

平成21年 4月10日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791588
 研究課題名 (和文) アメロジェニンと BMP の相互作用による若年性歯周炎治療法の確立
 研究課題名 (英文) Establishment of the juvenile periodontitis therapy by the interaction of amelogenin and BMP
 研究代表者
 齋藤 幹 (SAITO KAN)
 長崎大学 医学部歯学部附属病院 助教
 研究者番号 40380852

研究成果の概要：

アメロジェニンが主成分と言われているエムドゲインには骨形成タンパクである BMP(Bone Morphogenetic Protein)が含まれていた。そしてエムドゲインにアメロジェニンが含まれた理由として、アメロジェニンと BMP がヘパリン/ヘパラン硫酸を介して結合するためであった。次にアメロジェニンによる骨形成への影響を検討した。その結果、アメロジェニンは骨芽細胞分化に直接関与していなかった。しかしアメロジェニンは BMP のアンタゴニストである noggin の効果を阻害することにより、間接的に骨芽細胞分化へ貢献していることが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,000,000	0	2,000,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 矯正・小児系歯学

キーワード：小児歯科学

1. 研究開始当初の背景

小児歯科領域における歯周疾患として前思春期性歯周炎や若年性歯周炎が挙げられる。これらの歯周炎は *Actinobacillus actinomycetemcomitans* が原因菌といわれ、口腔内にプラークや歯石はほとんど見られないにも関わらず、重篤な硬組織の破壊を伴う細菌感染症で、不可逆的に急速な歯槽骨の吸収を引き起こす。現在の治療法としては歯周外科や抗生剤の投与が一般的であるが、十分な効果を得られず、非常に予後が悪い疾患

である。

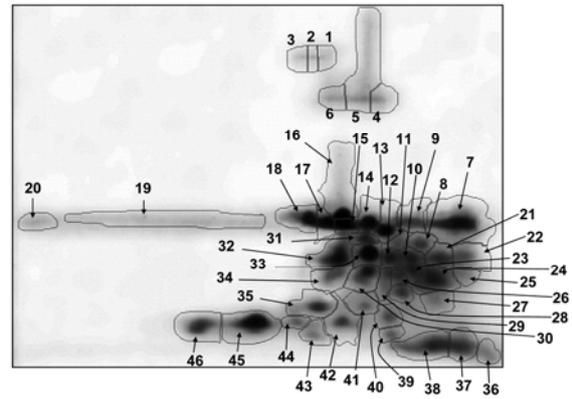
近年、成人の歯周外科治療にエムドゲインが使用されており、病的骨吸収がられる部位に塗布する事により、骨が回復することが臨床的に証明されている。エムドゲインはブタの歯胚から抽出したエナメルマトリックスタンパクであり、主な成分はアメロジェニンと言われている。アメロジェニンはエナメル質形成に重要な分子である。しかしアメロジェニンノックアウトマウスでは経年的に破骨細胞が増加し、歯根を吸収することから、

アメロジェニンがエナメル質形成のみならず骨代謝にも関与している事が分かってきた。しかし、エムドゲインにはアメロジェニンには無い TGF- β (Transforming Growth Factor- β) 様活性や BMP(Bone Morphogenetic Protein)様活性があると報告されている。これらの事から、エムドゲインのメカニズムは不明な点が多いのが現状である。

2. 研究の目的

我々は以前にエムドゲインに含まれる成分の解析を行った。まず、エムドゲインを二次元電気泳動することによって等電点と分子量で分離した。このゲルを元に、CBB 染色とアメロジェニン、BMP、TGF- β 抗体を用いたウエスタンブロッティング法にて検討した結果、エムドゲイン中にアメロジェニンと BMP2/4 が含まれ、TGF- β は含まれないことが判明した。

