

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659437

研究課題名（和文） 細胞外カルシウムおよびリン酸感知機構を軸とした象牙質再生法の基盤構築

研究課題名（英文） Study of Dentin regeneration based on extracellular calcium and phosphate.

研究代表者

根本 英二（NEMOTO EIJI）

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：40292221

研究成果の概要（和文）：

う蝕で失った歯質（象牙質）を再生することは歯科医療の大きな目標の一つである。Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)は象牙質を作る細胞（象牙芽細胞）の分化を調節する協力的な成長因子である。ヒト歯髄細胞を 10 mM 細胞外カルシウムあるいは 3mM 細胞外リン酸で刺激すると BMP-2 遺伝子の発現が増強されることを遺伝子および蛋白レベルで明らかにした。さらに、その分子機構には Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)ファミリー分子である Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK)-1/2 という分子は関わっていることを見出し、今後、歯科医療において BMP-2 の発現を人為的に増強することに基づいた治療法につながる可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

It is one of the big aims of dentistry to reproduce a tooth substance (dentin) which is lost in caries. Growth factor BMP-2 regulates odontoblastic differentiation to make dentin. I clarified that the expression of BMP-2 gene was enhanced in human pulp cells upon stimulation with not only 10 mM calcium ion but also 3 mM inorganic phosphate via ERK/MAPK signaling pathway. This finding suggested possibility to be connected for a cure to enhance expression of BMP-2 in dentistry in future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	0	1,000,000
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	300,000	3,300,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：象牙質、細胞外カルシウム、細胞外リン酸、ヒト歯髄細胞、ヒト歯根膜細胞

## 1. 研究開始当初の背景

現在、露出歯髄に対して修復象牙質の形成を促す歯髄直接覆髄方法として、水酸化カルシウムが臨床で広く用いられている。本薬剤は高アルカリ pH による象牙芽細胞壊死の誘導と、それに引き続く壊死層直下へ

の未分化歯髄細胞の遊走により修復象牙質の形成がされるが、その薬理作用の機序は明らかではない。また、本術式の5年後成功率は報告者により幅が大きく安定した治療法とは言えない。近年、象牙芽細胞の分化機序の解析が進む中、Bone

Morphogenetic Protein (BMP)2 が重要な役割を演じていることが明らかにされている。また、動物実験における露出歯髄への局所投与は、象牙質の形成を強く誘導するなど、その臨床応用に期待が高まっている。しかしながら、半減期の短さや多量の蛋白投与の必要性などから、近年、生体歯髄への BMP2 の遺伝子導入を目指した研究が国内外で進んでいるものの未だ臨床研究にとどまる。

## 2. 研究の目的

露出した歯髄に対して高い予知性をもつ象牙質再生法の確立は歯内療法最大の目標の一つである。申請者らは、「細胞外カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) および細胞外リン酸 (Pi) は象牙芽細胞の分化を誘導し、象牙質形成を促進する」という仮説を立てた。本仮説は、歯髄細胞を細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  および Pi で刺激することにより BMP-2 の発現が誘導されるというこれまでに報告のない斬新な予備データに基づいている。本研究は BMP-2 の発現誘導の機序を分子生物学的に証明することにより、 $(\text{Ca}^{2+}) - (\text{Pi}) - (\text{BMP2})$  反応系を軸とした象牙質再生促進材開発の基盤を構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

ヒト歯髄細胞を 10%FBS  $\alpha$ -MEM 培地にて継代培養を行い、コンフルエントになった細胞を実験に供した。 $\text{Ca}^{2+}$  刺激は  $\text{CaCl}_2$  を添加することで細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 (1.8mM-20mM) を調節し、リン酸は  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH7.4) を添加することで刺激を行なった。BMP2 mRNA 発現は SYBR グリーンを用いたリアルタイム RT-PCR 法 (Bio Rad) にて解析を行い、培養上清中の BMP-2 産生量は ELISA 法を用いて検出した。ヒト BMP2 プロモーター活性は、3 kb ヒト BMP2 プロモーターのクローニングを行い、ルシフェラーゼレポータープラスミド (pGL3、ペロメガ社) を用いて作成し、ルシフェラーゼ活性を測定した。MAP キナーゼ系シグナル分子のリン酸化は、Phospho-p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr204) および p44/42 MAP kinase 抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した。

