

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791479

研究課題名（和文） 歯周組織を構成するマトリックスタンパクの解析

研究課題名（英文） Analysis of periodontal matrix proteins

研究代表者

岩田 隆紀（IWATA TAKANORI）

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：60431946

研究成果の概要（和文）：

歯周組織は歯根膜・セメント質・歯槽骨からなる付着器官であり、歯根膜組織には幹細胞様の性質をもつ細胞が存在することが知られている。そこで本研究では、歯根膜細胞を各種方法にて抽出し、最適な酵素を選定した。コラゲナーゼによって分散採取された歯根膜細胞は増殖能が高く、高いアルカリフォスファターゼ活性を有していることから、歯周組織のような硬組織を再生させるには適した細胞ソースであることが示唆された。また、大型動物モデル（ビーグル犬）の実験的歯周組織欠損モデルにおいて、上記の方法で採取された歯根膜細胞シートを欠損部に移植すると、非移植群と比べて有意に歯周組織の各要素（歯槽骨・セメント質・歯根膜組織）が再生されたことから、歯周組織の再生に適した細胞ソースとなりうることを示唆された。また、細胞にとって最適な細胞外環境を検討するために、近傍組織のマトリックスタンパクの検討を行い、歯根膜細胞に強く発現する遺伝子群を突き止め、免疫組織化学的に検証を行った。

研究成果の概要（英文）：

Periodontal tissue, consisting of periodontal ligament, cementum, and alveolar bone, contains cells with stem cell-like properties. In this study, we extracted and transplanted autologous periodontal ligament cells in a canine model, and the advantage of this cytotherapy was revealed. Furthermore, considering an appropriate environment for periodontal ligament cells, we analyzed the matrix proteins expressed by human periodontal ligament cells. Periodontal specific genes were proposed, and expression of some proteins was confirmed by immunohistochemical studies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学  
キーワード：再生歯学

## 1．研究開始当初の背景

歯周組織のような硬組織間に存在する軟組織靱帯かつ、その間隙を強固に支える複雑な接着装置は、生体において異色の組織であり、多種の細胞群の織り成す複雑な恒常性メカニズムは不明な点が多い。殊、歯根膜細胞は健全な状態においては石灰化を引き起こさず、急速なターンオーバーを繰り返すことにより、免疫学的な防御作用も示している。歯根膜細胞は骨芽細胞によく似た性質を持ち合わせているものの、*in vitro*においてその石灰化能は非常に低く、石灰化を負に制御している機構があることが転写因子レベルで明らかにされてきた。またわれわれの研究室では、歯周組織において細胞外レベルでの石灰化抑制能をもつ因子を同定してきた。

近年注目を集めている再生医学や組織工学において、対象の細胞（特に幹細胞）の増殖・分化を人為的に制御するために、細胞外マトリックスの機能解明は不可欠である。組織が形態学にかつ機能的に再生することが最終的な目標であるが、導入された幹細胞がそこに恒常的に定着し、機能を発揮するためには足場となる周囲のマトリックス環境が目的とする組織に類似していなければならず、マトリックスオーガナイゼーション（マトリックス組織）を正確に理解する必要がある。歯周組織の再生において細胞外マトリックスとしては、アテロコラーゲン、細胞シートによる細胞自身が分泌するマトリックスが良好な成績を収めてはいるものの、その作用機序については不明な点が多い。

## 2．研究の目的

そこで本研究での目的は、歯周組織に発現しているマトリックスタンパクを網羅的に検出し、遺伝子やプロテインレベルでその機能を解析することであった。

## 3．研究の方法

本学倫理委員会の承認得た上で、ヒト抜去歯より歯根膜細胞を各種酵素を用いて抽出した。合計41検体を用いて培養した歯根膜細胞の性質の規格化を行い、歯根膜細胞特異的な分子を遺伝子レベル・タンパクレベルにて調査した。

## 4．研究成果

(1)ヒト歯根膜細胞は適切な濃度のコラゲナーゼタイプIで分散することにより、性別・年齢に関係なく高い確率で増殖することが示唆された。

(2)コラゲナーゼにて分散採取されたヒト歯根膜細胞はトリプシンで分散採取されたヒト歯根膜細胞と比べて、アルカリフォスファターゼ活性が高く、硬組織を再生させる際に有用な細胞ソースとなりうることが示唆された。

(3)ヒト歯根膜細胞の遺伝子解析を行うと、ヒト歯肉線維芽細胞やヒト骨髄由来間葉系幹細胞と比べて有意に高発現している遺伝子が同定された。

(4)それらのタンパクレベルでの発現は免疫組織化学的に調査され、歯根膜に特異的であることが示唆された。

(5)規格化された歯根膜細胞を用いることで、小動物並びに大動物において、実験的歯周欠損モデルの再生を引き起こすことが確認さ

れた。特に、イヌの歯周組織欠損において歯根膜細胞シートを作成し、自己移植を行うとコントロール群と比べて有意に歯周組織の各要素（歯槽骨高さ・セメント質の再生・歯根膜組織の再生）が改善され、再生医療への応用が期待できると考えられる。

(6)歯周組織再生の場合であるとされる象牙質の主要なタンパクである象牙質シアロリン酸タンパクの遺伝子多型の存在が確認され、それに伴うフェノタイプは確認されなかったことから、象牙質シアロリン酸タンパクのC末端のリピード配列の部分的欠失は象牙質の機能とはあまり関係していないことが示唆された。

(7)神経伝達物質であるアセチルコリンとその受容体が骨芽細胞株で機能していることが観察された。

## 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5件)

Sato T, Abe T, Chida D, Nakamoto N, Hori N, Kokabu S, Sakata Y, Tomaru Y, Iwata T (他3名、9番目), Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts., FEBS Lett., 584 巻, 817-24, 2010, 査読有

Ishikawa I, Iwata T (他5名、2番目), Cell sheet engineering and other novel cell-based approaches to periodontal regeneration., Periodontol 2000, 51 巻, 220-238, 2009, 査読有

Iwata T, (他7名、1番目), Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model.,

Biomaterials., 30 巻, 2716-23., 2009, 査読有

岩田隆紀(他2名、1番目), 細胞シート技術を用いた歯周組織再生, バイオマテリアル 生体材料, 26 巻, 194-198., 2008, 査読無

Yamakoshi Y, Lu Y, Hu JC, Kim JW, Iwata T, (他6名、5番目), Porcine dentin sialophosphoprotein: length polymorphisms, glycosylation, phosphorylation, and stability., J Biol Chem., 283 巻, 14835-44., 2008, 査読有

〔学会発表〕(計4件)

岩田隆紀 他、細胞シートによる歯周組織の再生-ヒト臨床応用に向けた取組み-, 第9回日本再生医療学会、2010.3.18、広島

Iwata T 他、Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament cell sheets, IADR 87<sup>th</sup> General Session and Exhibition、2009.4.3、マイアミ(米国)

岩田隆紀 他、細胞シート工学を用いた歯周組織の再生、第8回日本再生医療学会総会、2009.3.5、東京

岩田隆紀 他、細胞シート工学を用いた歯周組織の再生、第29回日本炎症・再生医学会、2008.7.9、東京

〔その他〕

ホームページ

<http://www.twmu.ac.jp/ABMES/CSTEC/ja/sperio>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

岩田 隆紀 (IWATA TAKANORI)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：60431946

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし