

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09627

研究課題名(和文) アメロゲニン-TGF 複合体を用いた歯周組織再生型インプラント開発の基礎研究

研究課題名(英文) Basic study on development of periodont tissue regenerative implants

研究代表者

山越 康雄 (Yamakoshi, Yasuo)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：20182470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アメロゲニン-TGF 複合体を用いた歯周組織再生型インプラント体の開発を目指すために、エナメル質中に存在するTGF- β の動態について調べた。その結果、エナメル質形成過程におけるエナメル質中のTGF- β のオートクリン機構を解明した。TGF- β のアイソフォーム(TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3)でエナメル質形成に関連する遺伝子発現に差異があるかを調べたところ、TGF- β 3がTGF- β 1およびTGF- β 2と異なる作用を示すことが判明した。TGF- β のアイソフォーム間ではエナメル芽細胞のアポトーシスやアメロゲニンの取り込み(エンドサイトーシス)においても差があることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周組織再生療法で用いられているエムドゲインは、ブタから粗抽出した幼若エナメルタンパク質である。その主成分はアメロゲニン(Amel)であるが、生理活性物質のTGFも含まれている。本研究期間では純度の高いAmel-TGF複合体の開発を目指し、それら複合体のエナメル質形成過程における動態を解明して、歯根膜組織中の幹細胞から石灰化細胞への分化誘導因子として利用できる可能性を見出した。このことは、Amel-TGF複合体を用いてインプラント体表面上の歯根膜組織の新たな生理作用が明らかになれば歯科インプラント治療や歯周組織再生への応用が十分に考えられ、学術的および社会的にも意義の高いものになる。

研究成果の概要(英文)：The final goal for this study is to develop periodontal tissue regeneration implants using the amelogenin-TGF complex. We first investigated the dynamics of TGF- β present in enamel. As a result, (1) the autocrine mechanism of TGF- β in enamel formation process was elucidated. (2) When the isoforms of TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3) were examined for differences in gene expression related to enamel formation, it was found that TGF- β 3 showed different effects than TGF- β 1 and TGF- β 2. (3) It was found that there was also a difference in the uptake (endocytosis) of amelogenin into ameloblasts among TGF- β isoforms.

研究分野：口腔生化学

キーワード：インプラント アメロゲニン TGF- β 歯根膜 オートクリン エナメルタンパク

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 昨今の iPS 細胞作製技術により今後さらに歯の再生技術の進歩が予想される中、歯の形成に関わるタンパク質や生理活性物質の構造機能解析が重要な研究課題となっている。研究代表者のグループは、骨とインプラント体の間に歯根膜細胞を共存させることにより、歯根膜組織を構築再生出来るかどうか取り組んできた結果、これまでにラットの臼歯を抜歯後、歯根膜の残存している抜歯窩にヒドロキシアパタイト (HA)・コーティング

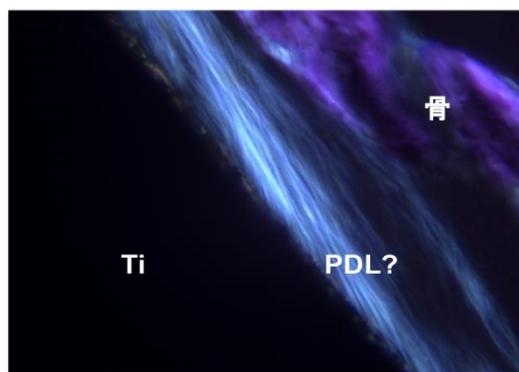


図1: 骨とチタンインプラント(Ti)間に再生された歯根膜様繊維組織(PDL?)

したラットの歯型インプラントを移植し、一部歯根膜様の組織を再生させることに成功した(図1)。この実験では通常のインプラント手術と違い、抜歯窩に歯根膜細胞が残存した状態でインプラントを移植しており、繊維状の組織(歯根膜:PDL?)がチタン(Ti)と骨の間に再生されているのが観察できた。この結果は歯根膜細胞が存在している状態で、何らかの条件を満たせば歯根膜組織中の幹細胞より石灰化細胞へ分化誘導することが可能であり、さらに石灰化組織の間に軟組織を残すことも可能であるということを示唆していた。

