



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)	渡邊, 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

学 位 論 文

歯髄創傷治癒を促進するタンパク質の
機能部位の探索

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）

渡邊 昌克

本論文の一部は、97th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research (2019 年 6 月、Vancouver, Canada) において発表した。

目次

I. 緒言	1
II. 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	
1) 材料および方法	
① S100A7 および MMP20 と反応させた S100A7 を用いた直接覆髄実験.....	10
② マイクロ CT による画像解析.....	11
③ 病理組織学的評価.....	12
④ 統計学的解析.....	12
2) 結果	12
III. Protein S100 ファミリー由来機能ペプチドの探索	
1) 材料および方法	
① 配列アライメントを用いた Protein S100 ファミリーのアミノ酸配列の相同性 の探索.....	14
② ペプチドアレイ法を用いた機能ペプチドのスクリーニング	15
2) 結果	
① 配列アライメントを用いた Protein S100 ファミリーのアミノ酸配列の相同性	

の探索.....	16
② ペプチドアレイ法を用いた機能ペプチドのスクリーニング	17
IV. 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	
1) 材料および方法	
① Protein S100 ファミリー由来ペプチドが hDPSCs への毒性および増殖能に与える影響の評価.....	19
② Protein S100 ファミリー由来ペプチドを用いた直接覆髄実験	20
③ 統計学的解析.....	21
2) 結果	
① Protein S100 ファミリー由来ペプチドが hDPSCs への毒性および増殖能に与える影響の評価.....	21
② Protein S100 ファミリー由来ペプチドを用いた直接覆髄実験	22
V. 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	
1) 材料および方法	
Protein S100 ファミリー由来ペプチドにより生じる歯髄創傷治癒過程におけるプロテオーム解析.....	24
2) 結果.....	27

VI. 考察	29
VII. 結論	40
VIII. 謝辭	41
IX. 参考文献	42
X. 図表	49

I．緒言

進行したう蝕が象牙質に到達すると、歯の最内層にある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[1-4]。

歯科臨床において、う蝕除去後や窩洞形成時に偶発的露髄をきたした際、直接覆髄法がおこなわれるが、本法の目的は、前述の創傷治癒機構を賦活し、歯髄を保護・修復することである。現在広く用いられている覆髄材として、水酸化カルシウム製剤や Mineral Trioxide Aggregate (MTA) をはじめとするケイ酸カルシウム系セメントが存在する[5, 6]。これらの覆髄材を用いて直接覆髄を行った場合の治療の成功率は、は、覆髄後 1 年以内の成功率は 75-100 % であるものが、3 年以上経過すると成功率は 37.6-98 % へと変化することが 23 文献を抽出した Aguilar らのシステマティックレビューで報告されているが[7]、この臨床成績にはまだ改善の余地はあると考えられる。そこで、直接覆髄法の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材の研究および開発がおこなわれており、高脂血症の治療薬であるシンバスタチンが歯髄細胞の分化を誘導するという報告や[8]、多糖類の一種であるキトサンを覆髄材として用いるという報告[9, 10]、さらにタンパク質を用いた報告では Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) [11]や Growth/differentiation factor 11 (Gdf11)

[12]、Delta-like 1 homolog (Dlk1) [13]などがある。しかし、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材は存在しない。

象牙質の約 20%を占める有機成分である象牙質基質成分 (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質である。後天的にう蝕や外傷などにより象牙質が傷害を受けることで、本来は象牙質中に不活性型として存在しているタンパク質分解酵素である Matrix Metalloproteinase (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 が分解を受ける[14-16]。

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・石灰化能を活性化することや、*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、さらに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報告されている [17]。さらに、MMP20 の作用により生じた DMCs 分解産物をプロテオーム解析することで同定された Protein S100A7 (S100A7) 、Protein S100A8 (S100A8) が、*in vitro* において歯髄細胞の増殖・分化・石灰化能を活性化し、*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たことより、S100A7、S100A8 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になった[18]。S100A7、S100A8 が属する Protein S100 ファミリーは、脊椎動物でのみ発現する、分子量が 8~14kDa 程度の低分子量タンパク質群である。Protein S100 ファミリーは細胞内に存在し、核酸や転写因子に結合することで機能するが、Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs、ダメージ関連分子パターン) の一つとして細胞の損傷や細胞死により細胞外に放出される場合もあり Receptor for Advanced Glycation end-products (RAGE) や Toll-Like Receptor 4 (TLR4) 、G タンパク質共役受容体、スカベンジャー受容体等の細胞表面に存在する膜受容体に結合することでも機能する[19]。細胞外に存在する Protein S100 ファミリーは、細胞増殖、分化、遊走、組織の炎症の調節をおこない、抗菌作用も有する[20]。さらに、S100A7、S100A8、S100A9 は象牙質に存在するという報告があり[18, 21]、ヘテロダイマーである S100A8/9 で処理した間葉系幹細胞によってマウス皮膚創傷モデルの治癒が促進されたという報告や[22]、S100A8 および S100A9 が骨芽細胞や軟骨細胞の分化を促進するという報告もある[23]。以上のことから、Protein S100 ファミリーは歯髄の創傷治癒を促進する作用を持つことが示唆されており、本タンパク質を覆髄材として用いることができれば、生理学的な歯髄創傷治癒を促進する材料の開発が可能になると考えた。

しかし、タンパク質の組替え体として覆髄材に用いるには様々な問題がある。例えば、タンパク質の精製は技術的に煩雑で、高い精製度を達成するのは困難であり、さらに S100A7 のようなジスルフィド結合をもつタンパク質は、通常の大腸菌を用いた方法では

精製過程において問題が生じやすく、リフォールディングなどの特別な方法が必要になる可能性がある[24]。また、タンパク質精製には高額な費用が必要であり、精製過程において遺伝子組換え生物を用いるため、安全面での懸念があることや、タンパク質は保管のための温度条件が厳しいことなども挙げられる。そこで本研究では、このような問題を解決するために、タンパク質の機能配列部分のみを抽出したペプチドを用いることを着想した。ペプチドであれば、化学合成で作成できるため、安価に、製造ロットによる差もなく、さらに長期保管や冷凍保存も可能である上に、凍結乾燥粉末にすれば冷蔵保存もできるため、組換えタンパク質を用いた場合の問題点を解決することが可能となる[25, 26]。これまでにペプチドを用いた覆髄材の開発・研究として、ビーグル犬の直接覆髄モデルにてエナメル上皮に存在する Copine-7 (Cpne7) 由来のペプチドを用いることで、象牙細管状構造をもつ第三象牙質を形成したという報告や[27]、象牙質特異的なタンパク質である Dentin sialophosphoprotein (DSPP) のアミノ酸配列をペプチドとして用いた報告などが存在する[28-30]。しかし Cpne7 由来ペプチドは、カルシウム結合能を持つ機能配列近傍のリンカー領域を用いたものと報告されているものの、その選出方法の根拠については不明である。また DSPP 由来ペプチドはアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) 配列周辺を用いており、RGD 配列は細胞との接着に関与すると報告されているものの、歯髄創傷治癒過程における機能を特異的に活性化するような配列を選出しているとは言えない。

以上の背景から、これまでの一連の先行研究において歯髄創傷治癒の過程で発現し、歯

髄創傷治癒を促進することが明らかとなっている **Protein S100** ファミリーから、先端的なスクリーニング法で機能ペプチドを選出し、歯髄の創傷治癒を促進する生物学的根拠に基づくペプチド覆髄材を開発することを目的とした。

Ⅱ．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

先行研究[18]において、DMCs と MMP-20 を反応させ得られた DMCs 分解産物をプロテオーム解析することで S100A7 は同定されたが、その際、S100A7 が MMP-20 によって分解を受けて断片化した結果、歯髄創傷治癒を促進しているのか、もしくは S100A7 が全長のまま機能しているのかについては不明であった。そのため、歯髄創傷治癒過程において S100A7 が MMP-20 によって影響を受けているかを評価するため、以下の実験を行った。

1) 材料および方法

① S100A7 および MMP20 と反応させた S100A7 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：28-013-0）。

8 週齢雄性 Wistar 系ラットに全身麻酔として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) の腹腔内注射をおこない、疼痛緩和のためカルプロフェン（Rimadyl[®]、Pfizer、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、歯面および周囲組織をアルコール綿球にて清拭後、窩洞形成を Komichi らの報告[18]をもとに以下の方法でおこなった。左右上顎第一臼歯に対して電気エンジン

(VIVAMATE G5[®], NSK, 栃木) に装着したラウンドバー (#1, Dentsply Maillefer, スイス) を用い、咬合面より近心髄角に露髄するような実験的窩洞を形成した。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、S100A7 (PROSPEC, Israel) を 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で含有したダルベッコ-リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, ナカライテスク, 京都) もしくは、同溶液を MMP-20 (フナコシ, 東京) で処理 (0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の MMP-20 を添加後 37°C にて 24 時間静置) した溶液を、それぞれ 20 μl 浸漬させたゼラチンスポンジ (Spongel[®], アステラス製薬, 東京) を用いて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, 京都) 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、以下の方法で評価をおこなった。試料数は各条件につき 3 とした。

② マイクロ CT による画像解析

直接覆髄後の試料について、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。被験歯の断層撮影は管電圧 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、上顎第一臼歯の水平断面を XY 平面、矢状断面を YZ 平面、前頭断面を ZX 平面と

し、YZ 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。各断面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。

③ 病理組織学的評価

マイクロ CT 解析に用いた試料を、4 %パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて 12 時間、4°C にて浸漬固定後、カルキトックス (富士フイルム和光純薬, 大阪) 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、回転式マイクロトーム (RM 2155, Leica, ドイツ) にて厚さ 5 μm の連続切片を作成後、ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色を行った。第三象牙質の病理組織学的評価は光学顕微鏡 (BZ-X700, KEYENCE, 大阪) 下にておこなった。

④ 統計学的解析

マイクロ CT 撮影後、画像解析にて計測した第三象牙質の体積の比較について、統計学的有意差検定に Student's *t*-test を用いて危険率 5 %で評価した。

2) 結果

マイクロ CT 解析の結果、S100A7 単体もしくは MMP20 と反応させた S100A7 を覆髄材として用いた場合の双方において、露髄部を完全に覆う第三象牙質形成が観察された (図 1A)。

形成された第三象牙質の体積を定量・比較した結果、それぞれの試料間で有意差は認められなかった ($p > 0.05$) (図 1B)。

マイクロ CT 解析にて露髄面の閉鎖が認められた試料についておこなった H-E 染色像から、双方の試料において第三象牙質内に微小な欠損は認めるものの、歯髄側と歯冠側が交通するような大きい欠損は認めず、形成された第三象牙質による露髄面の完全閉鎖が確認された (図 2)。

III. Protein S100 ファミリー由来機能ペプチドの探索

Komichi らの報告で[18]、S100A7 もしくは S100A8 の組換え体を覆髄材としてラットを対象に直接覆髄実験を実施すると、どちらの覆髄材を用いた場合でも第三象牙質形成を促進したことから、歯髄の創傷治癒に影響を与えるタンパク質の機能配列は Protein S100 ファミリーの間で保存されているアミノ酸配列に該当する可能性がある。またヒト由来の Protein S100 を用いてラットを対象に直接覆髄実験をおこなったにも関わらず、歯髄創傷治癒を促進したことから、異なる動物種においても保存されている Protein S100 由来のアミノ酸配列が機能を発揮する可能性が高いと考えられる。そのため、Protein S100 ファミリー間で保存されている機能配列の探索を目的として、以下の実験をおこなった。

1) 材料および方法

① 配列アライメントを用いた Protein S100 ファミリーのアミノ酸配列の相同性の探索

DMCs においてその存在が報告されており、かつ歯髄創傷治癒への関与が示唆されているタンパク質である S100A7、S100A8、S100A9 の 3 種類を用い、さらに S100A7 については Polar bear、Brandt's bat、Chinese tree shrew、Black flying fox、David's myotis、Human、Bovine、Horse の 8 種、S100A8 は Human、Bovine、Mouse、Rat の 4 種、また S100A9 は Human、Bovine、Rabbit、Mouse、Rat の 5 種の哺乳類のアミノ酸配列を

対象として相同性の高い領域を検索するため、配列アライメントを実施した。比較検討を実施したアミノ酸配列は、タンパク質のアミノ酸配列に関する情報を網羅的に収集したデータベースである Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) に登録されているものを用い、配列アライメントはマルチプルアライメントプログラムである CLUSTAL-W (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) を用いて実施した。

② ペプチドアレイ法を用いた機能ペプチドのスクリーニング

配列アライメントにて得られた S100A7、S100A8 および S100A9 のアミノ酸配列の相同性が高い領域の中から、機能ペプチドのスクリーニング法であるペプチドアレイ法にて用いる候補ペプチドをヒト Protein S100 のアミノ酸配列から選出した[31]。ペプチドのアミノ酸残基数の決定にあたり、現在約 100 種類以上存在するペプチド医薬品の約 80%は 10 残基以内のペプチド医薬品であること[32]、また骨芽細胞上の Receptor Activator of Nuclear factor-Kappa B Ligand (RANKL) に結合して骨形成シグナルを促進することが報告されている W9 ペプチド (アミノ酸配列:YCWSQYLCY) が 9 残基から構成されていること[33]等の情報から、本研究においても 9 残基を用いることとした。