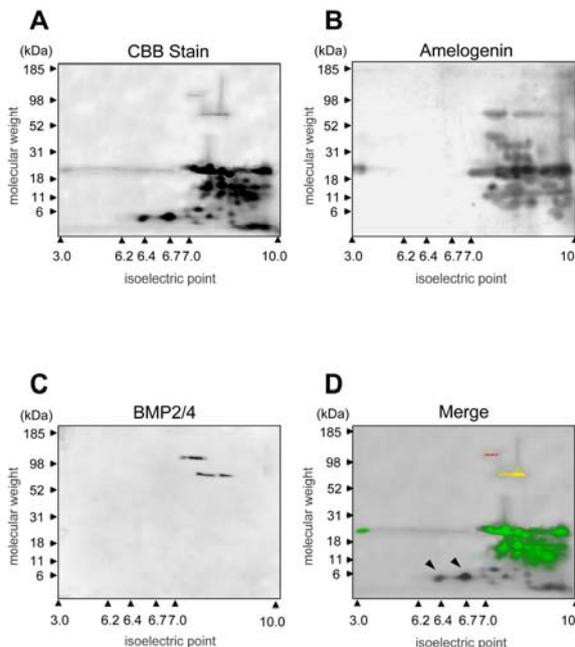
更に二次元電気泳動解析ソフトである Progenesis PG200 にて、これら二次元電気泳動の結果のスポット解析を行った。その結果、アメロジェニン(緑)が約 72%、BMP2/4(赤)が約 1.9%、そしてどの抗体にも反応しない unknown 分子(黒)が 19.5%含まれていた。そして特筆すべき点として BMP とアメロジェニン共に反応したスポット、すなわちアメロジェニンと BMP が結合したと思われるタンパク(黄)が約 6.8%認められた。



amelogemin				BMP			
No.	Vo(%)	pI	MW(kDa)	No.	Vo(%)	pI	MW(kDa)
7	7.4	9.2	23	1	0.7	7.5	115
8	1.5	8.7	18	2	0.4	7.4	113
9	2.2	8.6	24	3	0.7	7.2	113
10	1.6	8.6	15				
11	0.8	8.4	18				
12	1.6	8.3	15				
13	2.5	8.3	22				
14	2.3	8.1	24				
15	1.5	7.8	22				
16	4.3	7.7	32				
17	1.7	7.5	23				
18	2.7	7.2	24				
19	5.1	5.6	24				
20	1.1	3.9	23				
21	2.1	8.9	15				
22	2.4	9.3	15				
23	1.0	8.6	12				
24	3.7	8.9	11				
25	0.9	9.3	12				
26	0.9	8.4	12				
27	1.8	8.9	8				
28	1.3	8.5	9				
29	1.3	8.2	11				
30	2.6	8.0	12				
31	1.1	8.0	19				
32	3.8	7.6	16				
33	2.7	8.0	16				
34	2.1	7.6	12				

BMP + amelogemin			
No.	Vo(%)	pI	MW(kDa)
4	1.2	8.2	78
5	4.5	8.0	108
6	1.1	7.6	79

unknown			
No.	Vo(%)	pI	MW(kDa)
35	2.7	7.4	8
36	1.1	9.5	3
37	2.6	9.2	4
38	4.1	8.8	4
39	0.8	8.3	5
40	1.6	8.3	7
41	1.7	8.0	8
42	2.7	7.7	6
43	1.3	7.4	5
44	0.8	7.1	6
45	5.0	6.6	6
46	3.1	5.9	5



この結果からアメロジェニンと BMP が結合する可能性が示唆された。BMP と結合する分子として noggin やフォリスタチンなどがあるが、これらは BMP のアンタゴニストとして作用する。そのため BMP とアメロジェニンが結合することによって何らかの影響があるのではないかと推測される。そこで本研究はアメロジェニンと BMP が結合することの確認と、骨芽細胞におけるアメロジェニンと BMP との関係を検討することにより、成人性歯周病治療薬であるエムドゲインを改良し、若年性歯周炎にも使える治療薬の検討を行う。

