

平成 21 年 3 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791637

研究課題名 (和文) 初期齲蝕に対するエナメル質再構築法の開発の為の基礎研究

研究課題名 (英文) Basic research for enamel regeneration of initial caries

研究代表者

福本 恵美子 (FUKUMOTO EMIKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10264251

研究成果の概要：200 字程度

エナメル質はエナメル芽細胞によって形成される。このエナメル芽細胞のエナメル質形成様式を解明することによって、初期う蝕の強固な再石灰化を促進できるかもしれない。そのために、成熟期エナメル芽細胞に特異的に発現する分子を解析した。今回着目したAnxa2は成熟期エナメル芽細胞に発現し、LAMP1・LAMP2・エナメルリンと局在を共にする時期があり、LAMP2とAnxa2との結合に抑制的に働いていることが予測された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野：予防歯科

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：発生・分化, エナメル芽細胞, 歯学

1. 研究開始当初の背景

人工エナメルマトリックス (アメロジェニン) を用いることで、既存のアパタイト結晶を伸長させることが可能であることから、その他のエナメルマトリックス分子はエナメル表層が破壊された初期の齲蝕に対しても、人工的に再生させることが可能と考えられる。しかしながら、エナメルマトリックスを応用したエナメル質の再生では、多くの有機成分 (主にエナメルマトリックス) が存在し、石灰化度の低いエナメル質である可能性が考えられ、齲蝕に抵抗性のあるエナメル質と

は言いがたい。そこで、生体内で形成されるエナメル質のように、有機質を脱却することが可能となれば、齲蝕によって欠損した歯質を非侵襲的に再生することができると考えられるが、実際エナメル質の成熟過程に関わる分子メカニズムもいまだ不明である。

2. 研究の目的

エナメル芽細胞の成熟期過程に重要と考えられる分子の包括的なスクリーニングを行ない、その分子機能を明らかにすること、そして既に成熟期に強い発現を示すことが

明らかなAnxa2の分子機能主にエナメルマトリックスの脱却過程にかかわる機構を解明することで、実質欠損を伴うエナメル質齲蝕におけるエナメル質の再構築（再生）法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1)成熟期エナメル芽細胞に特異的に発現する分子のスクリーニング

ディファレンシャルディスプレイ法を用いて、歯の形成に異常を示す疾患に関連した遺伝子のスクリーニングを行い、そのデータベースを利用して、成熟期エナメル芽細胞に特異的に発現する分子候補を同定する。

(2)真核細胞発現ベクターの作成

1)の実験で得られた成熟期エナメル芽細胞特異的分子につき、pEF6/V5-His-TOPOベクターを用いて真核細胞発現ベクターの構築を行う。

(3)過剰発現細胞の作成とその機能解析

実験2)で作製した、真核細胞発現ベクターを、歯原性上皮細胞株(mDE6)に遺伝子導入をおこない、安定発現細胞株の作成をおこなう。これら遺伝子導入による影響を検討するため、エナメル芽細胞分化マーカー(アメロジェニン、アメロブラスチン、エナメルリン等)の遺伝子発現を検討する。さらに成熟期エナメル芽細胞の分化マーカーとして我々のグループが同定したAnxa2の発現誘導につきRT-PCR法を用いて検討を行う。

(4)Anxa2過剰発現細胞におけるエナメル芽細胞の分化機能解析

Anxa2に対する真核細胞発現ベクター及び、その過剰発現歯原性上皮細胞株を作成し、またこれら遺伝子の導入細胞よりmRNAを精製し、Anxa2によって発現制御を受ける分子を同定するために、cDNAマイクロアレイを用いた遺伝子スクリーニングを行い、Anxa2過剰発現によって発現変化の認められる分子につき、歯の発生過程における発現パターンの同定(RT-PCR法)と、機能分類を行い、Anxa2の成熟期エナメル芽細胞に及ぼす影響を検討する。