上述の条件にて選出された候補ペプチドの機能についてスクリーニングすることを目的に、Kanie らの報告に基づいてペプチドアレイ法をおこなった[31]。ペプチド合成器 (ASP222, Intavis, ドイツ) を用いて、セルロース膜上に Fmoc 固相合成法にてペプチドを合

成し、96 well プレート内に静置した。同プレートにヒト歯髄幹細胞 (hDPSCs, Lonza, スイス) を 5,000 cells/well となるように播種し、石灰化誘導培地 (50 μ g/ml アスコルビン酸 (Sigma Aldrich, 米国), 10 mM β -グリセロリン酸 (Sigma Aldrich), 10 %FBS 含有 Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification (α -MEM)) を用いて 37°C、5 %CO₂ 気相下で 14 日間培養をおこなった。培地の交換は 3 日毎におこなった。培養開始 14 日後に培溶液を除去、PBS にて洗浄し、10 %中性緩衝ホルマリン液 (富士フイルム和光純薬, 大阪) にて 30 分間固定した後、石灰化評価セット(PG Research, 東京)を用いてアリザリンレッド溶液で 30 分間染色をおこない、精製水にて洗浄後、同キットの石灰化結節溶解液を加え 10 分間攪拌し、色素が溶出した上清を用いて細胞の石灰化能について定量評価をおこなった。評価にはマイクロプレートリーダー (ARVO MX, PerkinElmer, 米国) を用い 450 nm における吸光度を測定し評価した。試料数は各条件につき 9 とした。ネガティブコントロールとして石灰化誘導能を持たないことがわかっているランダムペプチド (アミノ酸配列:KHHAKVGSA)、ポジティブコントロールとして骨形成能を持つことが報告されており、歯髄創傷治癒も促進する Bone morphogenetic protein (BMP) 由来ペプチド (アミノ酸配列:TLVNSVNSK) を用いた[31, 34]。

2) 結果

① 配列アライメントを用いた Protein S100 ファミリーのアミノ酸配列の相同性の探索

S100A7、S100A8、S100A9 の 3 種類のタンパク質について、複数の哺乳類のアミノ酸配列を対象として、相同性の高い領域を検索するため配列アライメントを実施した。その結果、黄色で示す領域に相同性の高い部分が 3 箇所認められ (図 3A、B、C)、これらの領域から、次におこなうペプチドアレイ法に用いる候補ペプチドを選出することとした。候補ペプチドの選出の詳細を図 4 に示す。配列アライメント (図 3) において、ヒト Protein S100 (赤文字) のアミノ酸配列の相同性が高い領域 (水色) の中から 9 残基を選び、候補ペプチドとした。その候補ペプチドから 3 残基ずつずらしたのも同様に候補ペプチドとし、全ての赤枠で囲んだ黄色の領域から計 58 種類の候補ペプチドを選出した (表 1)。

② ペプチドアレイ法を用いた機能ペプチドのスクリーニング

58 種類の候補ペプチド存在下における hDPSCs の石灰化能の定量結果を図 5 に示す。図 5A の中で、hDPSCs の石灰化を誘導する上位 10 種のペプチドを赤色で示し、これら 10 種のペプチドを配列アライメントのペプチド選出領域の結果と照合した結果を図 5B に示す。図 5B 中の 2 箇所の黒枠で囲んだ領域において、hDPSCs の石灰化促進を示したペプチドが多く重複しているのが認められた。その重複した領域から、図 5B-b 中の領域から S100A8 由来のペプチド (アミノ酸配列: KLLTECPQ, 以下 No. 1 ペプチド) と S100A9 由来のペプチド (アミノ酸配列: ELVRKDLQN, 以下 No. 2 ペプチド) を、図 5B-c 中の領域から S100A8 由来のペプチド (アミノ酸配列: NTDGAVNFQ, 以下 No. 3 ペプチド) と S100A9

由来のペプチド (アミノ酸配列: NADKQLSFE, 以下 No. 4 ペプチド) の 4 種類のペプチド
が機能的な配列となる可能性が高いと考え、以降の実験にて検証をおこなうこととした。

IV. 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

これまでの実験にて抽出された Protein S100 ファミリー由来機能ペプチド No.1、2、3 および 4 が歯髄創傷治癒に与える影響を調べるために、以下の実験をおこなった。

1) 材料および方法

① Protein S100 ファミリー由来ペプチドが hDPSCs への毒性および増殖能に与える影響の評価

No. 1 から 4 の 4 種類のペプチドを、0.1、1、10、100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加した 10 %FBS 含有 α -MEM 培地に hDPSCs を 5,000 cells/well となるように 96 well プレートに播種し、37°C、5 %CO₂ 気相下で 2 日間培養した。培養液上清を採取し、LDH Cytotoxicity Detection Kit (タカラバイオ, 滋賀) を用いて LDH-assay をおこなった。採取した培養液上清に試薬を添加し、37°C、5 %CO₂ 気相下で 30 分静置した。その後、マイクロプレートリーダー (ARVO MX) を用いて 405 nm における吸光度を測定した。さらに継続して同細胞を 1 日培養後、Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (タカラバイオ) を用いて WST-1-assay をおこなった。WST-1 試薬を培養液中に添加し、37°C、5%CO₂ 気相下で 30 分静置した。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) を用いて 450 nm

における吸光度を測定した。コントロールとして、PBS を培養液中に添加したものを
用い、試料数は各条件につき 6 とした。

② Protein S100 ファミリー由来ペプチドを用いた直接覆髄実験

Protein S100 ファミリー由来ペプチドが第三象牙質形成能に与える影響を評価するために
「Ⅱ－材料および方法①」と同様の手法で、100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で No. 1 から No. 4 の各ペ
プチドを含有した PBS 溶液をそれぞれ 20 μl 浸漬させたゼラチンスポンジ (Spongel[®]) を用い
てラット臼歯を対象とした直接覆髄実験をおこなった。コントロールとしてペプチドの由
来タンパク質の組換え体である S100A8 (PROSPEC, イスラエル)、S100A9 (PROSPEC)
を 1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で含有した PBS 溶液および PBS 溶液のみを用いた。覆髄処置から 4 週間
経過後、露髄部直下に形成された第三象牙質についてマイクロ CT 撮影ならびに画像解析
を実施し、Okamoto らが過去に実施した直接覆髄実験で、病理組織像より観察された第三
象牙質の形成量をスコアリングしていた評価方法を、本研究ではマイクロ CT の画像に応
用し、形成された第三象牙質のスコアリングにて評価をおこなった[35, 36]。スコアは、露
髄部の 1/3 以下のエリアにのみ第三象牙質が形成されたものを Grade 0、露髄部の 1/3~2/3
のものを Grade 1、露髄部の 2/3 以上のものを Grade 2、露髄部を完全に覆う第三象牙質形
成を認めるものを Grade 3 として一人の術者が評価をおこなった。これに加えて「Ⅱ－材
料および方法②」と同様の手法で同じマイクロ CT 画像の解析をおこない、形成された第

三象牙質の体積の評価をおこなった。また「Ⅱ－材料および方法③」と同様の手法で H-E 染色を実施し、第三象牙質形成について病理組織学的評価をおこなった。試料数は各条件につき 8 とした。

③ 統計学的解析

上記の実験における統計学的有意差検定は、細胞毒性試験に One-way ANOVA, Tukey's test、細胞増殖試験および直接覆髄実験における第三象牙質形成量の比較には Kruskal-Wallis-test を用い、危険率 5 % で評価した。

2) 結果

① Protein S100 ファミリー由来ペプチドが hDPSCs への毒性および増殖能に与える影響の評価

各ペプチドの細胞毒性について LDH-assay により検討した結果、No. 1 および No. 2 ペプチドでは全濃度の試料で、No. 3 ペプチドでは 1 $\mu\text{g/ml}$ 、No. 4 ペプチドでは 100 $\mu\text{g/ml}$ および 10 $\mu\text{g/ml}$ を用いた試料において、コントロールと比較し有意に低い細胞毒性を示した ($p < 0.05$) (図 6A)。その他の試料ではコントロールとの間に有意差は認めなかった ($p > 0.05$)。

一方、各ペプチドが細胞増殖能に与える影響については、全ての試料でコントロールとの間に有意差は認めなかった ($p > 0.05$) (図 6B)。

これらの結果から、No. 1 から 4 全てのペプチドが PBS と同等の細胞毒性を呈し、また細胞増殖にも影響を与えないことが明らかになった。本結果を踏まえて、100 $\mu\text{g/ml}$ のペプチドを用いてラットを用いた直接覆髄実験をおこない、各ペプチドの機能を *in vivo* で検討することとした。

② Protein S100 ファミリー由来ペプチドを用いた直接覆髄実験

覆髄後に形成された第三象牙質をスコア化した結果を表 2 に示す。No. 1 ペプチドを用いて覆髄を行った結果、5 つの試料において露髄部を完全に封鎖するような第三象牙質形成を認めたのに対し、他のペプチドを用いた場合は露髄部を完全に封鎖するのは 0 もしくは 1 試料のみであった。コントロールとして S100A8 組換えタンパク質を用いた場合は露髄部の完全封鎖は 1 試料で、S100A9 では 2 試料、PBS では 0 試料であった。

また、第三象牙質の体積を定量した結果、No. 1 ペプチドを用いて覆髄を行った試料は No. 2 ペプチドもしくは、PBS を用いて覆髄を行った試料と比較し、有意に多くの第三象牙質の形成を認めた ($p < 0.05$) が、その他の試料とは有意差を認めなかった ($p > 0.05$) (図 7)。

マイクロ CT 解析に用いた試料について H-E 染色をおこなった代表的な結果を図 8 に示す。完全な第三象牙質形成を認めた No. 1、3 および 4 ペプチドの試料において第三象牙質内に微小な欠損は認めるものの、歯髄側と歯冠側が交通するような欠損は認めず、形成された第三象牙質による露髄面の完全閉鎖が確認された。S100A8、S100A9 の試料においても、

歯冠側と歯髄側が交通するような欠損は認めず、形成された第三象牙質による露髄面の完全閉鎖が確認されたが、ペプチドを用いた試料と比較して第三象牙質は疎な構造を示した(図 8)。

V. 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

直接覆髄実験で良好な結果を示した Protein S100 ファミリー由来ペプチドが、歯髄創傷治癒を促進したメカニズムについて検討するために、No. 1 ペプチドと歯髄細胞の相互作用を惹起させ、歯髄細胞が発現するタンパク質の変化について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) で解析をおこなった。

1) 材料および方法

Protein S100 ファミリー由来ペプチドにより生じる歯髄創傷治癒過程におけるプロテオーム解析

No. 1 ペプチドもしくは No. 1 ペプチドの由来タンパク質である組換え S100A8 を hDPSCs と作用させることで、hDPSCs が発現するタンパク質の比較ならびに定量を LC-MS/MS にて実施した。No. 1 ペプチドと S100A8 の濃度を 0.1 mM とした試料を用いて、それぞれの試料を含有した石灰化誘導培地に hDPSC を 3,000,000 cells/plate となるよう 100 mm 細胞培養皿に播種し 37°C、5 %CO₂ 気相下で 7 日間培養した。その後、細胞膜タンパク抽出キット (コスモバイオ, 東京) を用いて、細胞膜タンパク質と細胞質タンパク質を抽

出した。実際の手順としては、hDPSCs を 7 日間培養後、スクレイパーにて回収し、同キットの **Buffer A** を添加し氷上にて 10 分静置した。その後、キット付属のフィルターカートリッジ付きマイクロチューブに移し、14,000 rpm で 30 秒間遠心分離をおこなった。カートリッジを破棄し 10 秒間攪拌後、3000 rpm で 1 分間遠心分離をおこない、上清を採取した。次に採取した上清を 14,000 rpm で 30 分間遠心分離をおこなうことで上清が細胞質タンパク質、ペレットが細胞膜タンパクと分離されたものを抽出した。コントロールとして PBS を添加した石灰化誘導培地で培養した hDPSCs を用いた。

液体クロマトグラフィーは UltiMate 3000 Nano LC systems (Thermo Fisher Scientific, 米国)、ESI-column (0.075 x 150 mm) (Thermo Fisher Scientific) を用いて、各試料の分析をおこなった。移動相はアセトニトリル含有 0.1 % ギ酸水溶液を用い、流速は 300nL/min とし、最初の 5 分は 5% のアセトニトリル含有 0.1% ギ酸水溶液の濃度で流し、続いて 95 分間で 40% まで上昇させ、その後 2 分間一定の割合でアセトニトリルの濃度を増加、90 % まで上昇させ、5 分間維持した。ペプチドの分析は Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) を用いた。得られた MS/MS スペクトルに対し Mascot Distiller v2.5, Mascot Server v2.5 (Matrix Science, 米国) 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ってタンパク質の同定、および定量解析をおこなった。

