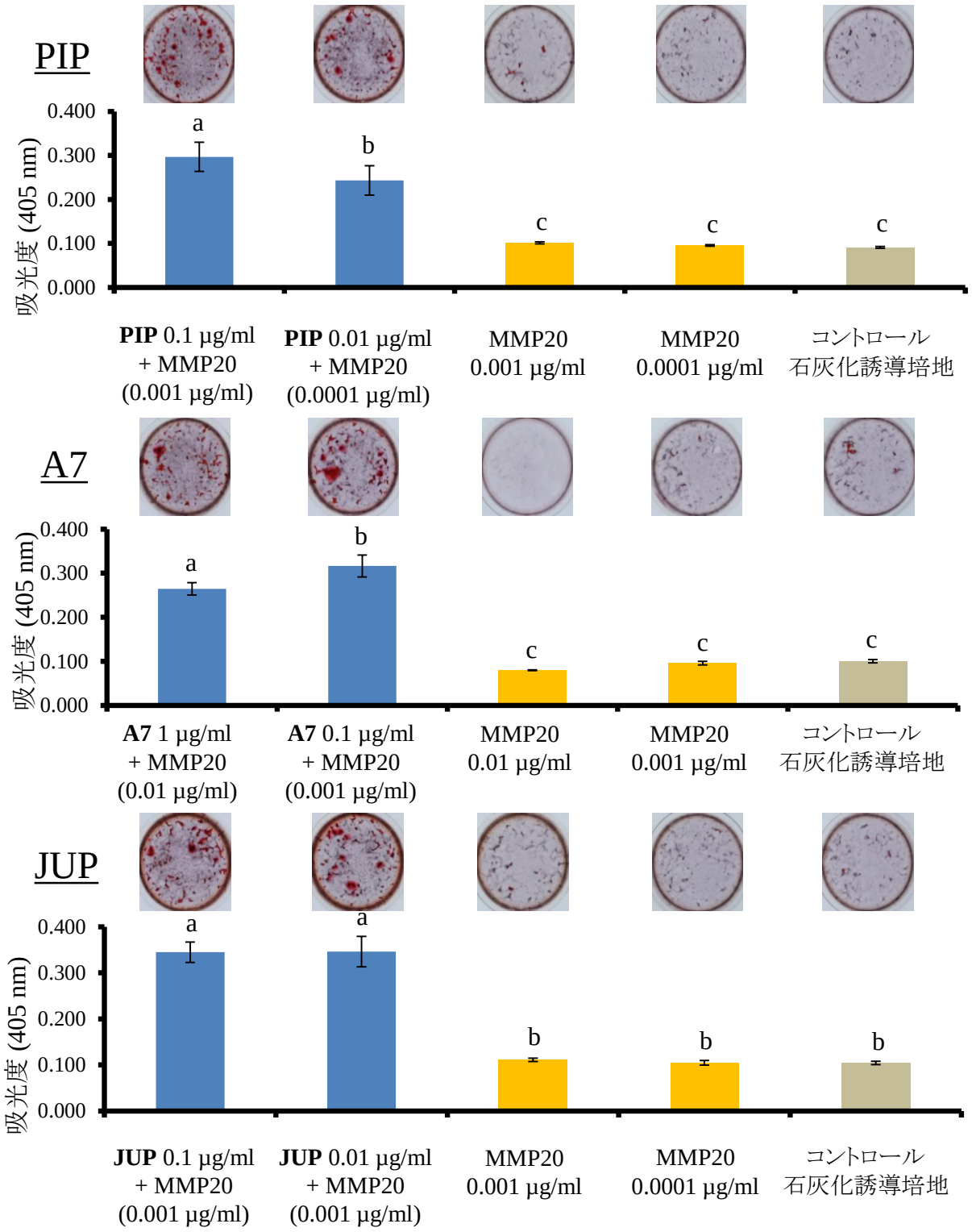


図12 歯髄創傷治癒を促進する可能性のある候補タンパクが歯髄細胞の石灰化能に与える影響の評価 (*in vitro*)

A7 (1 μg/ml または 0.1 μg/ml)、PIP および JUP (0.1 μg/ml または 0.01 μg/ml) が歯髄細胞の石灰化能に与える影響を示す。上段に染色画像、下段に定量結果を示す。各タンパク試料と反応させた MMP20 と同濃度の MMP20 含有 PBS および1% FBS のみを含む培地をコントロールとして用いた。同一文字で示された群間に有意差がないことを示す (One way ANOVA, Tukey's test, $P < 0.05$)。