(5)Anxa2及びエナメルマトリックスのエナメル芽細胞分化過程での発現検討

抗Anxa2抗体及び抗アメロジェニン重複染色をおこない組織内局在を検討する。

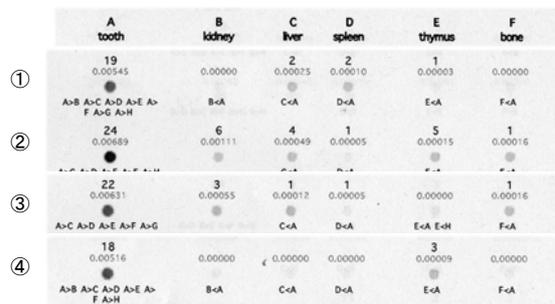
(6)Anxa2の細胞内におけるエナメルマトリックスとの相互作用の検討

エナメルリンでコートした培養ディッシュにAnxa2過剰発現歯原性上皮細胞を撒き、抗Anxa2抗体を用いた免疫沈降法を行う。さら

にAnxa2分子と共沈してきた分子につき、抗LAMP1, LAMP2, エナメルリン抗体を用いたwesternblot法にてAnxa2との結合を検討する。

4. 研究成果

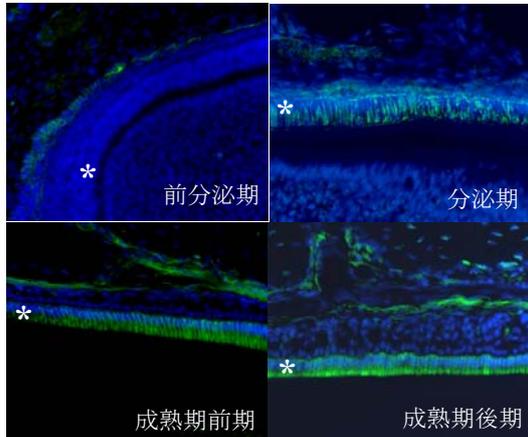
(1)成熟期エナメル芽細胞に特異的に発現する分子のスクリーニングとして、ディファレンシャルディスプレイ法を用いて、歯の形成に異常を示す疾患に関連した遺伝子のスクリーニングを行い、そのデータベースを利用して、成熟期エナメル芽細胞に特異的に発現する分子候補を同定した。その結果の一部を以下に示す。



- ① Calmodulin 2
- ② Ribosomal protein L4
- ③ Unknown cDNA clone
- ④ Annexin a2

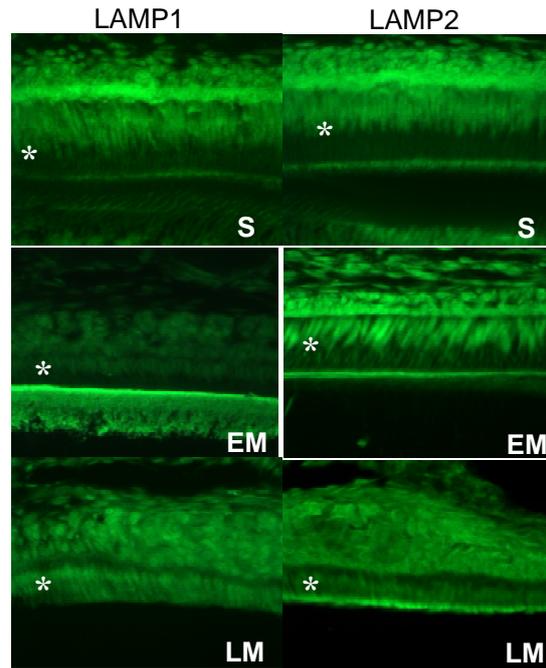
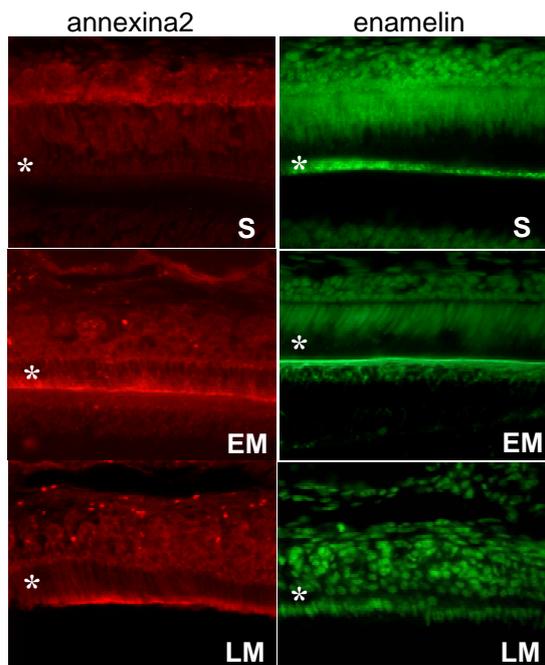
以上の様なデータベースを利用して、成熟期エナメル芽細胞に特異的に発現する分子候補として、まずAnxa2を選択した。この分子が、実際に成熟期エナメル芽細胞に発現しているかどうか確認するため、pEF6/V5-His-TOPOベクターを用いて真核細胞発現ベクターの構築を行い、歯原性上皮細胞株(mDE6)に遺伝子導入をおこない、安定発現細胞株を作成した。この細胞中のmRNAレベルでの様々な分子の発現量の違いをマイクロアレイで解析した結果、Anxa2過剰発現細胞で増加していたmRNAはkeratin complex 1 acidic gene-15, lysyl oxidase-2, mitotic arrest deficient2, retinoic acid receptor alpha, protein tyrosine phosphatase, annexin4, カルシトニン、FGF14、減少していたmRNAはBMP15、タイトジャンクションの接着因子であるclaudin-12、FGF20, keratin complex2, secretin, TNF, potassium channel Eag2などであった。