3. 研究の方法

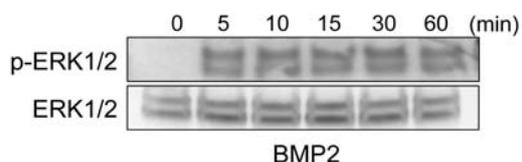
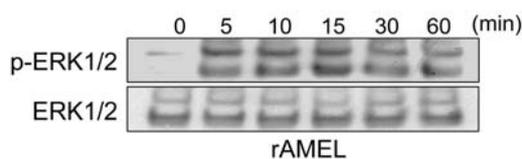
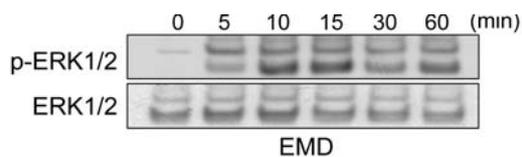
本研究ではまず、アメロジェニンと BMP の結合の確認および結合メカニズムの解析を行う。次にアメロジェニンと BMP による骨芽細胞への影響を検討する事にする。具体的には以下の通りである。

- (1) エムドゲインの二次元電気泳動で得られた結果の確認。
 - ① エムドゲイン中に含まれる BMP の活性検討。
 - ② エムドゲイン中に含まれる unknown 分子の検討
- (2) アメロジェニンと BMP 結合メカニズムの解析
- (3) アメロジェニンと BMP の結合力の測定
- (4) アメロジェニンと BMP による骨芽細胞分化への影響
- (5) アメロジェニンと BMP アンタゴニストによる骨芽細胞分化への影響

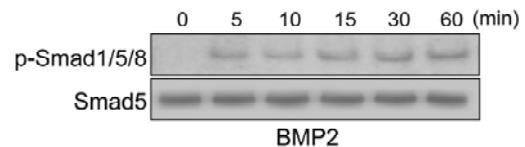
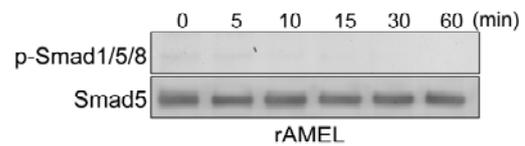
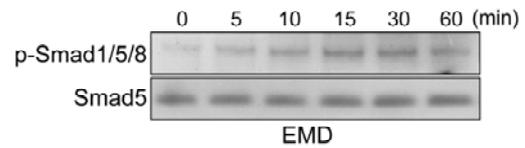
以上の点を明らかにし、アメロジェニンによる骨代謝への影響を検討する。

4. 研究成果

我々が以前に行った二次元電気泳動の結果からエムドゲイン中には BMP が含まれていることが示唆された。しかし、エムドゲイン中の BMP に活性があるのかは不明である。そこでエムドゲイン、BMP、アメロジェニンによる細胞内シグナルを調べることにした。まず、マウス骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞にエムドゲイン、BMP、アメロジェニンを添加し、経時的に ERK シグナルの変化を調べた。その結果、エムドゲイン、アメロジェニン、BMP ともに刺激を加えた 5 分後以降、ERK のリン酸化(p-ERK)が認められた。このことから、エムドゲインの ERK リン酸化はアメロジェニンと BMP によるものと考えられる。



次に BMP は骨芽細胞の細胞内シグナルである smad をリン酸化し、骨形成を促進することが知られている。そこで、エムドゲイン、アメロジェニン、BMP による smad のリン酸化(p-smad)を調べた。その結果、エムドゲインと BMP は刺激を加えた 5 分後からリン酸化されたのに対し、アメロジェニンは 60 分しても smad のリン酸化が認められなかった。このことからエムドゲイン中の BMP は活性を有しており、エムドゲインによる smad シグナルの活性化は BMP に起因するものと考えられる。



次に二次元電気泳動を解析すると、エムドゲイン中に BMP やアメロジェニン抗体と反応しなかった unknown スポットが存在した(スポット No.35~46)。このスポットの分子を特定するために、比較的スポットが大きかった No.45 と No.46(PI:5.9~6.6、分子量:5~6kDa)の N 末端アミノ酸シーケンスを行った。その結果、No.45 は N-MPLPPHPGHPGYINFSYEVL No.46 は N-MPLPPHPGHPGYINFFYEVL となり、BLAST 検索を行ったところ、どちらもアメロジェニンの N 末であった。アメロジェニン全長の分子量がおよそ 21 kDa であるため、恐らく全長アメロジェニンの分解産物や抗体とは反応しないスプライシングフォームではないかと考えられる。このことからエムドゲイン中に含まれるアメロジェニンの総量は 72% よりも高いことが判明した。

