

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18782

研究課題名（和文）アメロラスチンによる破歯細胞活性の抑制メカニズムの解明と歯根吸収への治療応用

研究課題名（英文）Elucidation of the suppression mechanism of odontoclast activity by ameloblastin and therapeutic application for root resorption

研究代表者

大西 梓（Onishi, Azusa）

広島大学・病院（歯）・歯科診療医

研究者番号：90846883

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：申請者らが行った歯根形成期のエナメルタンパクの役割に関する過去の研究で、歯根吸収窩にエナメル芽細胞由来の上皮細胞が局在していることに着目し、本研究ではエナメルタンパクが歯根吸収に抑制的に作用するという仮説のもと検討を行った。骨髄由来細胞と骨細胞の共培養系にリコンビナントアメロゲンタンパクを添加したところ、骨細胞からのRANKLおよびM-CSFの発現を低下させることによって、骨髄由来細胞の破骨細胞分化を抑制させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

矯正歯科治療中に生じる歯根吸収は、長期間にわたる歯の移動や過度な機械的負荷が一因と考えられているが、その発症機序は未だ不明である。重篤化し吸収が象牙質に及ぶと自然修復は不可能で、歯は動揺し、正常な機能を維持することが困難となる。治療法としては、歯に加わる矯正力を弱めたり、治療を中断したりするといった対症療法しか存在せず、吸収を引き起こさない予防法や、吸収した歯質を再生させる治療法も存在しない。本研究によりエナメルタンパクが歯根吸収に抑制的に作用する可能性が示唆されたことから、矯正歯科治療に伴う歯根吸収の予防および治療法の確立の一助となる。

研究成果の概要（英文）：In our past research about the role of enamel proteins during tooth root formation, we focused on the localization of epithelial cells derived from ameloblast in the tooth root resorption area. In this study, we investigated the role of enamel proteins in the root resorption area based on the hypothesis that enamel proteins have an inhibitory effect on tooth root resorption.

When recombinant amelogenin protein was added to the coculture system of bone marrow derived cells and bone cells, it was revealed that osteoclastic differentiation of bone marrow derived cells is suppressed by reducing the expression of RANKL and M-CSF from bone cells.

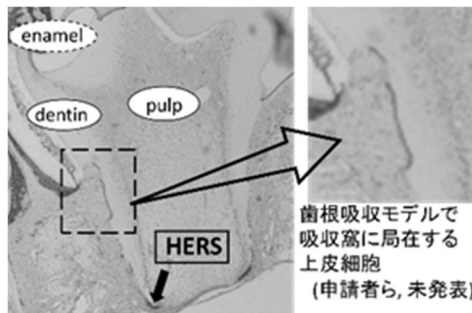
研究分野：矯正歯科

キーワード：歯根吸収 エナメルタンパク アメロラスチン アメロゲン

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療では、骨芽細胞と破骨細胞を中心とする細胞間相互作用による骨改造現象によって歯の移動を生じる。治療期間中は歯およびそれを取り巻く歯根膜や歯槽骨といった歯周組織に軽度の炎症が持続的に生じており、その炎症がしばしば重篤な悪影響を及ぼすが、その一つが歯根吸収である。矯正歯科治療中に生じる歯根吸収は、長期間にわたる歯の移動や、過度な機械的負荷が一因と考えられているが、その発症機序は未だ不明である。吸収窩が象牙質に及ぶと自然修復は不可能で、重篤化した場合、歯は動揺し正常な機能を維持することが困難となる。治療法としては、歯に加わる矯正力を弱めたり、治療を中断したりするといった対症療法しか存在せず、吸収を引き起こさない予防法や、吸収した歯質を再生させる治療法も存在しない。

歯冠硬組織形成の主体となるエナメル芽細胞の大半は歯の萌出とともに消失するが、近年、歯の萌出後に歯根周囲にわずかに残存したエナメル上皮細胞（ヘルトビッチの上皮鞘: HERS）から分泌されるエナメル蛋白が、歯の発生過程で歯根形成に関与していることが明らかとなった。さらに我々はこれまでに、ラット歯根吸収モデルで歯根吸収窩表面に沿ってマラッセの上皮遺残細胞（Epithelial cell rests of Malassez）が局在している像を確認した。このことから、歯根表面に残存した上皮細胞が何らかの作用により吸収窩へ移動し、歯根吸収へ影響を及ぼしている可能性が推測された。



歯根吸収モデルで吸収窩に局在する上皮細胞 (申請者ら, 未発表)

そこで我々は、歯根周囲の HERS およびマラッセの上皮遺残細胞、またそれらの細胞から共通して分泌されるエナメル蛋白のアメロプラスチン（Ambn）に着目し、上皮細胞は歯根吸収を引き起こす破骨（歯）細胞に導かれて吸収窩へ移動するのではないか、吸収窩表層へ誘導された上皮細胞は、自身が分泌する Ambn により吸収窩の歯質再生あるいは歯根吸収抑制機構を惹起するのではないか、という二つの仮説を立てた。