さらに、タンパク質の発現量の変化を評価するために、同定された細胞膜由来タンパク質、細胞質由来タンパク質の各試料間で以下の条件で絞り込みをおこなった。

〈コントロール群と比較してペプチド群、S100A8 群で発現量が増加したタンパク質の絞

り込み条件〉

- ・ S100A8 群での計測値がコントロール群と比較して高かったタンパク質
- ・ ペプチド群／コントロール群の比率が 2 倍以上のタンパク質
- ・ ペプチド群、S100A8 群の両群の計測値が 1 (a.u. ; arbitrary unit) 以上のタンパク質

〈コントロール群と比較してペプチド群、S100A8 群で発現量が減少したタンパク質の絞

り込み条件〉

- ・ S100A8 群での計測値がコントロール群と比較して低下していたタンパク質
- ・ コントロール群／ペプチド群の比率が 2 倍以上のタンパク質
- ・ コントロール群の計測値が 1 (a.u.) 以上のタンパク質

上記の条件により絞り込んだ各群を Gene Ontology (GO) 分類を用いて解析をおこなった。

GO には国際的に標準化された GO Term が存在し、これは生物学的機能を表現することを

目的としている。GO Term は階層構造によって成り立っており、上位の階層は一般的な機

能表現、下位はより詳細な機能表現である。例えば、最上位には”Molecular function”、

“Biological process”、“Cellular component”の三つのカテゴリーが存在する[37]。

本実験により得られたタンパク質群について、上記のカテゴリーからそれぞれの機能を

表現する”Molecular function”と”Biological process”に属する GO Term を検索し、各タンパク

質群に特徴的な機能について検討をおこなった。

2) 結果

Protein S100 ファミリー由来ペプチドにより生じる歯髄創傷治癒過程におけるプロテオーム解析

LC-MS/MS による分析をおこなった結果、細胞膜由来タンパク質は 1833、細胞質由来タンパク質は 1557 同定された。

各絞り込み条件に従い、発現量に変化のあったタンパク質について検討した結果、細胞膜由来タンパク質においてコントロールよりも No.1 ペプチドおよび S100A8 で発現量が上昇したタンパク質が 158 抽出され、逆に発現量がコントロールよりも低下したタンパク質は 97 あった。同様に、細胞質由来タンパク質でコントロールよりも上昇したタンパク質は 250、減少したタンパク質は 67 検出された。

次に絞り込んだタンパク質群から、それぞれのタンパク質がもつ GO Term を検索、特徴的な機能の検討をおこない、以下の結果が得られた (表 3)。まずコントロールと比較して No. 1 ペプチドと S100A8 を用いた試料で発現が上昇したタンパク質について、特徴的に見出されたものとして Nuclear Factor-kappa B (NFκB) シグナル経路を促進する機能に関連する GO Term 持つタンパク質が認められた。具体的には、細胞膜由来タンパク質において、Flotillin-1 (FLOT1)、Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase (3KCR1)、Protein LYRIC (LYRIC)、Gap junction alpha-1 protein (GJA1) が、細胞質由来タンパク質か

らは、Protein S100A13 (S100A13) 、 Nucleolar protein 3 (NOL3) が得られた。一方、No. 1 ペプチドと S100A8 を用いた試料で発現が減少したタンパク質のうち、特徴的に見出されたものとして Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) シグナル経路を促進する機能に関連する GO Term を持つタンパク質が認められた。具体的には、細胞膜由来タンパク質から Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP2K1) 、 Cadherin-2 (CDH2) 、 GTPase Nras (NRAS) 、 Mitogen-activated protein kinase 1 (MAP1) 、一方、細胞質由来タンパク質からは Adapter molecule crk (CRK) 、 Proteasome subunit beta type-7 (PSMB7) が得られた。

VI. 考察

歯髄創傷治癒過程において、歯髄に存在する歯髄幹細胞が象牙芽細胞様細胞に分化し第三象牙質を形成するが、関連する分子やシグナル経路などの詳細は未だ解明されていない。直接覆髄法は、歯髄組織に元来備わっている自己創傷治癒メカニズムを賦活化することと、う蝕除去時や外傷時などに偶発的な露髄が発生した際に、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た治療法である[1-5]。歯科臨床では、水酸化カルシウム製剤や Mineral Trioxide Aggregate (MTA) をはじめとするケイ酸カルシウム系セメントを用いて直接覆髄がおこなわれているが、これらは硬組織形成を主眼としたカルシウムやリンの供給源として機能しているものの、歯髄の創傷治癒機転を積極的に誘導する材料ではないため、歯髄創傷治癒機転を分子レベルで促進しているとは言えない[5, 6]。

そこでわれわれは、歯髄創傷治癒の分子的なメカニズムに立脚した覆髄材の開発を目的として、象牙質の約 20%を占める有機成分である DMCs に着目してきた[17, 18]。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、外因性の刺激で活性化されるタンパク質分解酵素である MMP 分子により DMCs が分解を受け[14-16, 38]、DMCs 分解産物が歯髄創傷治癒を促進することが報告されている[39]。特に DMCs が MMP-20 により分解され、生じた DMCs 分解産物に含まれる S100A7、S100A8 は *in vitro* において歯髄細胞の機能を促進し、さらには *in vivo* においても象牙質-歯髄複合体の創傷治癒を促進した

ことから、歯髄創傷治癒に関わる分子の一つであると考えられる[17, 18]。

歯髄創傷治癒に関わる分子の一つである S100A7 については、DMCs が MMP-20 によって分解され機能する際、S100A7 が MMP-20 によって分解を受けて断片化した結果、歯髄創傷治癒を促進しているのか、もしくは S100A7 が全長のまま機能しているのかについてはこれまで不明であった。そのため、まず本研究では歯髄創傷治癒過程において S100A7 が MMP-20 に影響を受けているかを評価するため直接覆髄実験をおこない、マイクロ CT による画像解析と病理組織学的評価にて検討をおこなった。形成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、従来よりおこなわれてきた病理組織学的な一断面のみの評価と比較し、より客観的かつ三次元的な評価が可能となり、第三象牙質の体積の定量評価も可能となったが[35]、マイクロ CT の解像度以上の第三象牙質の微小構造の評価は不可能なため、本研究では病理組織学的検討と併せて評価をおこなった。その結果、S100A7 単体もしくは MMP20 と反応させた S100A7 を覆髄材として用いた場合の双方において、露髄部を完全に覆う第三象牙質形成が観察され (図 1A) 、形成された第三象牙質の体積を定量解析した結果、それぞれの試料間で有意差は認められなかった (図 1B) 。また、マイクロ CT 解析にて露髄面の閉鎖が認められた試料について病理組織学的に評価したところ双方の試料において第三象牙質内に微小な欠損は認めるものの、全切片において歯髄側と歯冠側が交通するような欠損は認めず、形成された第三象牙質によって露髄面の完全閉鎖が観察された (図 2) 。また、SDS-PAGE を用いた S100A7 のプロファイル解析では MMP-

20によって分解されていないことも報告されている[40]。これらの結果から、S100A7はMMP-20の影響を受けずに歯髄に作用し歯髄創傷治癒を促進していることが示唆された。MMP-20は腎臓や唾液腺、そして歯において発現することが報告されている[41, 42]一方で、口腔癌と関連するという報告がある[43]。歯に関しては、MMP-20はエナメル質の成熟に寄与するタンパク質を分解することで歯の形成・成熟に大きな役割を担っていると言われており、その中でもエナメル質の成熟において最も重要なタンパク質の一つであるアメロゲニンを分解されている[44-46]。その分解反応が生じる過程で、MMP-20がアメロゲニンのセリン-ロイシン、グルタミン酸-ロイシンの配列を認識し、それぞれのアミノ酸の間で選択的に分解活性を有することが知られている[47]。一方で、S100A7、S100A8のアミノ酸配列にもセリン-ロイシン、グルタミン酸-ロイシンというMMP-20による切断の認識配列が含まれるが、タンパク質の立体構造情報に基づいて検討すると、この配列はいずれもタンパク質の表面に存在していないため、外因性にMMP-20が認識するのは物理的に困難であると考えられた。すなわち、本研究においてもMMP-20がS100A7中の切断可能な配列を認識することができずに分解できなかった可能性が示唆された。同様にS100A8の分子表面にもセリン-ロイシン、グルタミン酸-ロイシン配列が存在しないため、MMP-20で分解を受けず機能していると推察された。また、本研究で覆髄材の担体として用いられ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ことより[48]、直接覆髄実験にて新たに形成された第三象牙質

は、S100A7 の影響を主に受けた結果であると考えられる。

次に Protein S100 ファミリーの機能配列を探索するため配列アライメントをおこなった。Komichi らの報告[18]では、S100A7 もしくは S100A8 を覆髄材としてラットを対象に直接覆髄実験を実施すると、どちらのタンパク質を用いた場合でも第三象牙質形成を促進したことから、歯髄の創傷治癒に影響を与えるタンパク質の機能配列は Protein S100 ファミリー間で保存されているアミノ酸配列である可能性が考えられた。またヒト由来の Protein S100 を用いてラットを対象に直接覆髄実験をおこなった結果、歯髄創傷治癒を促進したことから、異なる動物種間においても保存されている Protein S100 由来のアミノ酸配列が機能を発揮している可能性が高いと考えられた。さらに、DMCs 内に存在していることが報告されており[21]、上皮の創傷治癒や骨形成の促進にも関与する[22, 23] S100A9 を加えた 3 種類の Protein S100 について、複数の哺乳類のアミノ酸配列を対象として配列アライメントをおこなった。配列アライメントには世界で広く使用されており、アプリケーションの動作に必要なメモリが少ない条件でも複雑な計算が可能である CLUSTAL-W を用いた[49, 50]。その結果、アミノ酸配列の相同性が高い領域が 3 箇所あることが認められた(図 3)。今回、高い相同性が得られた三領域のうち C 末端側の領域 (図 3 中の C) は Protein S100 ファミリーに特徴的な領域である EF-hand ドメインを含む領域であった。EF-hand ドメインは、ヘリックス-ループ-ヘリックスの構造を持つカルシウム結合ドメインであり、タンパク質の相互作用に重要な立体構造の安定性に寄与している[51, 52]と言われており、

そのために高い相同性が得られたと考えられる。しかし、他の 2 箇所の領域は機能が明らかにされていない領域であったため、新たな機能部位である可能性が示唆された。

配列アライメントで得られたこれらの領域から、次におこなうペプチドのスクリーニングに用いる候補ペプチドを 58 種類選出した(図 4、表 1)。候補ペプチドの石灰化誘導能を評価するスクリーニング手法にはペプチドアレイ法を用いた。ペプチドアレイ法は元来、リガンドに結合するタンパク質のアミノ酸配列を探索するために、タンパク質-リガンド間でアミノ酸配列のスクリーニングをおこなう解析方法である[53]。本研究で用いたペプチドアレイ法は、過去の研究で開発されたタンパク質-細胞間の相互作用解析をおこなうことが可能である peptide array-based interaction assay for solid-bound peptides and anchorage-dependent cells (PIASPAC) を用いた[31, 54, 55]。コントロールとして用いた骨形成を促進し、歯髄創傷治癒も促進することが報告されている BMP 由来ペプチド (アミノ酸配列:TLVNSVNSK) [31, 34]は本ペプチドアレイ法にて発見されたペプチドである。よって本研究における配列アライメントおよび PIASPAC を用いた機能ペプチドの選出は、バイオインフォマティクス概念に基づいた同一ファミリータンパク質内での保存領域の詳細な検索および、歯髄創傷治癒過程において確実に重要な機能を果たす細胞石灰化能を評価するハイスループットなスクリーニング手法であり、これまでに報告のある Cpne7 や DSPP ペプチドの選出方法[27-30]よりも優れた選出手法を用いることができたと考えている。

ペプチドアレイ法を用いたアリザリンレッド染色で高い石灰化誘導能を示した上位 10

種のペプチドと、配列アライメントの相同性の高いペプチド選出領域の結果を照合した結果、配列アライメント中の 2 箇所の黒枠で囲んだ領域において、図 5B-b 中の領域から S100A8 由来のペプチド (アミノ酸配列: KLLTECPQ, 以下 No. 1 ペプチド) と S100A9 由来のペプチド (アミノ酸配列: ELVRKDLQN, 以下 No. 2 ペプチド) を、図 5B-c 中の領域から S100A8 由来のペプチド (アミノ酸配列: NTDGAVNFQ, 以下 No. 3 ペプチド) と S100A9 由来のペプチド (アミノ酸配列: NADKQLSFE, 以下 No. 4 ペプチド) のアミノ酸配列がそれぞれ重複するのを認めた。これらの重複した配列の部位を分子グラフィックスツールである PyMOL (Schrodinger, 米国) を用いてタンパク質の立体構造情報に基づいて検討した。その結果、すべてのペプチドが立体構造における表面に位置するヘアピン部に該当していることが明らかとなった (図 9)。このことより、No. 1 から 4 のペプチドはすべてタンパク質の表面に存在することで、他の分子と結合し、相互作用を及ぼすことで機能する可能性が示唆された。これらの結果を踏まえ、4 種のペプチドを用いて、*in vitro* および *in vivo* でその機能について評価をおこなうこととした。