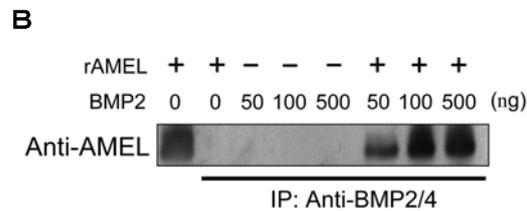
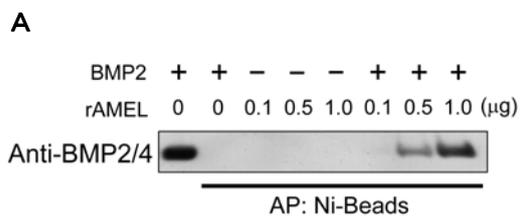
以上の結果からエムドゲインの主成分はアメロジェニンであるが、活性のある BMP も少量含まれていることが明らかとなった。

そしてエムドゲイン中に BMP が混入した理由として、二次元電気泳動のスポット解析から BMP とアメロジェニンが結合するためであると推測される。そこでアメロジェニンと BMP のリコンビナントタンパクを用いて共培養を行い、

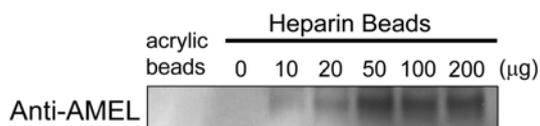
(A)アメロジェニンに付けた標識に反応する Ni ビーズによる沈降後、BMP 抗体によるウエスタンブロッティング法による確認。

(B)BMP 抗体による免疫沈降後、アメロジェニン抗体によるウエスタンブロッティング法による確認。

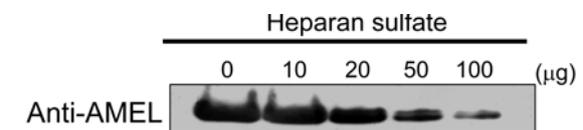
これら二種類の方法で確認実験を行った。その結果、どちらの場合でもアメロジェニンと BMP の結合が確認された。



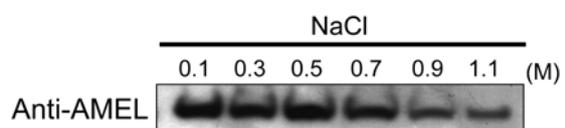
BMP と結合する分子として、ヘパリン/ヘパラン硫酸がある。この分子は BMP だけではなく、成長因子や接着因子、細胞外マトリックスとも結合する。アメロジェニンも細胞外マトリックスの一種のため、アメロジェニンとヘパリンとの結合を調べることにした。まず、ヘパリンが付着したアクリルビーズとアメロジェニンを共培養し、ヘパリンビーズを回収後、アメロジェニン抗体にてヘパリンビーズに付着したアメロジェニンを検出した。その結果、ヘパリンの濃度依存的にアメロジェニンと結合することが判明した。