(2) 上記結果により研究代表者らは歯根膜細胞が存在している状態で、何らかの誘導促進物質があれば歯根膜組織中の幹細胞より石灰化細胞への分化誘導が助長され、さらに石灰化組織の間に安定した軟組織を残すことも可能になるのではないかと仮説を立て、誘導促進物質としてトランスフォーミング成長因子ベータ (TGF β) に着目した。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、形成過程のエナメルタンパク中で最も多く見出されるアメロゲニンと TGF- β の複合体を開発し、それを用いて HA コーティングした Ti および Zr インプラント体表面上の歯根膜細胞の分化能に及ぼす影響を解析することで、歯周組織再生型インプラント体の開発に向けてまだ解明されていない基礎研究を完成し、インプラント体開発に向けた応用研究を展開することを目的とした。

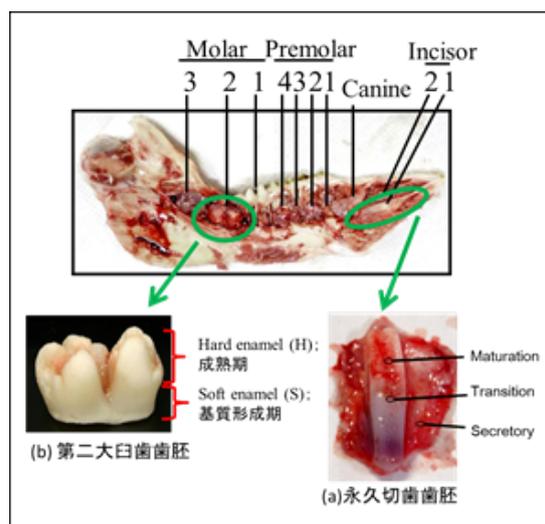


図2: 生後約5か月ブタ下顎骨及び歯胚

3. 研究の方法

(1) エナメル質形成過程の TGF- β および TGF- β 受容体の遺伝子発現

基質形成期、移行期、成熟期に相当するブタ切歯エナメル芽細胞(図2a)中の TGF- β および TGF- β 受容体の遺伝子発現量を解析した。

(2) アメロゲニンの分離精製

ブタ第二大臼歯歯胚より基質形成期及び成熟期エナメル質を削り取り（図 2 b）、タンパク質画分を連続的に抽出・分画した。

(3) エナメル質中の TGF- β の同定

TGF- β を含むタンパク質画分をヒト歯根膜由来培養細胞（HPDL）に対するアルカリホスファターゼ（ALP）活性を調べることで特定した。

(4) アメロゲニン-TGF- β 複合体の検出

TGF- β 抗体およびビオチン化したアメロゲニン抗体を用いて ELISA にて精製したアメロゲニンに対する TGF- β の結合能を調べた。

(5) アメロゲニン-TGF- β 複合体の分解

アメロゲニン-TGF- β 複合体に MMP20 およびカリクレイン 4（KLK4）を作用させて分解様式を調べた。

(6) TGF- β アイソフォームの検出

生後 5 日齢および 11 日齢のマウスエナメル質中の TGF- β アイソフォーム（TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3）を ELISA にて検出した。