同定された Protein S100 ファミリー由来機能ペプチド No. 1 から 4 が歯髄創傷治癒に与える影響を検討するために、*in vitro* で細胞毒性試験、細胞増殖試験をおこない、*in vivo* で直接覆髄実験をおこなった。まず、各ペプチドの細胞毒性について LDH-assay により検討した結果、すべての濃度で各ペプチドは細胞毒性を示さないことが明らかとなり、用いた最高濃度である 100 $\mu\text{g/ml}$ を用いて直接覆髄実験を実施することとした。歯科臨床へ

の応用を考えた際、組換えタンパク質をペプチドと同じモル濃度で用いることは非常に高コストになるとともに、濃縮も困難である可能性が考えられるため、ペプチドを覆髄材として用いることの利点の一つだと考えられる。一方、各ペプチドが細胞増殖能に与える影響については、全ての試料でコントロールとの間に有意差は認めなかった (図 6B)。各ペプチドの由来タンパク質である S100A8、S100A9 は細胞増殖能を促進することが報告されており[56-58]、本研究結果と一見矛盾するように考えられる。しかし、本研究ではペプチドのスクリーニング項目として細胞増殖ではなく、石灰化誘導能の評価をおこなったため、石灰化誘導能を持つ機能配列のみが抽出されたと考えられ、由来タンパク質が持つ細胞増殖などの他の機能を持つ機能配列は選出されなかったと考えられる。

次に各ペプチドを用いた直接覆髄実験の結果、マイクロ CT による評価では No. 1 ペプチドを用いて覆髄を行った全ての試料で露髄部を完全に封鎖するか、露髄部の 2/3 以上を覆う第三象牙質形成が認められ、第三象牙質形成の体積の定量評価においても PBS を用いたコントロールと比較し有意に多くの第三象牙質形成量を認めた(表 2、図 7)。さらにマイクロ CT 解析に用いた同じ試料について実施した H-E 染色においても、No. 1 ペプチドを用いた試料は第三象牙質内に微小な欠損は認めるものの、歯髄側と歯冠側が交通するような欠損は認めず、形成された第三象牙質による露髄面の完全閉鎖が得られた全切片で確認された (図 8)。他のペプチドはいくつかの試料で第三象牙質形成を認めたものの、No. 1 ペプチドに比べると良好な結果は得られなかった。No. 3 ペプチド、No. 4 ペプチドの配列の

領域は前述した EF-hand ドメインと呼ばれる部位に該当し[51, 52]、タンパク質の立体構造の安定に寄与すると考えられている。そのため、歯髄組織内のタンパク質との相互作用を経て、積極的に歯髄創傷治癒の促進に働く配列ではなかったと考えられる。No. 2 ペプチドに関しては由来タンパク質の配列上において No. 1 ペプチドと相同性のある部位ではあったが、ペプチドの性質としてタンパク質の理論等電点を表す pI 値が No.1 ペプチドが 4.53、No. 2 ペプチドが 6.17 と異なるなど、ペプチドの化学的な性質の違いが今回のように機能の違いに影響した可能性があると考えられる。そのため、No. 1 ペプチドがアミノ酸配列として生物学的な効果があったのか、化学的な性状で効果があったかについては今後さらなる検討が必要である。また、今回コントロールとして用いた S100A8、S100A9 は各ペプチドと比較し 1000 分の 1 のモル濃度で用いたため、直接覆髄の実験結果を一概に比較することはできないが、タンパク質を今回使用したペプチドと同じモル濃度で覆髄材として用いることは、安全性やコストの観点からも困難であった。そのため、比較的高濃度で用いることが可能なペプチドを覆髄材に使用することは臨床応用に向けての利点の一つであると考えられる。

さらに、直接覆髄実験で良好な結果を示した No. 1 ペプチドが、歯髄創傷治癒を促進したメカニズムを検討するために、LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析をおこない、同定されたタンパク質の機能について GO を用いて解析をおこなった。その結果、No. 1 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。

NFκB シグナル経路は一般的に免疫や炎症、細胞増殖、細胞分化の調節をおこなうことが報告されているが[59]、一方で Neurotrophin receptor-interacting MAGE homologue (Nrage) をノックダウンしたマウスの象牙芽細胞様細胞で同シグナル経路が活性化され、ALP の活性が上昇したという報告や[60]、Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ)を過剰発現させた歯髄細胞に H₂O₂ を作用させることで NFκB シグナル経路が活性化され、その結果石灰化が促進されたという報告[61]もある。本研究において活性化された可能性がある NFκB シグナル経路は、上記の報告と類似したメカニズムを経て、歯髄創傷治癒に参与している可能性が示唆された。また、NFκB シグナル経路自身が抗炎症に働くといった報告[62]、NFκB シグナル伝達経路を介して炎症性サイトカインの合成を阻害し、歯髄細胞の血管新生を促進するという報告や[63]、象牙芽細胞様細胞において NFκB シグナル経路を活性化し、VEGF の発現を上昇させることで血管新生や、石灰化も促進されたという報告もある[64]。本研究において、No. 1 ペプチドと S100A8 を用いた試料で発現が上昇したタンパク質の中には、血管新生に関連する GO Term を持つタンパク質も同定された (細胞膜: Rho-related GTP-binding protein RhoB、Protein LYRIC、Aminopeptidase N、Ephrin type-A receptor 2 (EPHA2) 、細胞質: Guanine nucleotide exchange factor VAV2) (結果は示さず)。

特にその一つである EPHA2 は骨形成に関与すると言われており[65]、Ephrin の受容体と

して機能する[66]。EPHA2 と Ephrin が相互作用することで血管新生[65]や幹細胞の分化も促進するという報告もある[67]。しかし、EPHA2 が No. 1 ペプチドの由来タンパク質である S100A8 の受容体となるという報告はなく、同様に No. 1 ペプチドの受容体となるかに関しても不明であるため、今後さらなる検討が必要である。

また、MAPK シグナル経路は一般的に細胞増殖、細胞分化、細胞遊走、アポトーシスの調節をおこなうことが報告されているが[68]、脊髄損傷後の神経組織において 5-Methoxytryptophan (5MTP) をマウスに投与すると MAPK 経路を抑制し抗炎症に作用するという報告があり[69]、本実験においても No. 1 ペプチドを用いた試料で MAPK 経路を活性化するタンパク質の発現が減少したことから、炎症を抑制することで治癒が促進する方向へ作用した可能性も考えられる。

また、No. 1 ペプチドを用いた試料で発現量が上昇したタンパク質では、Small Mothers Against Decapentaplegic (SMAD) シグナル経路を促進する機能関連の GO Term を持つタンパク質も同定された（細胞膜：Leucyl-cystinyl aminopeptidase、E3 ubiquitin-protein ligase CHIP、細胞質：Syntenin-1、Follistatin-related protein 1）（結果は示さず）。SMAD シグナル経路は、歯髄細胞の分化促進に関与することが報告されており[70]、また DSPP が hDPSCs の石灰化を促進する過程で NF κ B シグナル経路と SMAD シグナル経路が共に活性化されたと報告されているため[71]、本研究においても歯髄創傷治癒に寄与した可能性も考えられるが、No. 1 ペプチドの由来タンパク質である S100A8 と SMAD シグナル経路の

関係は未だ不明であるため今後検討が必要であると考えられる。

今後、本研究で発見した No. 1 ペプチドを応用した覆髄材の開発に向けて、ペプチドと細胞の相互作用において標的に対する特異性や、酵素などの影響によるペプチドの耐分解性を向上させることなどにより機能を更に安定化させる方法として、No. 1 ペプチドのアミノ酸配列の改良や環状ペプチドの開発等をおこなっていく必要がある[72, 73]。また、直接覆髄実験で用いたゼラチンスポンジは担体としては機械的強度や辺縁封鎖性の観点からは十分とは言えないため、それらの要件を満たした担体の開発も必須であると考えられる。

VII. 結論

本研究により、象牙質基質タンパク質中に存在する Protein S100A8 由来の機能ペプチド (KLLTECPQ) 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。

VIII. 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名古屋大学大学院創薬科学研究科 基盤創薬学専攻 創薬生物科学講座 蟹江 慧博士、大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第二教室）武部 克希先生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。

IX. 参考文献

1. Smith AJ, Scheuen BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR: **Dentine as a bioactive extracellular matrix**. *Archives of Oral Biology* 2012, **57**(2):109-121.
2. Simon S, Smith AJ, Lumley PJ, Berdal A, Smith G, Finney S, Cooper PR: **Molecular characterization of young and mature odontoblasts**. *Bone* 2009, **45**(4):693-703.
3. Sloan AJ, Smith AJ: **Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair**. *Oral Diseases* 2007, **13**(2):151-157.
4. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S: **Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**(25):13625-13630.
5. Dummer PMH, Franco V, Gambarini G, Orstavik D, Tjaderhane L, Whitworth J, Duncan HF, Galler KM, Tomson PL, Simon S *et al*: **European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp**. *International Endodontic Journal* 2019, **52**(7):923-934.
6. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ: **The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components**. *Biomaterials* 2006, **27**(14):2865-2873.
7. Aguilar P, Linsuwanont P: **Vital Pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review**. *Journal of Endodontics* 2011, **37**(5):581-587.
8. Min KS, Lee YM, Hong SO, Kim EC: **Simvastatin promotes odontoblastic differentiation and expression of angiogenic factors via heme oxygenase-1 in primary cultured human dental pulp cells**. *Journal of Endodontics* 2010, **36**(3):447-452.
9. Machado M, Stafuzza TC, Vitor LLR, da Costa SA, da Costa SM, Neto NL, Oliveira TM: **Pulp repair response after the use of a dentin-pulp biostimulation membrane (BBio) in primary teeth: study protocol for a randomized clinical trial**. *Trials* 2020, **21**(1):7.
10. Alawwad M, Altinawi M, Rejab MS, Kosyrev T, Almokaddam H, Katbeh I: **A comparative clinical radiological study using platelet rich fibrin and MTA in pulpotomy of first permanent immature molars**. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2020, **14**(11):ZC1-ZC5.

11. Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A: **Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2.** *Journal of Dental Research* 2004, **83**(8):590-595.
12. Nakashima M, Tachibana K, Iohara K, Ito M, Ishikawa M, Akamine A: **Induction of reparative dentin formation by ultrasound-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11.** *Human Gene Therapy* 2003, **14**(6):591-597.
13. Walker JV, Zhuang H, Singer D, Illsley CS, Kok WL, Sivaraj KK, Gao Y, Bolton C, Liu YY, Zhao MY *et al*: **Transit amplifying cells coordinate mouse incisor mesenchymal stem cell activation.** *Nature Communications* 2019, **10**:18.
14. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S: **The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries.** *Journal of Dental Research* 2006, **85**(1):22-32.
15. Mazzoni A, Tjaderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, Pashley DH, Breschi L: **Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability.** *Journal of Dental Research* 2015, **94**(2):241-251.
16. Kato MT, Hannas AR, Leite AL, Bolanho A, Zarella BL, Santos J, Carrilho M, Tjaderhane L, Buzalaf MAR: **Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine.** *Caries Research* 2011, **45**(5):429-434.
17. Okamoto M, Takahashi Y, Komichi S, Cooper PR, Hayashi M: **Dentinogenic effects of extracted dentin matrix components digested with matrix metalloproteinases.** *Scientific Reports* 2018, **8**:17.
18. Komichi S, Takahashi Y, Okamoto M, Ali M, Watanabe M, Huang HL, Nakai T, Cooper P, Hayashi M: **Protein S100-A7 derived from digested dentin is a critical molecule for dentin pulp regeneration.** *Cells* 2019, **8**(9):19.
19. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL: **Functions of S100 proteins.** *Current Molecular Medicine* 2013, **13**(1):24-57.
20. Gross SR, Sin CGT, Barraclough R, Rudland PS: **Joining S100 proteins and migration: for better or for worse, in sickness and in health.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 2014, **71**(9):1551-1579.
21. Widbiller M, Schweikli H, Bruckmann A, Rosendahl A, Hochmuth E, Lindner SR, Buchalla W, Geller KM: **Shotgun proteomics of human dentin with different prefractionation methods.** *Scientific Reports* 2019, **9**:8.
22. Basu A, Munir S, Mulaw MA, Singh K, Herold B, Crisan D, Sindrilaru A, Treiber N, Wlaschek M, Huber-Lang M *et al*: **A novel S100A8/A9 induced fingerprint of mesenchymal stem cells associated with enhanced wound healing.** *Scientific Reports* 2018, **8**:16.

