OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	歯髄創傷治癒を促進するタンパク質の機能部位の探索
Author(s)	渡邉, 昌克
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82159
rights	This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage).
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　渡邉　昌克　）	
論文題名	歯髄創傷治癒を促進するタンパク質の機能部位の探索

〈緒言〉

進行したう蝕が象牙質に到達すると、歯髄組織に外部からの刺激が伝播される。この侵害刺激に対して、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働く。筆者の研究グループでは、これまで歯髄の創傷治癒メカニズムを検討した一連の研究において、象牙質の有機成分である象牙質基質タンパク質 (Dentin Matrix Components: 以下DMCs) がMatrix metalloproteinase-20 (以下MMP-20) によって分解を受け、生じたDMCs分解産物中のProtein S100A7 (以下S100A7) およびProtein S100A8 (以下S100A8) が歯髄の創傷治癒を促進することを明らかにした。しかし、タンパク質やその組換え体を覆髄材として用いることは安全性や経済性において問題があるため、Protein S100ファミリー由来の機能ペプチドを探索し、覆髄材に応用することで、上記の問題点を解決することができると着想した。本研究では、機能ペプチドを用いた生物学的覆髄材の開発を目指して、Protein S100ファミリーにおける機能部位の包括的な探索をおこなうことを目的とした。

〈材料と方法〉

実験１．第三象牙質形成過程のS100A7に対してMMP-20が与える影響の検討

MMP-20によって分解されたDMCs分解産物中からS100A7は同定されたが、S100A7がMMP-20によって分解を受けているかは不明であったことから、歯髄創傷治癒過程においてMMP-20がS100A7に与える影響を評価するために、直接覆髄実験をおこなった。8週齢雄性Wistar系ラットを対象に、S100A7のみをPBS中に溶解させた溶液とS100A7とMMP-20をPBS中にて反応させた溶液を、ゼラチンスポンジに浸漬させたものを用いて直接覆髄をおこない、マイクロCTによる画像解析と病理組織学的評価を実施した。試料数は3とした。(大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会承認番号：動歯28-005-1)

実験２. Protein S100ファミリー由来機能ペプチドの探索

S100A7、S100A8の機能部位は、構造・機能が類似したProtein S100ファミリーにおいて保存されている可能性が高いため、以下の方法にて機能ペプチドの探索を実施した。

1. データベースより複数の哺乳類のS100A7、S100A8、Protein S100A9 (以下S100A9) のアミノ酸配列を選択し、配列アライメントを実施、候補ペプチドの選出をおこなった。
2. 選出された候補ペプチドを、ペプチド合成器を用いてセルロース膜上に作成後、プレート内に静置し、ヒト歯髄幹細胞 (以下hDPSCs) を14日間分化誘導培地中で培養後、アリザリンレッド染色にて石灰化誘導能を評価した。試料数は9とし、コントロールとして石灰化誘導能を持たないランダム配列ペプチドと、骨形成能と歯髄創傷治癒を促進する報告がある Bone morphogenetic protein 由来ペプチドを用いた。

実験３. Protein S100ファミリー由来ペプチドが歯髄創傷治癒に与える影響の検討

実験２にて高い石灰化誘導能を示したペプチドが歯髄創傷治癒に与える影響を評価するために以下の実験をおこなった。

1. hDPSCsを各種濃度のペプチド存在下で2日間培養し、細胞毒性を評価するためにLDH assayをおこない、さらに継続して3日間培養後に細胞増殖能を評価するためにWST-1 assayをおこなった。試料数は6とし、コントロールとしてPBSを用いた (*in vitro*) 。
2. 各候補ペプチドを浸潤させたゼラチンスポンジを用いてラットに直接覆髄をおこない、マイクロCTによる画像解析と病理組織学的評価を実施した。試料数は8とし、コントロールとしてPBSもしくは候補ペプチドの由来タンパク質であるS100A8、S100A9を用いた (*in vivo*) 。