## 4. 研究成果

BMP-2 は強力な骨形成促進作用を有し、象牙芽細胞の分化を調節する成長因子である。ヒト歯髄細胞を 10mM 細胞外カルシウムで刺激すると MAPK ファミリー分子である ERK およびカルシウムイオンチャネル依存的に BMP-2 mRNA 発現の増強されることを明らかにした。さらに、ヒト歯髄細胞を 3mM 細胞外リン酸で刺激すると ERK 依存的に BMP-2 mRNA 発現および BMP-2 のプロモーター活性が増強されることを明らかにした。そのシグナル伝達

機構について検討したところ、ERK の活性化はリン酸刺激後数分後と数時間後をピークとする二相性を示すことが明らかとなった。さらにこの BMP-2 発現増強には ERK シグナル経路とは非依存的にプロテインキナーゼ A の活性化が関与していることが明らかとなった。また、培養上清を用いた ELISA 法によりタンパクレベルでの発現増強が明らかとなりオートクリン的に作用している可能性が示唆された。細胞外リン酸に対する細胞膜トランスポーターの発現に関して検討したところ、Na イオン依存性リン酸トランスポータータイプ I (NaPi-I)、NaPi-IIa、NaPi-IIb の発現は見られず、NaPi-III のみ発現していることが明らかとなった。さらに、同様の反応はヒト歯根膜由来細胞においても見られたが、マウス多分化能未分化間葉系細胞 C3H10T1/2 では見られなかったことから、組織あるいは細胞の分化度に依存している可能性も示唆された。

## 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 7 件)

1. Wnt5a signaling is a substantial constituent in bone morphogenetic protein-2-mediated osteoblastogenesis. Nemoto, E., Y. Ebe, S. Kanaya, M. Tsuchiya, T. Nakamura, M. Tamura, and H. Shimauchi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (in press) 2012 (査読あり)
2. Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells. Tada, H., E. Nemoto, B. L. Foster, M. J. Somerman, and H. Shimauchi. *Bone*. 48 (6), 1409-1416, 2011 (査読あり)
3. Elevated extracellular calcium increases fibroblast growth factor-2 gene and protein expression levels via a cAMP/PKA dependent pathway in cementoblasts. Kanaya, S., E. Nemoto, Y. Ebe, M. J. Somerman, and H.