23. Zreiqat H, Howlett CR, Gronthos S, Hume D, Geczy CL: **S100A8/S100A9 and their association with cartilage and bone.** *Journal of Molecular Histology* 2007, **38**(5):381-391.
24. Leon R, Murray JI, Cragg G, Farnell B, West NR, Pace TCS, Watson PH, Bohne C, Boulanger MJ, Hof F: **Identification and characterization of binding sites on S100A7, a participant in cancer and inflammation pathways.** *Biochemistry* 2009, **48**(44):10591-10600.
25. Henninot A, Collins JC, Nuss JM: **The current state of peptide drug discovery: back to the future?** *Journal of Medicinal Chemistry* 2018, **61**(4):1382-1414.
26. Sachdeva S: **Peptides as 'Drugs': the journey so far.** *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 2017, **23**(1):49-60.
27. Lee YS, Park YH, Lee DS, Seo YM, Lee JH, Park JH, Choung HW, Park SH, Shon WJ, Park JC: **Tubular dentin regeneration using a CPNE7-derived functional peptide.** *Materials* 2020, **13**(20):21.
28. Tang J, Saito T: **Effect of dentine phosphoryn-derived RGD peptides on odontoblast-like cells.** *International Endodontic Journal* 2016, **49**(7):670-683.
29. Li WT, Chen L, Chen Z, Wu L, Feng JS, Wang F, Shoff L, Li X, Donly KJ, MacDougall M *et al*: **Dentin sialoprotein facilitates dental mesenchymal cell differentiation and dentin formation.** *Scientific Reports* 2017, **7**:18.
30. Wan CY, Yuan GH, Luo DS, Zhang L, Lin H, Liu H, Chen L, Yang GB, Chen S, Chen Z: **The dentin sialoprotein (DSP) domain regulates dental mesenchymal cell differentiation through a novel surface receptor.** *Scientific Reports* 2016, **6**:14.
31. Kanie K, Kurimoto R, Tian J, Ebisawa K, Narita Y, Honda H, Kato R: **Screening of osteogenic-enhancing short peptides from BMPs for biomimetic material applications.** *Materials* 2016, **9**(9):17.
32. Santos GB, Ganesan A, Emery FS: **Oral administration of peptide-based drugs: beyond lipinski's rule.** *Chemmedchem* 2016, **11**(20):2245-2251.
33. Furuya Y, Inagaki A, Khan M, Mori K, Penninger JM, Nakamura M, Udagawa N, Aoki K, Ohya K, Uchida K *et al*: **Stimulation of bone formation in cortical bone of mice treated with a receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL)-binding peptide that possesses osteoclastogenesis inhibitory activity.** *Journal of Biological Chemistry* 2013, **288**(8):5562-5571.
34. Okamoto M, Matsumoto S, Sugiyama A, Kanie K, Watanabe M, Huang HL, Ali M, Ito Y, Miura J, Hirose Y *et al*: **Performance of a biodegradable composite with hydroxyapatite as a scaffold in pulp tissue repair.** *Polymers* 2020, **12**(4):14.
35. Okamoto M, Takahashi Y, Komichi S, Ali M, Yoneda N, Ishimoto T, Nakano T,

- Hayashi M: **Novel evaluation method of dentin repair by direct pulp capping using high-resolution micro-computed tomography.** *Clinical Oral Investigations* 2018, **22**(8):2879-2887.
36. Kiba W, Imazato S, Takahashi Y, Yoshioka S, Ebisu S, Nakano T: **Efficacy of polyphasic calcium phosphates as a direct pulp capping material.** *Journal of Dentistry* 2010, **38**(10):828-837.
 37. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT *et al*: **Gene Ontology: tool for the unification of biology.** *Nature Genetics* 2000, **25**(1):25-29.
 38. Yoshioka S, Takahashi Y, Abe M, Michikami I, Imazato S, Wakisaka S, Hayashi M, Ebisu S: **Activation of the Wnt/beta-catenin pathway and tissue inhibitor of metalloprotease 1 during tertiary dentinogenesis.** *Journal of Biochemistry* 2013, **153**(1):43-50.
 39. Smith JG, Smith AJ, Shelton RM, Cooper PR: **Recruitment of dental pulp cells by dentine and pulp extracellular matrix components.** *Experimental Cell Research* 2012, **318**(18):2397-2406.
 40. 小道俊吾, 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 学位論文(博士) 2016.
 41. Ogbureke KUE, Koli K, Saxena G: **Matrix metalloproteinase 20 co-expression with dentin sialophosphoprotein in human and monkey kidneys.** *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2016, **64**(10):623-636.
 42. Koli K, Saxena G, Ogbureke KUE: **Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-20 and potential interaction with dentin sialophosphoprotein (DSPP) in human major salivary glands.** *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2015, **63**(7):524-533.
 43. Saxena G, Koli K, de la Garza J, Ogbureke KUE: **Matrix metalloproteinase 20-dentin sialophosphoprotein interaction in oral cancer.** *Journal of Dental Research* 2015, **94**(4):584-593.
 44. Bartlett JD, Skobe Z, Lee DH, Wright JT, Li Y, Kulkarni AB, Gibson CW: **A developmental comparison of matrix metalloproteinase-20 and amelogenin null mouse enamel.** *European Journal of Oral Sciences* 2006, **114**:18-23.
 45. Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding YL, Simmer JP, Birkedal-Hansen H, Bartlett JD: **Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype.** *Journal of Biological Chemistry* 2002, **277**(51):49598-49604.
 46. Kwak SY, Yamakoshi Y, Simmer JP, Margolis HC: **MMP20 proteolysis of native amelogenin regulates mineralization in vitro.** *Journal of Dental Research* 2016,

- 95(13):1511-1517.
47. Buchko GW, Arachchige RJ, Tao JH, Tarasevich BJ, Shaw WJ: **Identification of major matrix metalloproteinase-20 proteolytic processing products of murine amelogenin and tyrosine-rich amelogenin peptide using a nuclear magnetic resonance spectroscopy based method.** *Archives of Oral Biology* 2018, **93**:187-194.
 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* 2015, **10**(3):12.
 49. Edgar RC, Batzoglou S: **Multiple sequence alignment.** *Current Opinion in Structural Biology* 2006, **16**(3):368-373.
 50. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: **CLUSTAL-W - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Research* 1994, **22**(22):4673-4680.
 51. Chazin WJ: **Relating Form and Function of EF-Hand Calcium Binding Proteins.** *Accounts of Chemical Research* 2011, **44**(3):171-179.
 52. Schafer BW, Heizmann CW: **The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: Functions and pathology.** *Trends in Biochemical Sciences* 1996, **21**(4):134-140.
 53. Katz C, Levy-Beladev L, Rotem-Bamberger S, Rito T, Rudiger SGD, Friedler A: **Studying protein-protein interactions using peptide arrays.** *Chemical Society Reviews* 2011, **40**(5):2131-2145.
 54. Kato R, Kaga C, Kanie K, Kunimatsu M, Okochi M, Honda H: **Peptide array-based peptide-cell interaction analysis.** *Mini-Reviews in Organic Chemistry* 2011, **8**(2):171-177.
 55. Kato R, Kaga C, Kunimatsu M, Kobayashi T, Honda H: **Peptide array-based interaction assay of solid-bound peptides and anchorage-dependant cells and its effectiveness in cell-adhesive peptide design.** *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2006, **101**(6):485-495.
 56. Iotzova-Weiss G, Dziunycz PJ, Freiburger SN, Lauchli S, Hafner J, Vogl T, French LE, Hofbauer GFL: **S100A8/A9 stimulates keratinocyte proliferation in the development of squamous cell carcinoma of the skin via the receptor for advanced glycation-end products.** *Plos One* 2015, **10**(3):18.
 57. Zhang XM, Ai FY, Li XY, She XL, Li N, Tang AL, Qin ZL, Ye QR, Tian L, Li GY *et al*: **Inflammation-induced S100A8 activates Id3 and promotes colorectal tumorigenesis.** *International Journal of Cancer* 2015, **137**(12):2803-2814.
 58. Zhong X, Xie FW, Chen L, Liu ZX, Wang Q: **S100A8 and S100A9 promote**

- endothelial cell activation through the RAGE-mediated mammalian target of rapamycin complex 2 pathway. *Molecular Medicine Reports* 2020, **22**(6):5293-5303.
59. Oeckinghaus A, Ghosh S: **The NF-kappa B family of transcription factors and its regulation.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2009, **1**(4):14.
 60. Wu Q, Li J, Song PP, Chen J, Xu YZ, Qi SC, Ma J, Pan QH: **Knockdown of NRAGE induces odontogenic differentiation by activating NF-kappa B signaling in mouse odontoblast-like cells.** *Connective Tissue Research* 2019, **60**(2):71-84.
 61. Lee YH, Kang YM, Heo MJ, Kim GE, Bhattarai G, Lee NH, Yu MK, Yi HK: **The survival role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces odontoblast differentiation against oxidative stress in human dental pulp cells.** *Journal of Endodontics* 2013, **39**(2):236-241.
 62. Lawrence T, Fong C: **The resolution of inflammation: Anti-inflammatory roles for NF-kappa B.** *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2010, **42**(4):519-523.
 63. Shen S, Shang LL, Liu HR, Liang QY, Liang W, Ge SH: **AGGF1 inhibits the expression of inflammatory mediators and promotes angiogenesis in dental pulp cells.** *Clinical Oral Investigations*:12.
 64. Kuramoto H, Hirao K, Yumoto H, Hosokawa Y, Nakanishi T, Takegawa D, Washio A, Kitamura C, Matsuo T: **Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) induces VEGF expression and production in rat odontoblastic cells.** *Biomed Research International* 2019, **2019**:5390720.
 65. Xu XN, Zhang D: **Regulatory Effects of Erythropoietin-producing Hepatocyte Kinase Receptor and Ephrin Ligand on Bone Remodeling.** *Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae* 2018, **40**(2):294-298.
 66. Genander M, Frisen J: **Ephrins and Eph receptors in stem cells and cancer.** *Current Opinion in Cell Biology* 2010, **22**(5):611-616.
 67. Kuijper S, Turner CJ, Adams RH: **Regulation of angiogenesis by Eph-Ephrin interactions.** *Trends in Cardiovascular Medicine* 2007, **17**(5):145-151.
 68. Sun Y, Liu WZ, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou HF: **Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis.** *Journal of Receptors and Signal Transduction* 2015, **35**(6):600-604.
 69. Hong X, Jiang F, Li Y, Fang L, Qian Z, Chen H, Kong R: **Treatment with 5-methoxytryptophan attenuates microglia-induced neuroinflammation in spinal cord trauma.** *International immunopharmacology* 2020, **88**:106988.
 70. Woo SM, Kim WJ, Lim HS, Choi NK, Kim SH, Kim SM, Jung JY: **Combination of mineral trioxide aggregate and platelet-rich fibrin promotes the odontoblastic**

- differentiation and mineralization of human dental pulp cells via BMP/Smad signaling pathway.** *Journal of Endodontics* 2016, **42**(1):82-88.
71. Lee SY, Kim SY, Park SH, Kim JJ, Jang JH, Kim EC: **Effects of recombinant dentin sialoprotein in dental pulp cells.** *Journal of Dental Research* 2012, **91**(4):407-412.
72. Tapeinou A, Matsoukas MT, Simal C, Tselios T: **Cyclic peptides on a merry-go-round; towards drug design.** *Biopolymers* 2015, **104**(5):453-461.
73. Wu ZY, Zhang YH, Wang H, Ma FQ: **Research on design and synthesis of cyclic peptides.** *Progress in Chemistry* 2002, **14**(2):113-120.