実験４. Protein S100ファミリー由来ペプチドの歯髄創傷治癒メカニズムの解析

実験３で得られたペプチドもしくはそのペプチドの由来タンパク質であるS100A8存在下でhDPSCsを7日間培養し、細胞膜および細胞質由来のタンパク質を抽出後、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を用いて、抽出されたタンパク質の同定ならびに定量をおこなった。同定された各タンパク質群についてGene Ontology (GO) 分類に基づいて解析をおこなった。コントロールとしてPBSを用いた。

〈結果と考察〉

実験１

S100A7単体もしくはMMP-20と反応させたS100A7を用いて直接覆髄後、4週目においてに形成された第三象牙質の体積をマイクロCTで定量・比較した結果、いずれの試料間で有意差は認められなかった (Student's *t*-test, $p>0.05$) 。また、H-E染色による病理組織学的評価でも両試料は類似した傾向を示し、歯髄創傷治癒過程におけるS100A7の機能にMMP-20は影響を及ぼさないことが示唆された。

実験２

1. 配列アライメントの結果、Protein S100ファミリーのアミノ酸配列中から相同性の高い部分が3箇所認められ、それらの領域より58種類の歯髄創傷治癒を促進する可能性のある候補ペプチドを選出した。
2. 候補ペプチドの中でhDPSCsの石灰化を促進したものを配列アライメントのペプチド選出領域と照合した結果、複数のペプチドが重複しているのが認められた。その重複した領域からS100A8由来2種類、S100A9由来2種類のペプチドが得られ、これらが機能的な配列である可能性が高いと考えられた。

実験３

1. 全てのペプチドがコントロールと比較して同等もしくは低い細胞毒性を示した (one-way ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$) 。細胞増殖能についても全てのペプチドとコントロールの間に有意差は認められなかった(Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$)。
2. 直接覆髄後4週目において、第三象牙質の体積を定量・比較したした結果、S100A8由来ペプチドのうち1種類を用いて覆髄をおこなった試料は、PBSを用いて覆髄をおこなった試料と比較し、有意に多くの第三象牙質の形成を認めた (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$) 。

実験４

LC-MS/MSによる分析後、GO分類に基づいて発現量に変化のあったタンパク質につて検討した結果、実験３で用いたペプチドおよびS100A8を用いた試料でコントロールよりも発現が上昇していたタンパク質として、Nuclear Factor-kappa B (NFκB) シグナル経路を促進する機能に関連するものが認められた。一方、コントロールと比較してペプチドとS100A8試料で発現が低下していたタンパク質として、Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) シグナル経路を促進する機能に関連するものが認められた。

以上の結果から、配列アライメントとペプチドスクリーニングを用いた機能ペプチドの選出および直接覆髄実験による検証の結果、S100A8由来の機能ペプチドが同定され、本ペプチドが歯髄創傷治癒を促進することが明らかとなった。得られた機能ペプチドはタンパク質の立体構造において表面に存在し、かつヘアピン部に該当していることが明らかとなり、他の分子と直接結合することで相互作用を及ぼし、機能を発揮する可能性が示唆された。さらに、得られた機能ペプチドはNFκBシグナル経路の関連タンパク質の発現を上昇させ、MAPKシグナル経路の関連タンパク質の発現を抑制することで第三象牙質形成を促進している可能性が示唆された。

〈結論〉

Protein S100A8由来の機能ペプチドが歯髄の創傷治癒を促進することが明らかとなり、生物学的覆髄材開発への端緒が得られた。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　渡邉　昌克　）			
	（職）		氏　名
論文審査担当者	主 査	教授	林　美加子
	副 査	教授	野田　健司
	副 査	准教授	北村　正博
	副 査	講師	宇佐美　悠

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯髄創傷治癒を促進する覆髄材の開発をめざして、Protein S100 ファミリーにおいて生物学的活性を有するペプチドを探索したものであり、その結果 Protein S100A8 由来の機能ペプチドが同定された。

以上の研究成果は、歯髄創傷治癒メカニズムに基づく覆髄材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。