

2022 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

(1) 事業名（下記より該当事業名を選択し、ほかは削除して下さい。）

共同研究員

(2) 研究代表者

氏名：高橋 雄介

所属機関名・部局名・職名：大阪大学・歯学部附属病院・講師

(3) 研究課題名（申請時に記載したものと同一課題名を記入して下さい。）

歯髄創傷治癒を促進するペプチド医薬品の開発

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：鈴木 守准教授（研究室名：超分子構造解析学研究室）

(5) 研究成果の概要（公開）

***背景および目的、方法と結果、について、公開して差し支えない範囲で1ページ以内で記載。**

人類における最大の細菌感染症の一つであるう蝕は、歯の喪失原因の約半数を占める疾患であり、世界的に蔓延している。う蝕が進行し、エナメル質内層の象牙質が侵襲を受けるとそのさらに内側に存在する歯髄組織は防御反応として硬組織形成を誘導するという創傷治癒機転が開始されることが知られている。この歯髄組織を喪失すると、歯は知覚を失い、それ以降のう蝕などの侵害刺激に対しての認知が不可能になるばかりでなく、構造的に脆弱となり、歯根破折などの致命的な状態を惹起する可能性が高まり、結果的に歯の寿命が短くなることが明らかとなっている。

歯科の臨床において、う蝕除去の際に偶発的に歯髄が露出する場合があります（露髄）、露髄をきたした歯髄を保護し、かつ歯髄組織の創傷治癒機転を促進する目的で薬剤を同部に塗布する覆髄という処置が高頻度に行われている。現在、覆髄には水酸化カルシウム製剤や Mineral Tri-oxide Aggregate (MTA) などの無機材料が用いられている。しかし、これらの材料を用いた覆髄処置の長期的な成功率は約 60% という報告もあり、まだ改善の余地がある治療方法といえる。また、これらの材料はあくまでも歯髄に対してカルシウムを供給する目的で開発されたものであり、歯髄の創傷治癒に基づく生物学的な作用を有していない。その大きな要因は歯髄の創傷治癒メカニズムが現在も完全には解明されていないことに端を発するが、それゆえに、本メカニズムに基づく覆髄材は現在も存在しない。したがって、歯髄創傷治癒の作用機序を解明し、本来生体の持つ創傷治癒機転に基づくような覆髄材の開発が急務である。

われわれはこれまでに、象牙質の有機成分（象牙質基質）が歯髄で特異的に発現する Matrix Metalloproteinase 20 (MMP20) によって分解を受け、分解を受けた象牙質基質が歯髄の創傷治癒を促進することを解明し、さらにその分解象牙質基質に含まれるタンパク質の同定に成功し、これらのタンパク質も歯髄創傷治癒に有効であることを見出した。しかし、これらのタンパク質がどのような分子メカニズムで歯髄創傷治癒を促進しているかはいまだに判明していない。

そこで本研究では、このタンパク質が歯髄のどの分子と相互作用するかを検索し、歯髄創傷治癒メカニズムの一端を解明し、またその分子同士がアミノ酸レベルでどのような相互作用をしているか解明することを目的としている。

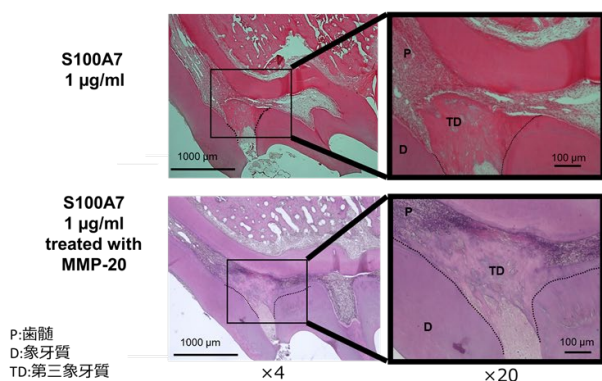
われわれがこれまでに同定した、歯髄創傷治癒を促進する分子の一つである Protein S100A7(以下 S100A7)はジスルフィド結合を 1 カ所持つタンパク質である。そのため通常の大腸菌培養法による精製では正常な立体構造を構築できないためリフォールディングが必要となる。しかし、リフォールディングは一般的に操作が煩雑でタンパク質の収率が低いと言われている。そこでリフォールディングを避けるため、使用する大腸菌株として Origami2 (DE3) Singles Competent Cells (Novagen) を用い、S100A7 の N 末端にチオドレキシン配列を付与することで正常な立体構造を構築することが可能であると考えた。そしてチオドレキシンを付与した S100A7 の精製後に付与されたチオドレキシンを除去するためチオドレキシン配列と S100A7 配列の間に TEV プロテアーゼ認識配列を挿入し TEV プロテアーゼを作用させ S100A7 のみを精製することを試みた。まず、チオドレキシン-TEV プロテアーゼ認識配列-S100A7 を発現するプラスミドを構築し、大腸菌に形質転換を行い培養した。得られた大腸菌をコバルトレジンをを用いたアフィニティー精製後、ゲルろ過クロマトグラフィーにて更に精製を行うことにより一定量のチオドレキシン-TEV プロテアーゼ認識配列-S100A7 の精製に成功した。しかし、そこに TEV プロテアーゼを作用させてもチオドレキシンと S100A7 を切断することができなかった。今後さらに方法の検討が必要であると考えられる。

また、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。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。

H-E 染色による病理学的評価



micro-CTによる第三象牙質の評価