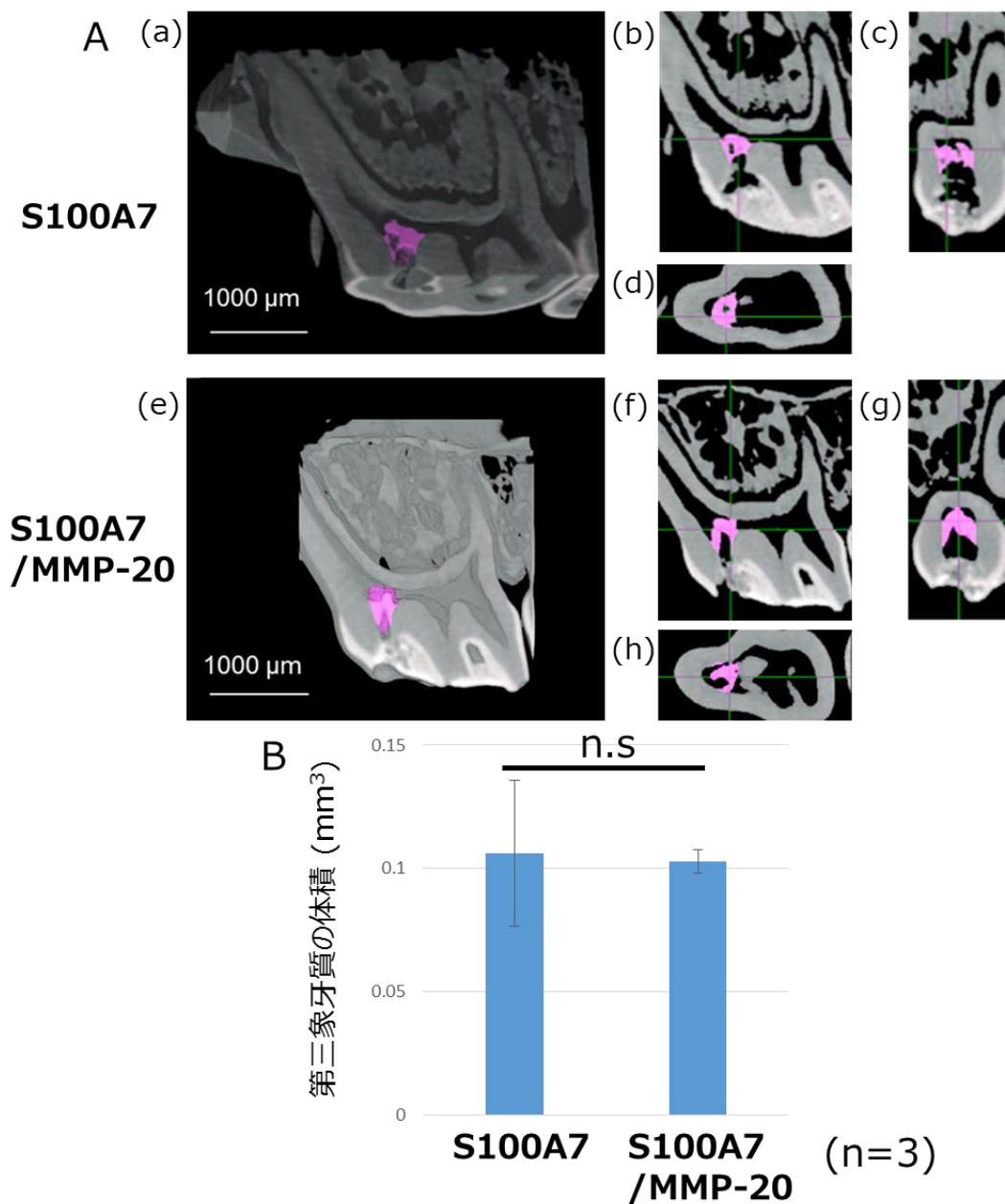


図1 S100A7およびMMP20と反応させたS100A7を用いた直接覆髄実験のマイクロCT画像解析

A: S100A7を用いて直接覆髄実験をおこなったラット臼歯試料とMMP20と反応させたS100A7を用いた直接覆髄実験をおこなった試料のマイクロCT画像解析による三次元構築画像の一部(a, e)と矢状断 (b, f)、前頭断 (c, g)、水平断 (d, h)の平面画像を示す。第三象牙質をピンク色で示す。いずれの試料でも、露髄部を完全に封鎖する第三象牙質の形成を認めた。 B: 第三象牙質の体積定量結果。S100A7もしくはMMP20処理したS100A7を用いて直接覆髄後に形成された第三象牙質の体積には有意差がないことを示す (Student's *t*-test, $p > 0.05$)。

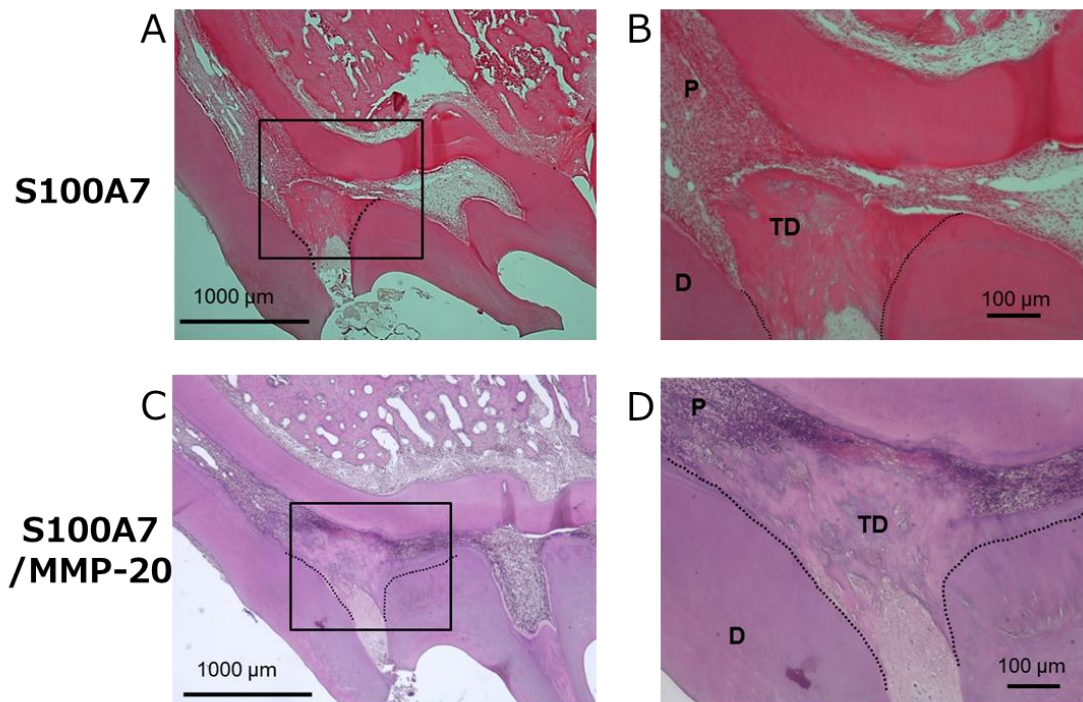
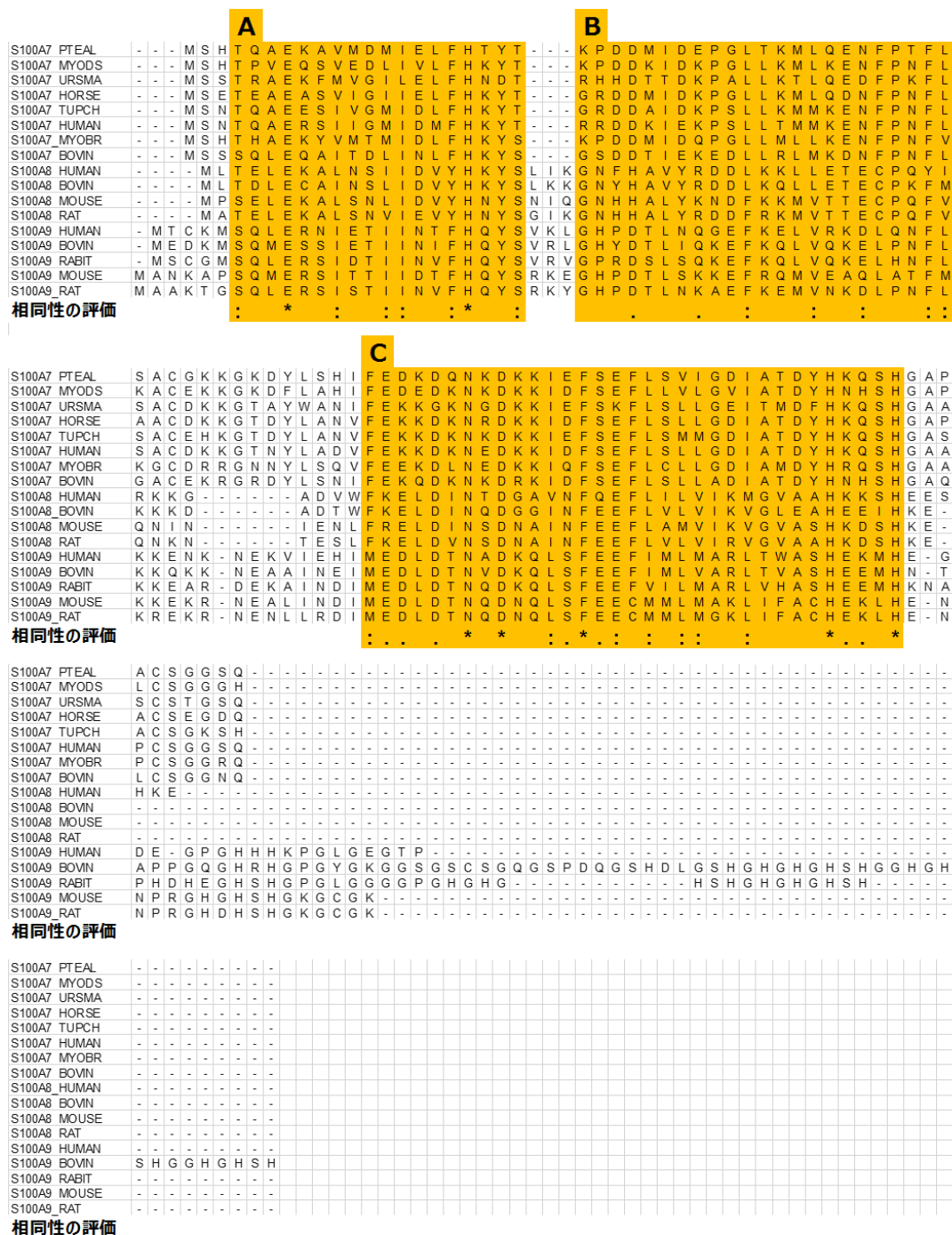


図2 S100A7およびMMP20と反応させたS100A7を用いた直接覆髄実験の病理組織学的評価

S100A7を用いて直接覆髄実験をおこなったラット臼歯試料のH-E染色像 (A) と四角で囲んだ部位の拡大像 (B)。MMP20と反応させたS100A7を用いて直接覆髄実験をおこなった試料のH-E染色像 (C) と四角で囲んだ部位の拡大像 (D)。いずれの試料でも露髄部を完全に封鎖する第三象牙質の形成を認めた。点線は第三象牙質と原生象牙質の境界を示す。P:歯髄、D:象牙質、TD:第三象牙質



**図3 配列アライメントを用いた Protein S100 ファミリーの
アミノ酸配列の相同性の探索**

Protein S100ファミリーのアミノ酸配列を対象に実施した配列アライメントの結果を示す。一致しているアミノ酸「*」、CLUSTALWにおける相同性スコアが0.5より高い部位（高い相同性を示す部位）は「:」、0.5以下の部位（低い相同性を示す部位）は「.」でアミノ酸配列の下部に示す。相同性の高い領域は黄色(A、B、C)で示す。

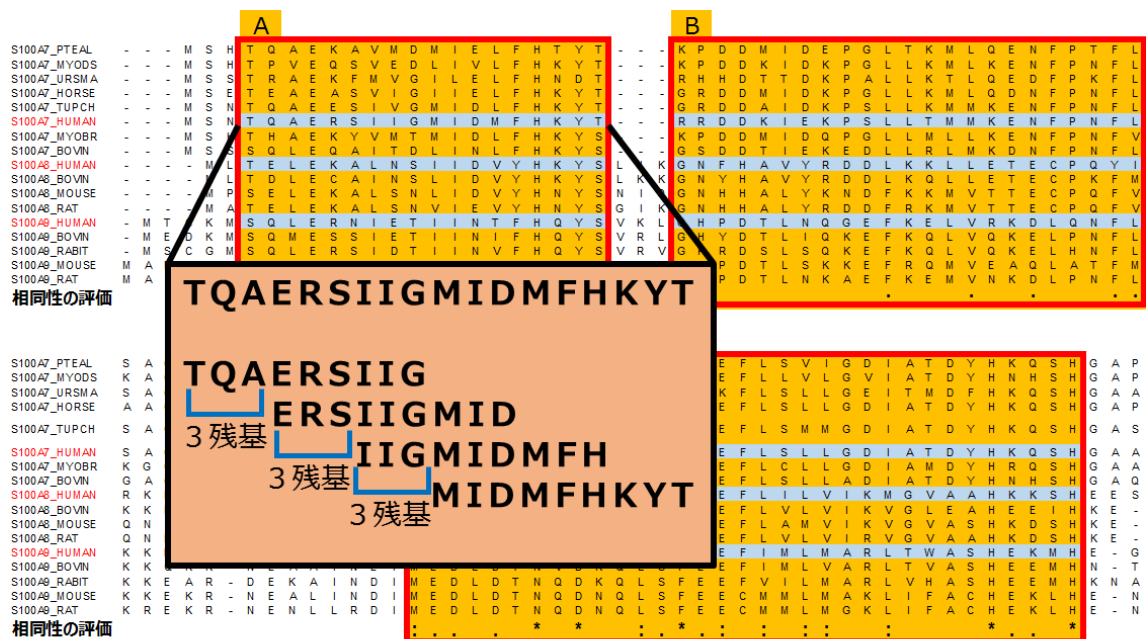


図4 ペプチドアレイに用いる候補ペプチドの選出

候補ペプチドの選出方法を示す。配列アライメント (図3)におけるヒトProtein S100 (赤文字)の amino 酸配列 (水色)の相同性が高い領域の中から、amino 酸 9 残基を選び、候補ペプチドとした。その候補ペプチドを3残基ずつずらしたのもも 同様に候補ペプチドとし、全ての赤枠で囲んだ黄色の領域から計58種類の候補 ペプチドを選出した。