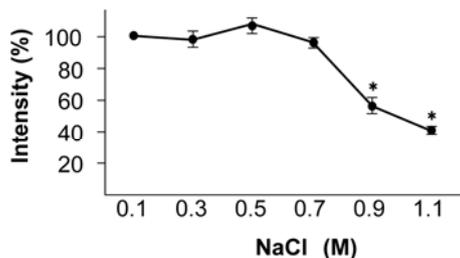


ヘパリンとヘパラン硫酸は基本的に糖鎖骨格が同じである。しかし、ヘパリンは肥満細胞のみが合成するプロテオグリカンであるのに対し、ヘパラン硫酸はすべての動物細胞が合成するプロテオグリカンである。そのため、骨形成の環境では骨芽細胞が多く存在するため、この環境におけるプロテオグリカンはヘパリンではなくヘパラン硫酸となる。そこで、ヘパラン硫酸とアメロジェニンとの結合を検討することにした。方法はヘパラン硫酸とアメロジェニンを共培養し、その後、ヘパリンビーズを加えて培養してヘパラン硫酸と結合しなかったアメロジェニンをヘパリンビーズと結合させた。このヘパリンビーズを回収し、ヘパリンビーズに付着したアメロジェニンをアメロジェニン抗体にて検出した。その結果、ヘパラン硫酸の濃度を上げることにより、ヘパリンビーズに付着したアメロジェニンの量が減少した。すなわちアメロジェニンはヘパリンだけではなく、ヘパラン硫酸とも結合することが判明した。このことから、アメロジェニンとヘパラン硫酸との結合は骨形成環境下でも起こりえることが示唆された。



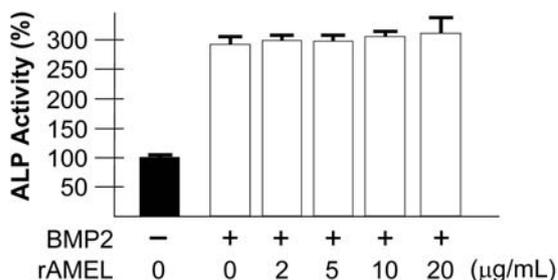
次に生体内でもアメロジェニンとヘパリンが結合するかどうかを検証するため、結合力を測定した。その結果、アメロジェニンとヘパリンの結合は NaCl 濃度が 0.8M 以上で分離する事が判明した。アメロジェニン以外にヘパリンと結合する分子とし線維芽細胞増殖因子である FGF (Fibroblast Growth Factor) が挙げられ、ヘパリンとの結合は NaCl 濃度が 0.5M から 0.9M 程度で分離する事が知られている。このことから、アメロジェニンとヘパリンとの結合は FGF とほぼ同程度の結合力を有し、生体内でも充分結合しうる能力を有することが判明した。



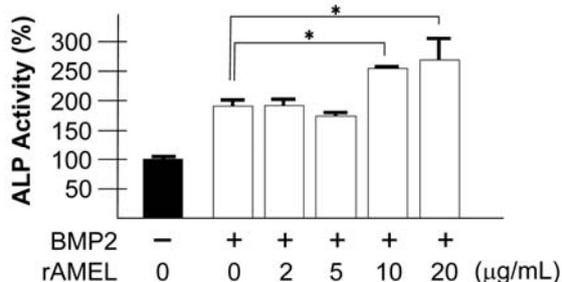


以上のことから、アメリロジェニン[®]は生体内の骨形成環境下でもヘパラン硫酸と結合すると考えられる。BMP も同様にヘパラン硫酸と結合することが明らかとなっているため、アメリロジェニンは骨形成環境下でヘパラン硫酸を介して BMP と結合していることが示唆された。

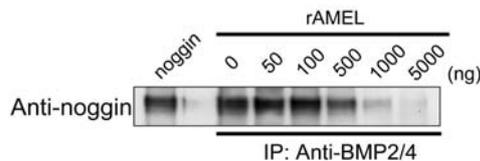
BMP は未分化な細胞に作用し、骨芽細胞に分化誘導をするだけでなく、骨芽細胞に直接作用し、骨形成を促進させる役割がある。また、BMP と結合する分子として、noggin やフォリスタチン、コーディン等がある。これらの分子は BMP のアンタゴニストとして作用しており、BMP と結合することによって BMP による骨形成効果を阻害することが知られている。そのため、これらアンタゴニストと同様に BMP と結合する事が判明したアメリロジェニンも BMP による骨形成に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。そこでマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞に BMP50ng/ml とアメリロジェニンを 0~20 μ g/ml の濃度で添加し、14 日間培養を行った。その後アルカリフォスファターゼ活性を計測し、骨形成能を測定した。その結果、アメリロジェニンの濃度を 20 μ g/ml まで加えてもアルカリフォスファターゼ活性の変化が認められなかった。このことからアメリロジェニンは noggin やフォリスタチン、コーディン等のような BMP のアンタゴニストとしての機能を有しておらず、またアゴニストの様な骨形成の促進能も有していなかった。すなわちアメリロジェニンは骨芽細胞に直接作用していないと思われる。