- Shimauchi. Bone. 47 (3), 564-572, 2010 (査読あり)
4. Role of the Wnt signaling pathway in bone and tooth. Tamura, M., E. Nemoto, M. M. Sato, A. Nakashima, and H. Shimauchi. Front. Biosci. E2: 1405-1413, 2010 (査読あり)
  5. Elevated extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells. Tada, H., E. Nemoto, S. Kanaya, N. Hamaji, H. Sato, and H. Shimauchi. Biochem. Biophys. Res. Commun. 394 (4), 1093-1097, 2010 (査読あり)
  6. Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. Nemoto, E., Y. Koshikawa, S. Kanaya, M. Tsuchiya, M. Tamura, M. J. Somerman, and H. Shimauchi. Bone. 44 (5), 805-812, 2009 (査読あり)
  7. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae induce unique dendritic cell subsets via Toll-like receptor 2. Kanaya, S., E. Nemoto, T. Ogawa, and H. Shimauchi. J. Periodontal Res. 44 (4), 543-549, 2009 (査読あり)
- [学会発表] (計 12 件)
1. 根本英二、細胞外 Ca<sup>2+</sup> と歯根膜組織～細胞の分化制御因子としての役割～ (招待講演)、第 60 回東北大学歯学会、2011 年 12 月 9 日、仙台
  2. 根本英二、非外科的療法を行った広汎型侵襲性歯周炎患者の 12 年経過症例、第 54 回秋季日本歯周病学会、2011 年 9 月 30 日、下関
  3. E. Nemoto, H. Tada, and H. Shimauchi, Extracellular phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression in human dental pulp cells and human periodontal ligament cells. 4th International Symposium for interface Oral Health Science March 7-8, 2011, Sendai
  4. M. Tsuchiya, T. Kiyama, S. Tsuchiya, H. Takano, E. Nemoto, K. Sasaki, S. Sugawara, Y. Endo and M. Watanabe, Roles of IL-6 in mastication in mice and effects of training and food hardness. 4th International Symposium for interface Oral Health Science, March 7-8, 2011, Sendai
  5. 江部由佳梨、根本英二、金谷聡介、土谷昌広、多田浩之、島内英俊、Non-Canonical Wnt シグナルによる骨芽細胞の分化抑制作用について、第 57 回東北大学歯学、2010 年 6 月 18 日、仙台
  6. 多田浩之、根本英二、島内英俊、細胞外リン酸は Pit1 および ERK1/2 を介してヒト歯髄細胞から bone morphogenetic protein-2 を誘導する、第 132 回日本歯科保存学会、2010 年 6 月 4, 5 日、熊本
  7. 金谷聡介、根本英二、後藤和宏、島内英俊、セメント芽細胞におけるプロテインキナーゼ C 依存性 Fibroblast growth factor 2 発現増強作用、第 132 回日本歯科保存学会、2010 年 6 月 4, 5 日、熊本
  8. 後藤和宏、根本英二、金谷聡介、多田浩之、島内英俊、細胞外 NAD<sup>+</sup> によるマトリックスメタロプロテアーゼの発現抑制作用、第 132 回日本歯科保存学会、2010 年 6 月 4, 5 日、熊本
  9. 根本英二、「歯周組織への感染とそれに対する免疫応答の特異性とは？」歯

周組織構成細胞による炎症反応制御システム—細胞膜表面酵素を中心に一 (シンポジウム講演)、第 53 回春季日本歯周病学会、2010 年 5 月 14, 15 日, 盛岡

10. 金谷聡介、根本英二、江部 由佳梨、島内英俊、セメント芽細胞において細胞外カルシウム刺激は cAMP/PKA 依存性に Fibroblast growth factor 2 の発現を誘導する、第 53 回春季日本歯周病学会、2010 年 5 月 14, 15 日, 盛岡
11. 江部 由佳梨、根本英二、金谷 聡介、多田浩之、島内英俊、Non-Canonical WNT シグナルが骨芽細胞の分化に与える影響について、第 53 回春季日本歯周病学会、2010 年 5 月 14, 15 日, 盛岡
12. 多田浩之、根本英二、金谷聡介、島内英俊、細胞外リン酸によるヒト歯髓細胞からの bone morphogenetic protein-2 発現誘導、第 131 回日本歯科保存学会、2009 年 10 月 29, 30 日、仙台

[図書] (計 2 件)

1. E. Nemoto, H. Tada, H. Shimauchi: Extracellular phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression in human dental pulp cells and human periodontal ligament cells. Interface Oral Health Science 2011 (K. Sasaki, O. Suzuki and N. Takahashi eds.), Springer, Tokyo, 2012, 143-144.
2. M. Tsuchiya, T. Kiyama, S. Tsuchiya, H. Takano, E. Nemoto, K. Sasaki, S. Sugawara, Y. Endo, M. Watanabe: Role of IL-6 in mastication in mice and effects of training and food hardness. Interface Oral Health Science 2011 (K. Sasaki, O. Suzuki

and N. Takahashi eds.), Springer, Tokyo, 2012, 104-106.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

根本 英二 (NEMOTO EIJI)  
東北大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号 : 40292221

### (2) 研究分担者

島内 英俊 (SHIMAUCHI HIDETOSHI)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号 : 70187425

金谷 聡介 (KANAYA SOUSUKE)  
東北大学・病院・医員  
研究者番号 : 80375097

多田 浩之 (TADA HIROYUKI)  
東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師  
研究者番号 : 70431632

### (3) 連携研究者

なし