(7) TGF- β アイソフォーム間における遺伝子発現、アポトーシスの差異

マウス由来エナメル上皮細胞（mHAT9d）を用いてエナメル質形成関連遺伝子の発現の差異およびアポトーシスの影響を調べた。

(8) TGF- β アイソフォーム間におけるアメロゲニンのエンドサイトーシスの影響

アメロゲニンを蛍光標識化し、mHAT9d に対する取り込み（エンドサイトーシス）に対する TGF- β アイソフォーム間の影響を調べた。

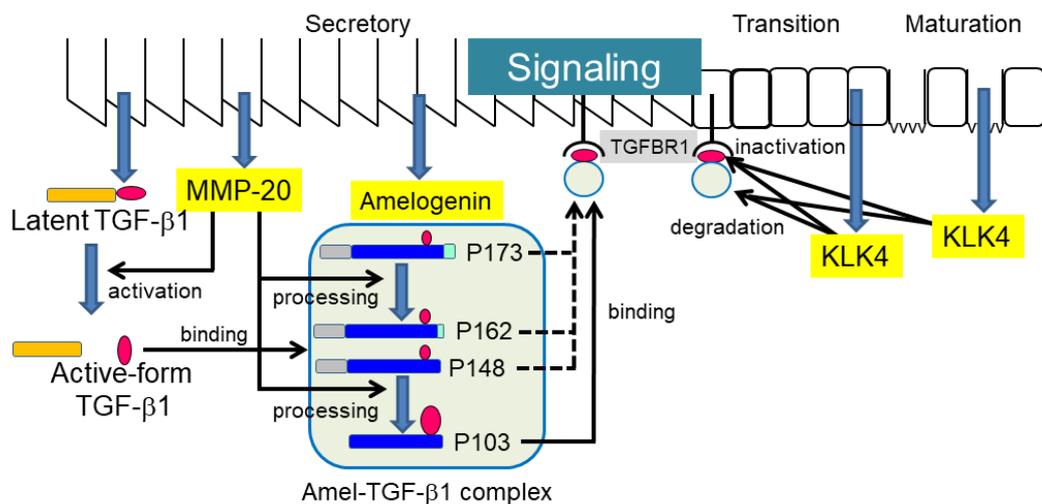


図3: エナメル質形成過程における TGF- β のオートクリン機構

4. 研究成果

(1) 本研究では図 3 に示すようにアメロゲニン-TGF- β 複合体のエナメル質形成過程におけるオートクリン機構を解明した。すなわち TGF- β は基質形成期エナメル芽細胞から不活性型として合成・分泌した後、MMP-20 によって活性化され、同じく MMP-20 によってプロセッシングを受けたアメロゲニンに結合して、その活性が維持される。その後、水溶性アメロゲニン(P103)は基質形成期エナメル質中で約 50%を占める水相を移動してエナメル芽細胞表面の TGF- β 受容体に結合してシグナル伝達を担う。そして TGF- β はエナメル芽細胞が成熟期になると、そこから合成・分泌される KLK4 によってアメロゲニンと共に分解される。この発見は、エナメル質形成における生理活性物質のシグナル伝達研究において、世界的にも今後さらに発展する可能性を秘めたものである。

(2)本研究ではさらに TGF- β アイソフォーム間でエナメル質形成過程における各種タンパク質の遺伝子発現、エナメル芽細胞のアポトーシス、アメロゲニンの取り込み（エンドサイトーシス）に差異があることを解明した。

本研究によりアメロゲニン-TGF- β 複合体が歯周組織再生型インプラントに向けた歯周組織を再生させる誘導物質として利用できる可能性を見出したので、今後インプラント体を用いて細胞（特に歯根膜細胞）を培養してこの複合体の有用性を見出したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kobayashi Saeko, Yamakoshi Yasuo, Asada Yoshinobu	4. 巻 60
2. 論文標題 TGF- autocrine signaling at secretory-stage enamel	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 70～75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2018.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okubo M, Chiba R, Karakida T, Yamazaki H, Yamamoto R, Kobayashi S, Niwa T, Margolis HC, Nagano T, Yamakoshi Y and Gomi K	4. 巻 61(1)
2. 論文標題 Potential Function of TGF-b Isoforms in Maturation-Stage Ameloblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Oral Biosci.	6. 最初と最後の頁 43-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2018.12.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 千葉理紗子, 唐木田丈夫, 山本竜司, 山越康雄
2. 発表標題 エナメル質形成過程におけるTGF- アイソフォームについて
3. 学会等名 第61回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮川友里, 唐木田丈夫, 小林冴子, 山越康雄, 朝田芳信
2. 発表標題 TGF- アイソフォームによる成熟期エナメルタンパク遺伝子発現の制御
3. 学会等名 第61回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Kobayashi, M. Okubo, R. Chiba, R. Yamamoto, Y. Yamakoshi, Y. Asada
2. 発表標題 Potential function of TGF- isoforms in maturation-stage ameloblasts
3. 学会等名 97th IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保水羽, 千葉理紗子, 長野孝俊, 山越康雄, 五味一博
2. 発表標題 エナメル芽細胞に及ぼすTGF- の影響
3. 学会等名 第61回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大久保水羽, 千葉理紗子, 唐木田丈夫, 山本竜司, 小林冴子, 長野孝俊, 五味一博, 山越康雄
2. 発表標題 エナメル質形成過程における TGF- のシグナル伝達
3. 学会等名 第60回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	山本 竜司 (YAMAMOTO Ryuji) (20410053)	鶴見大学・歯学部・講師 (32710)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	唐木田 丈夫 (KARAKIDA Takeo) (40367305)	鶴見大学・歯学部・講師 (32710)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関