次にアメリロジェニンと同様に BMP と結合する分子に noggin がある。noggin は BMP と結合し、BMP がレセプターと結合することを阻害する。そのため、BMP による細胞内シグナルを伝えることが出来ず、BMP による骨形成をキャンセルすることが既に判明している。そこでアメリロジェニンが noggin-BMP 結合に何らかの影響を与えているのではないかと推測し、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞に BMP を 50ng/ml、noggin を 400 ng/ml、アメリロジェニンを様々な濃度で添加し、培養を行った後アルカリフォスファターゼ活性を測定した。その結果、低濃度のアメリロジェニンでは noggin の効果により BMP が抑制されていたが、アメリロジェニンを 10 μ g/ml 以上添加した場合、noggin による BMP 抑制効果が阻害され、アルカリフォスファターゼ活性の上昇が認められた。



上記の結果から骨芽細胞ではアメリロジェニンが BMP と結合し、BMP と noggin の結合を阻害する事が示唆された。そこで、この現象を分子レベルにて確認することにした。1 μ g の BMP と 100ng の noggin にアメリロジェニンを 0~5 μ g の濃度で添加して、4 \times 8 時間培養した。その後、BMP 抗体で免疫沈降を行い、回収した試料に対して noggin 抗体でウェスタンブロッティングを行った。その結果、アメリロジェニンの濃度が高くなるにつれて BMP と noggin が結合している量が減少した。すなわちアメリロジェニンの濃度が増加することによって BMP と noggin の結合を阻害していることが判明した。



以上の研究結果をまとめると

- (1) エムドゲインの主成分はスプライシングフォームや分解産物を含むアメロジェニンであるが、BMP も少量含まれている。
- (2) エムドゲインに含まれる BMP には活性がある。
- (3) エムドゲインに BMP が含まれる原因は BMP とアメロジェニンが結合するためである。
- (4) BMP とアメロジェニンが結合するメカニズムはヘパリン/ヘパラン硫酸を介して結合する。
- (5) ヘパラン硫酸とアメロジェニンの結合は生体内でも起こり得る。
- (6) アメロジェニンは BMP のアゴニストでもアンタゴニストでもなく、BMP による骨形成に直接影響を与えていない。
- (7) BMP とアメロジェニンが結合することにより、noggin と BMP の結合を阻害する。
- (8) アメロジェニンは noggin と BMP の結合を阻害することにより、noggin の持つ BMP 活性抑制効果を阻害する。

アメロジェニンは骨形成に直接影響を与えてはいなかったが、noggin をブロックすることにより BMP の活性を十分に発揮できる環境を作り上げる効果があることが判明した。

今後はアメロジェニンのスプライシングフォームによる効果の検討やアメロジェニンと BMP の混合比の検討することにより、エムドゲイン以上の効果を有する歯周病治療薬の検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Nishiguchi M, Yuasa K, Saito K, Fukumoto E, Yamada A, Hasegawa T, Yoshizaki K, Kamasaki Y, Nonaka K, Fujiwara T, Fukumoto S:

Amelogenin is a negative regulator of osteoclastogenesis via downregulation of RANKL, M-CSF and fibronectin expression in osteoblasts.

Arch Oral Biol. 52(3):237-243. 2007 (IF: 1.655)

Saito K, Konishi I, Nishiguchi M, Hoshino T, Fujiwara T:

Amelogenin binds to both heparan sulfate and bone morphogenetic protein 2 and pharmacologically suppresses the effect of noggin.

Bone. 43(2):371-376. 2008 (IF:3.829)

[学会発表] (計 1 件)

齋藤 幹, 星野 倫範, 小西 郁理, 藤原卓: アメロジェニンはヘパラン硫酸と結合する 第 49 回歯科基礎医学会 (札幌) 2007
Journal of oral biosciences, 49(Suppl.):152

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

・ 齋藤 幹 (SAITO KAN)

長崎大学 医学部歯学部附属病院 助教
研究者番号 40380852

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者