(2) Anxa2 タンパクの発現を、マウス上顎切歯のパラフィン切片を用いて、免疫染色を行い解析した結果、前分泌期には認められなかったが、分泌期に発現し始め、徐々に発現量が増加し、成熟期後期に最も発現が多く認められた。



青：核染色、緑：抗 Anxa2 抗体
*：エナメル芽細胞

(3) マウス下顎骨をパラフィン包埋した薄切切片を用いて、Anxa2とLAMP1、LAMP2、エナメルリンを重複蛍光染色しその局在を調べた結果、Anxa2とLAMP2でエナメル芽細胞分化の成熟期において同様の局在が認められ、LAMP1とエナメルリンで分泌期・成熟期前期で同様の局在が認められた。



S：分泌期
EM：成熟期前期
LM：成熟期後期
*：エナメル芽細胞

(4) エナメルリンでコートした培養ディッシュ上に歯原性上皮細胞とAnxa2過剰発現細胞を撒き、Anxa2で免疫沈降し、LAMP1、LAMP2タンパク発現を調べた結果、LAMP1、LAMP2、両方のタンパクの発現が認められた。LAMP1はAnxa2を過剰発現細胞ではAnxa2と結合しているLAMP1の発現が減少し、LAMP2は歯原性上皮細胞とAnxa2過剰発現細胞の両方でエナメルリン上で培養した細胞のほうがAnxa2と結合しているLAMP2の発現が減少した。これらのことから、Anxa2とエナメルリンはそれぞれ、LAMP1、LAMP2とAnxa2との結合に抑制的に働いていることが予測された。

これらの結果を基に、Anxa2とLAMP1、LAMP2、エナメルリンなどがエナメル質の構築に実際にどのように作用するかを検討し、将来的には実質欠損を伴うエナメル質齲蝕におけるエナメル質の再構築（再生）法の開発へと繋げたい。

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)

①Yamamoto S, Fukumoto E, Yoshizaki K, Iwamoto T, Yamada A, Tanaka K, Suzuki H, Aizawa S, Arakaki M, Yuasa K, Oka K, Chai Y, Nonaka K, Fukumoto S. PDGF regulates salivary gland morphogenesis via FGF expression. *J Biol Chem.* ; 283(34):23139-49 2008, 査読有

②Yoshizaki K, Yamamoto S, Yamada A, Yuasa K, Iwamoto T, Fukumoto E, Harada H, Saito M, Nakasima A, Nonaka K, Yamada Y, Fukumoto S. Neurotrophic Factor Neurotrophin-4 Regulates Ameloblastin Expression via Full-length TrkB. *J Biol Chem.* ; 283(6): 3385-91 2008, 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福本 恵美子(FUKUMOTO EMIKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教

研究者番号 : 10264251

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者