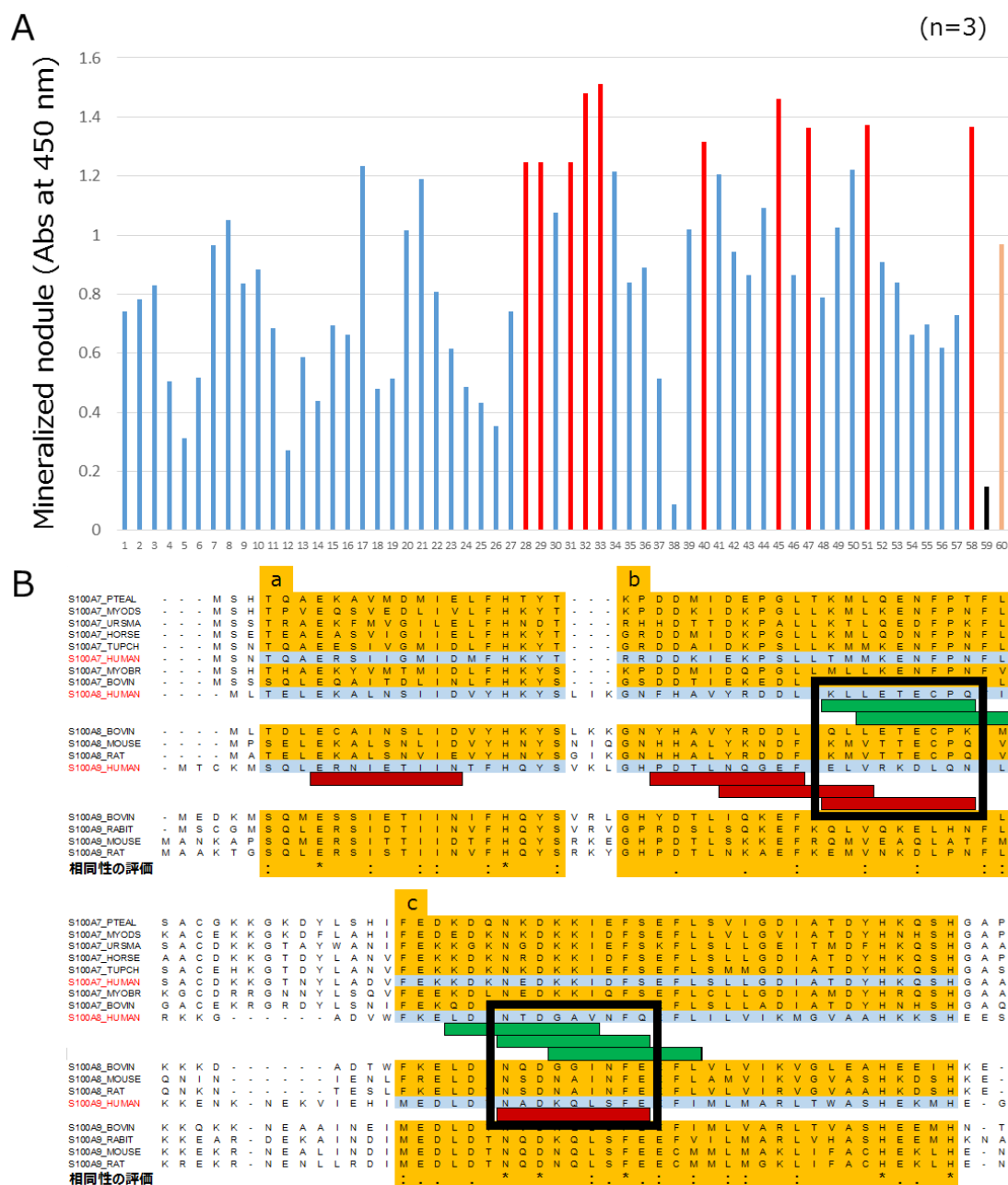


図5 ペプチドアレイ法を用いた機能ペプチドのスクリーニング

A: ペプチドアレイ法を用いたアリザリンレッド染色の結果を示す。赤色が候補ペプチドの中で高い石灰化誘導能を示した上位10種類のペプチド (No.28、29、31～33、40、45、47、51、58)、黒色がランダムペプチド (No.59)、橙色がBMP2由来ペプチドを示す (No.60)。ペプチドのアミノ酸配列は表1に示す。B: Aの赤色で示した10種のペプチドを配列アライメント (図3) のペプチド選出領域の結果と照らし合わせた結果を示す。S100A8由来の候補ペプチド (緑の帯)、S100A9由来の候補ペプチド (赤の帯)を各々の由来タンパク質のアミノ酸配列の下部に示す。b、c中の2箇所の黒枠で囲んだ領域において、hDPSCsの石灰化を促進したペプチドが重複しているのが認められた。

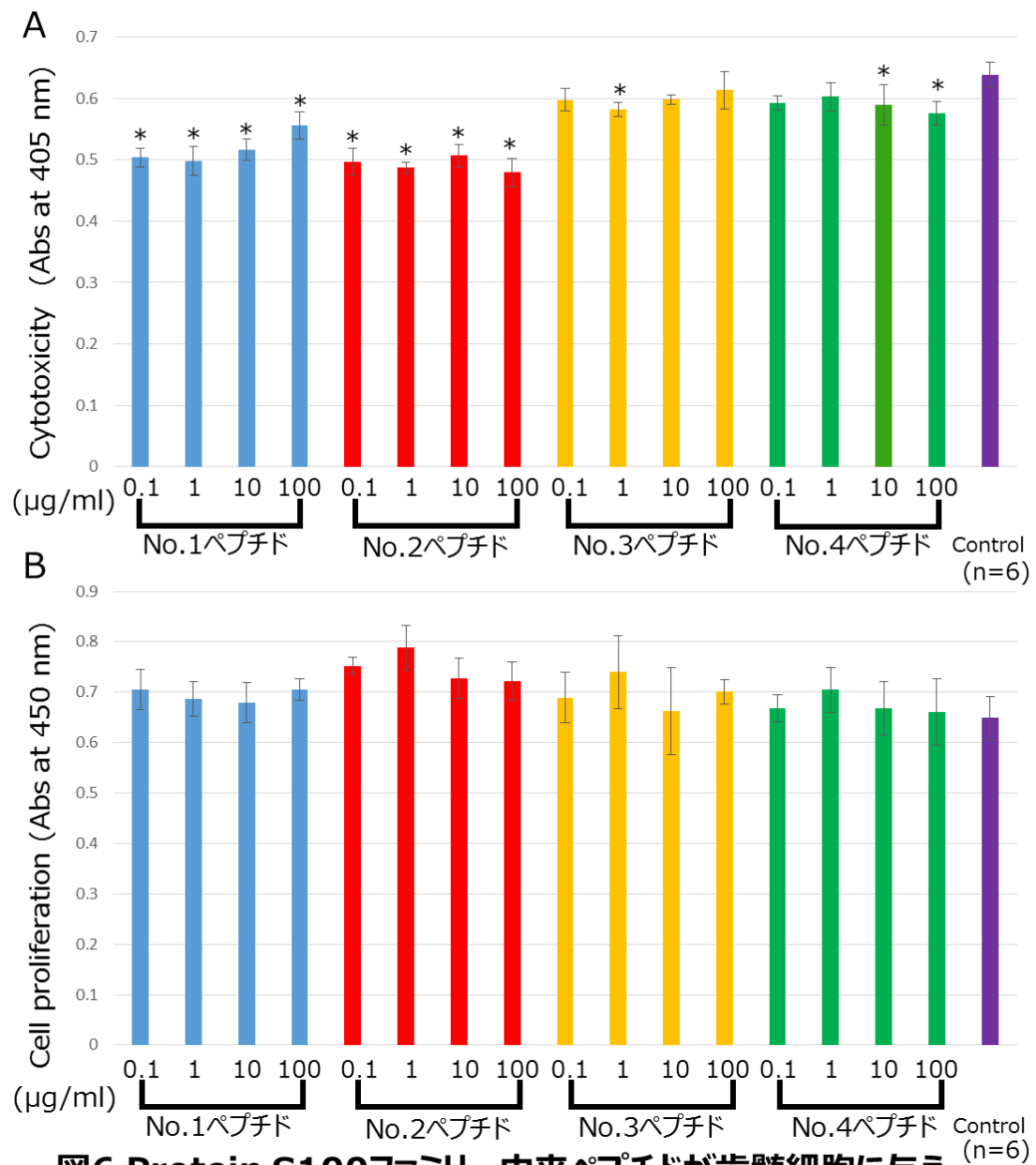


図6 Protein S100ファミリー由来ペプチドが歯髄細胞に与える影響の評価 (細胞毒性・増殖能)

Protein S100ファミリー由来ペプチド (No.1～No.4)のhDPSCsへのA:細胞毒性、B:細胞増殖能に与える影響を示す。No.1ペプチド (KLLETECPQ;青)、No.2ペプチド (ELVRKDLQN;赤)、No.3ペプチド (NTDGAVNFQ;黄)、No.4ペプチド (NADKQLSFE)の各濃度 (0.1～100µg/ml)を用いた試料、PBSを用いたコントロール (紫)を示す。A: 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, Tukey's test, $p < 0.05$) B: 全ての試料でコントロールとの間に有意差は認めなかった。(Kruskal-Wallis-test, $p > 0.05$)

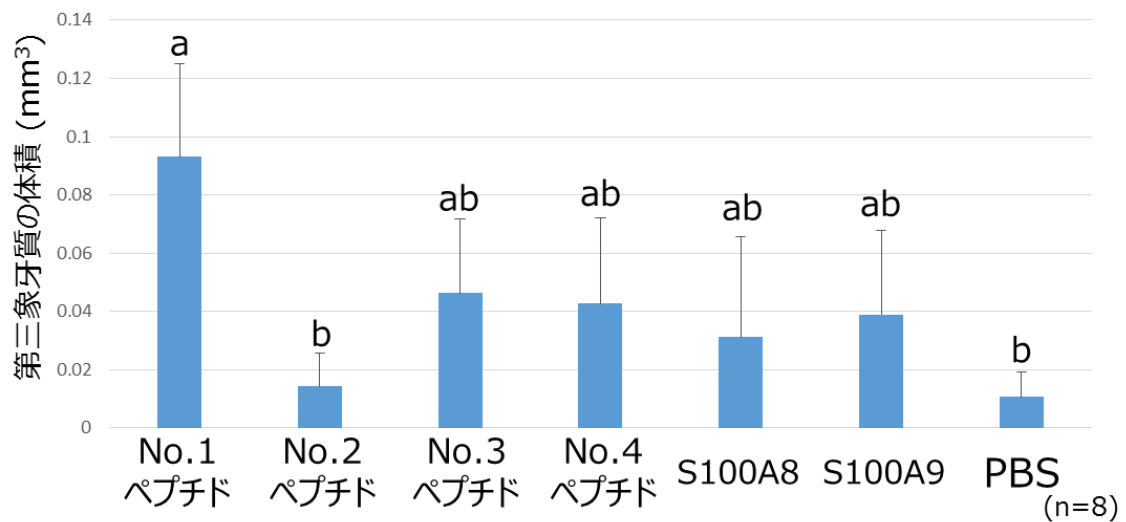


図7 Protein S100ファミリー由来ペプチドを用いた直接覆髄実験で形成された第三象牙質の体積の評価

Protein S100ファミリー由来ペプチド (No.1～No.4)を用いた直接覆髄により形成された第三象牙質の体積の定量結果を示す。異なる文字で示された群間に有意差があることを示す (Kruskal-Wallis-test, $p < 0.05$)。No.1ペプチドを用いて覆髄を行った試料はNo.2ペプチドもしくは、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。