歯根吸収が発生する原因やメカニズムについては不明な点が多いが、一般的には歯の移動によって歯および歯周組織に過度な機械的負荷がかかった場合などに、歯根膜（間葉組織）の毛細血管に存在するマクロファージが分化して破骨（歯）細胞として歯根表面に出現し、歯根吸収を惹起する。しかしながら破骨（歯）細胞と、吸収窩に局在する上皮細胞との関係性については全く不明で、上皮細胞が分泌する Ambn の吸収窩での機能も明らかにされていない。我々は前述の二つの仮説を立証するため、まず歯根吸収窩へ上皮細胞が誘導される機序を検証し、さらに上皮細胞より分泌される Ambn が吸収窩の破骨（歯）細胞の分化および増殖活性、象牙質吸収能に及ぼす影響を検討することによって、吸収窩での Ambn の機能を明らかにすることとした。また、ラット歯根吸収モデルを使用した動物実験において吸収窩へ Ambn を局所投与し、Ambn の効果とりわけ吸収抑制作用あるいは吸収窩の修復作用について解析することとした。

2. 研究の目的

本研究は、歯根形成期に HERS から分泌されるエナメル蛋白の一種である Ambn の機能に着目し、破骨（歯）細胞との相互作用を明らかにすることを通じて、矯正歯科治療に伴う歯根吸収に対する修復あるいは進行抑制効果を検証することを目的とし、歯根吸収の予防療法の確立を目指す。我々の研究によって Ambn と破骨（歯）細胞との関係性を明らかにすることは、不明な点が多くある歯根吸収のメカニズムの解明や、吸収窩の修復を目的とした治療法の確立の一助となる。

3. 研究の方法

本研究ではこれまでの研究結果を進展させ、歯根吸収過程での破骨（歯）細胞と HERS、さらには HERS より分泌される Ambn の関わりを明らかにする。

In vitro の実験系において、破骨（歯）細胞と Ambn の関係について検討する。具体的には骨細胞および骨髄由来細胞の共培養による破骨（歯）細胞分化の培養系にリコンビナント Ambn を添加し、破骨（歯）細胞の分化能、増殖活性や象牙質吸収能に関する評価を行う。また、in vivo の実験系において、ラット歯根吸収モデルへのリコンビナント Ambn 投与が歯根吸収の進行抑制あるいは吸収窩の修復に与える影響について組織学的検討を行う。

実験に使用するリコンビナントタンパクは、ラット下顎切歯根尖の cervical loop に局在するエナメル芽細胞から採取した Ambn cDNA をベクターに組み込み、大腸菌を用いて発現させる。

4. 研究成果

<リコンビナント Ambn タンパクの精製>

ラット下顎切歯根尖の cervical loop より採取した細胞にディスペラーゼおよびコラゲナーゼによる処理を行い、上皮由来細胞のみを選択的に培養した。培養細胞から RNA およびタンパクを抽

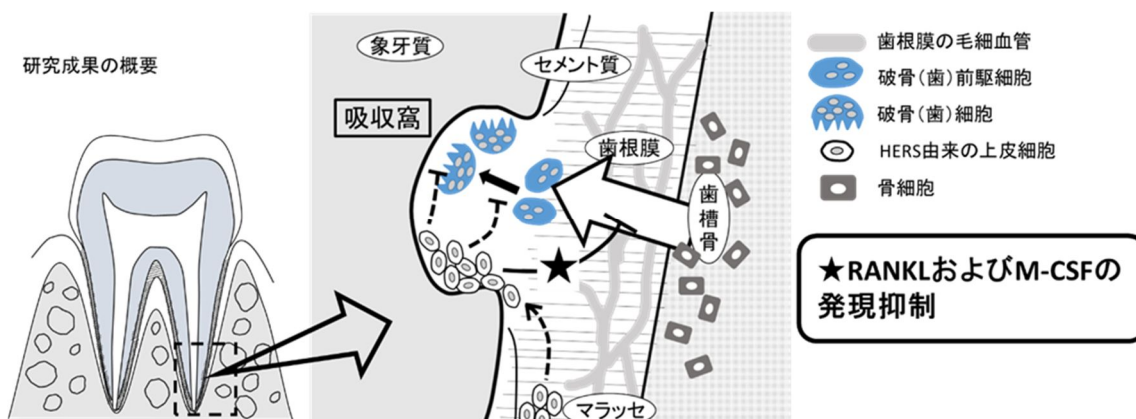
出し、Ambn およびアメロゲニン (Amg) の遺伝子およびタンパクの発現を確認し、エナメル芽細胞由来の細胞であることを確認した。

培養したエナメル芽細胞由来の上皮細胞から得た cDNA を用いて大腸菌を使用したタンパク発現系にてリコンビナント Ambn の精製を試みたが、難航したため、所属する研究室にて使用実績があり、精製可能なリコンビナント Amg を代用して検討を行った。

< in vitro 実験系 >

骨細胞と骨髄由来細胞の共培養により破骨細胞分化を誘導可能な培養系において、培養液にリコンビナント Amg を添加し、破骨細胞分化への影響について検討した。その結果、リコンビナント Amg を添加した場合、骨細胞より分泌される RANKL および M-CSF の発現が減少することにより、骨髄由来細胞の破骨細胞分化を抑制することが明らかになった。

In vitro 実験系における破骨細胞の増殖活性および吸収能および In vivo 実験系については現在引き続き検証を遂行中である。



本研究において、HERS 由来の上皮細胞より分泌されるエナメルタンパク (Amg) は、歯周組織内で破骨 (歯) 細胞分化を抑制する可能性が示唆された。しかしながら、マラッセの上皮遺残にのみ存在する HERS 由来の上皮細胞が吸収窩へ遊走するメカニズムは明らかになっていない。また、歯根吸収の予防・治療法の確立のためには、歯根吸収モデルを使用した in vivo 実験系において吸収窩へエナメルタンパクを局所投与し、歯根吸収の進行抑制効果、さらには修復効果について検証を続ける必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------