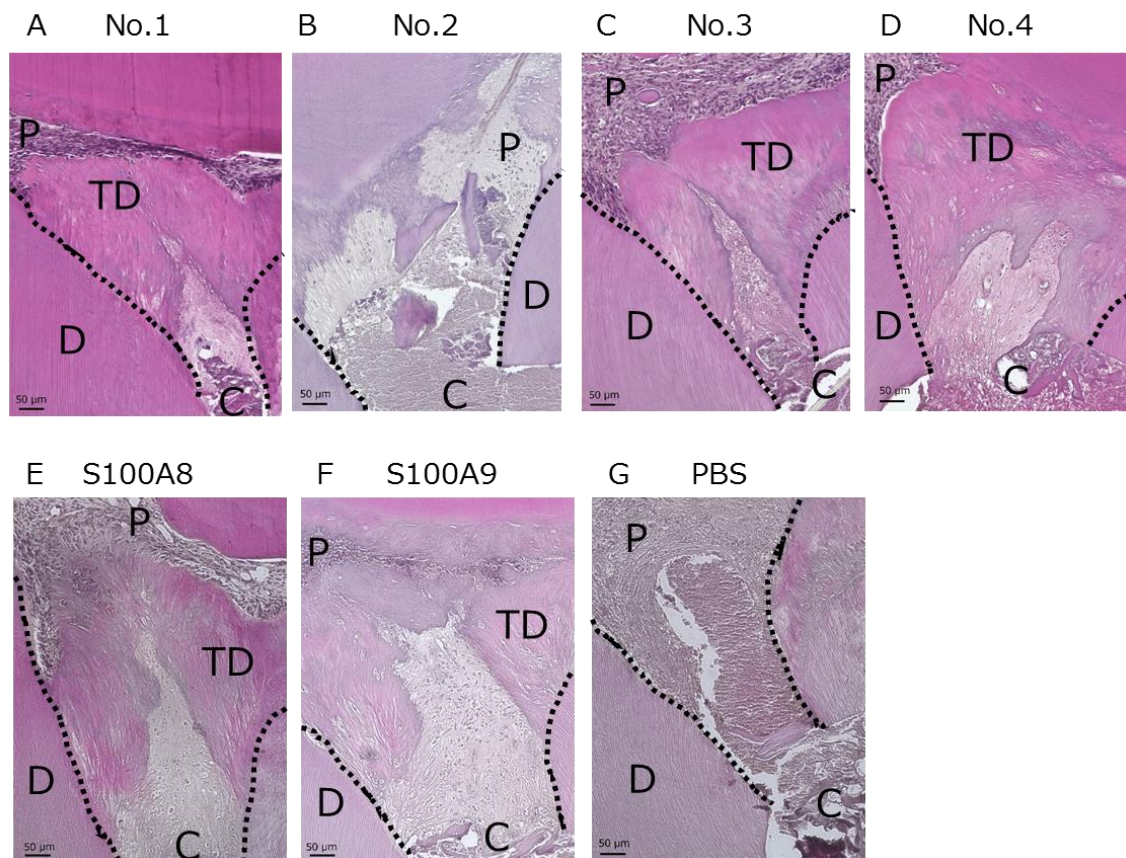


図8 Protein S100ファミリー由来ペプチドを用いた直接覆髄によって形成された第三象牙質の病理組織学的評価

Protein S100ファミリー由来ペプチド (No.1～No.4)を用いた直接覆髄実験後4週における代表的な試料のH-E染色像を示す。S100A8、S100A9およびPBSをコントロールとして用いた。点線は第三象牙質と原生象牙質の境界を示す。P:歯髄、D:象牙質、TD:第三象牙質、C:形成窩洞

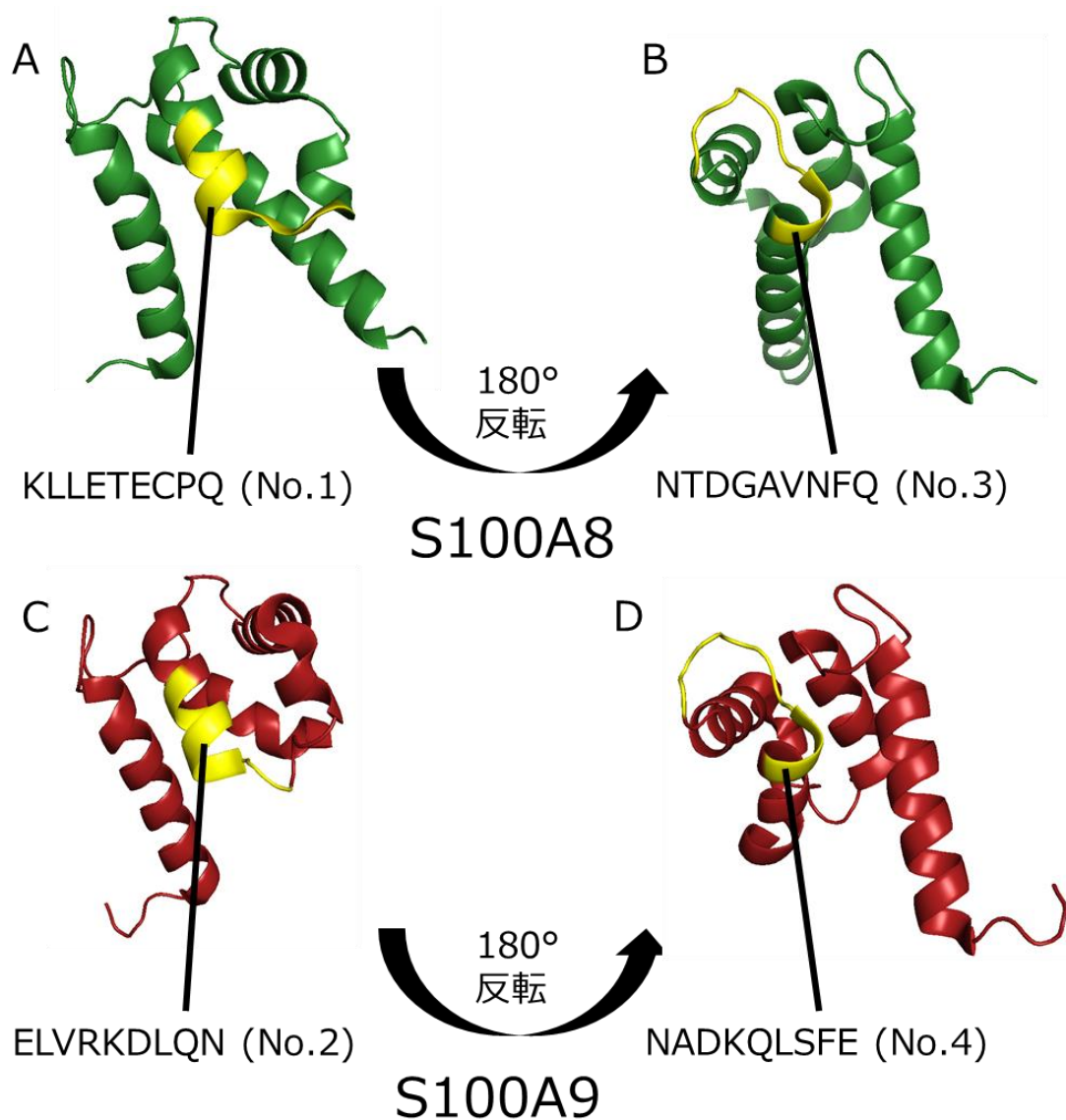


図9 Protein S100ファミリー由来ペプチドの由来タンパク質の立体構造上における位置

Protein S100ファミリー由来ペプチド (No.1~4)の由来タンパク質の立体構造上における位置の模式図を示す (PyMOL (Schrodinger, 米国)にて作成)。A、BがS100A8、C、DがS100A9を示す。各々の立体構造中におけるNo.1~4ペプチドの位置を黄色で示す。すべてのペプチドが立体構造の表面に位置するヘアピン部に該当することが明らかとなった。

表1 配列アライメントにおいて相同性の高い領域より選出した58種類の候補ペプチドのアミノ酸配列

No	アミノ酸配列	由来タンパク質	No	アミノ酸配列	由来タンパク質
1	TQAERSIIG	S100A7	31	LDINTDGAV	S100A8
2	ERSIIGMID	S100A7	32	NTDGAVNFQ	S100A8
3	IIGMIDMFH	S100A7	33	GAVNFQEFL	S100A8
4	MIDMFHKYT	S100A7	34	NFQEFLILV	S100A8
5	RRDDKIEKP	S100A7	35	EFLILVIKM	S100A8
6	DKIEKPSLL	S100A7	36	ILVIKMGVA	S100A8
7	EKPSLLTMM	S100A7	37	IKMGVAAHK	S100A8
8	SLLTMMKEN	S100A7	38	GVAAHKKSH	S100A8
9	TMMKENFPN	S100A7	39	SQLERNIET	S100A9
10	MKENFPNFL	S100A7	40	ERNIETIIN	S100A9
11	FEKKDKNED	S100A7	41	IETIINTFH	S100A9
12	KDKNEDKKI	S100A7	42	IINTFHQYS	S100A9
13	NEDKKIDFS	S100A7	43	GHPDTLNQG	S100A9
14	KKIDFSEFL	S100A7	44	DTLNQGEFK	S100A9
15	DFSEFLSLL	S100A7	45	NQGEFKELV	S100A9
16	EFLSLLGDI	S100A7	46	EFKELVRKD	S100A9
17	SLLGDIATD	S100A7	47	ELVRKDLQN	S100A9
18	GDIATDYHK	S100A7	48	VRKDLQNFL	S100A9
19	ATDYHKQSH	S100A7	49	MEDLDTNAD	S100A9
20	TELEKALNS	S100A8	50	LDTNADKQL	S100A9
21	EKALNSIID	S100A8	51	NADKQLSFE	S100A9
22	LNSIIDVYH	S100A8	52	KQLSFEEFI	S100A9
23	IIDVYHKYS	S100A8	53	SFEEFIMLM	S100A9
24	GNFHAVYRD	S100A8	54	EFIMLMARL	S100A9
25	HAVYRDDLK	S100A8	55	MLMARLTWA	S100A9
26	YRDDLKLL	S100A8	56	ARLTWASHE	S100A9
27	DLKKLLETE	S100A8	57	TWASHEKMH	S100A9
28	KLLETECPQ	S100A8	58	PDTLNQGEF	S100A9
29	LETECPQYI	S100A8	59	KHHAKVGSA	ランダム配列
30	FKELDINTD	S100A8	60	TLVNSVNSK	BMP2

No.59がネガティブコントロールとして用いた石灰化誘導能を示さないランダム配列ペプチド、No.60がポジティブコントロールとして用いた歯髄創傷治癒を促進することが報告されているBMP2由来ペプチドを示す。

表2 Protein S100ファミリー由来ペプチドを用いた直接覆髄実験で形成された第三象牙質のスコア

スコア	No.1 ペプチド	No.2 ペプチド	No.3 ペプチド	No.4 ペプチド	S100A8	S100A9	PBS
0	0	8	2	5	5	5	8
1	0	0	3	1	0	0	0
2	3	0	2	1	1	2	0
3	5	0	1	1	2	1	0

Protein S100ファミリー由来ペプチド (No.1～No.4)を用いた直接覆髄実験により形成された第三象牙質のスコアを示す。スコアは、形成された第三象牙質が、露髄部の1/3以下のものをGrade0、露髄部の1/3～2/3のものをGrade1、露髄部の2/3以上のものをGrade2、露髄部を完全に覆う第三象牙質形成を認めるものをGrade3として評価した。No. 1ペプチドを用いて覆髄を行った試料のみが、5試料において露髄部を完全に封鎖する第三象牙質形成を認めた。

表3 Protein S100ファミリー由来No.1ペプチドもしくはS100A8とDPSCsを相互作用させ、発現したタンパク質のLC-MS/MS解析

A

細胞膜由来タンパク質 Identified Proteins	quantitative value (a.u.)		
	No.1ペプチド	S100A8	Control
Flotillin-1 (FLOT1)	10.104	6.3733	4.3079
Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase (3KCR1)	6.7361	5.3111	3.231
Protein LYRIC (LYRIC)	5.6134	3.1867	2.154
Gap junction alpha-1 protein (GJA1)	3.3681	4.2489	1.077
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP2K1)	0	2.1244	2.154
Cadherin-2 (CDH2)	0	3.1867	3.231
GTPase Nras (NRAS)	0	7.4355	7.5389
Mitogen-activated protein kinase 1	1.1227	2.1244	3.231

B

細胞質由来タンパク質 Identified Proteins	quantitative value (a.u.)		
	No.1ペプチド	S100A8	Control
Protein S100A13 (S100A13)	1.889	1.8042	0.93281
Nucleolar protein 3 (NOL3)	1.889	1.8042	0.93281
Adapter molecule crk (CRK)	2.8335	6.3146	6.5297
Proteasome subunit beta type-7	0	2.7062	3.7312

Protein S100ファミリー由来ペプチド (No.1ペプチド)もしくはS100A8をDPSCsに作用させたときのタンパク質発現に対して、LC-MS/MS解析をおこなった結果、同定された特徴的なA:細胞膜由来もしくはB:細胞質由来タンパク質を示す。発現量が上昇したタンパク質の中でNFκBシグナル経路を促進する機能を持つタンパク質 (橙色)、発現量が減少したタンパク質の中でMAPKシグナル経路を促進する機能を持つタンパク質 (水色)をそれぞれ示す。quantitative valueは各試料で計測された数値 (a.u.)を示す。