

令和 7 年 6 月 24 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K10279

研究課題名（和文）amelogeninによるエナメル質自己修復システムの構築

研究課題名（英文）Construction of enamel self-healing system by amelogenin

研究代表者

倉重 圭史（Kurashige, Yoshihito）

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：30453278

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）：エナメル質形成不全の種類には、遺伝的傾向により全顎的に発症するものと、特定の歯に限局したものがある。限局的なエナメル質形成不全は、乳歯の齲蝕、外傷のほか、永久歯の切歯と第一大臼歯で特徴的にみられるMolar Incisor Hypomineralization (MIH)がある。本結果から、エナメルマトリックスポロタンであるアメロジェニンがエナメル質形成に重要であるものの、その他アメロラスチン、KLK-4、MMP-20も協調して石灰化誘導することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、歯胚においてアメロジェニンがエナメル質形成に重要であるものの、その他アメロラスチン、KLK-4、MMP-20も協調して石灰化誘導することが明らかになった。本結果では、歯胚培養14日でハイドロキシアパタイトの形成を認めた。このことから、短期間でエナメル小柱類似石灰化物を既存エナメル質に誘導させることが可能となり、再生歯科分野において、歯胚形成のバイオミネラリゼーションの基盤研究が可能となった。

研究成果の概要（英文）：There are two types of enamel dysplasia: those that occur in all jaws due to genetic predisposition and those that are localized to specific teeth. Localized enamel dysplasia includes caries and trauma in primary teeth as well as Molar Incisor Hypomineralization (MIH), which is characteristic of permanent incisors and first molars. The results of this study revealed that although the enamel matrix protein amelogenin is important for enamel formation, ameloblastin, KLK-4, and MMP-20 also cooperate to induce calcification.

研究分野：小児歯科

キーワード：アメロジェニン 器官培養 エナメル質

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エナメル質は、基質形成期には有機質が 20~30%を占めているが、石灰化の急激な上昇をおこす石灰化期には 1%以下まで減少し形成される。エナメル質に含まれる有機質の大部分は細胞から分泌されるエナメルマトリックスプロテインであり、Amelogenin (Amelx) とエナメルリンに大別される。Amelx は、主にエナメル芽細胞に由来して分泌される細胞外マトリックスの 1 種であり、エナメル質形成期のエナメル基質中の 90%以上を占める主要なエナメルマトリックスプロテインである。大量に分泌された Amelx はナノスフィアとよばれる分子集合体となり、エナメル芽細胞の足場として機能すると同時に、エナメル質の石灰化に伴いセリンプロテアーゼやエナメルライシンにより分解され、これらのアメロジェニンナノスフィアのフラグメントがハイドロキシアパタイトの結晶成長を促すことが知られている。しかし、エナメル質の形成過程において、胎児および小児期での熱発や外傷などの障害が生じ、エナメル芽細胞が影響を受けることで、エナメル質形成不全が生じることがある。

ブタ由来 Amelx を主成分とするエムドゲインは、歯周組織再生療法で使用されており、失われた歯槽骨や歯根膜の再生に使用されている。このように Amelx には、エナメル質の誘導以外にもマルチな働きがあるものの、詳細は不明である。本研究では、すでに臨床で使用されている Amelx のエナメル質誘導能に着目し、早期に臨床応用を可能とさせる研究となる。さらに、細胞培養上清には、様々なグロースファクターが存在し医療応用されている。本研究においてもアメロジェニン含有細胞培養上清を使用し、短期間でのハイドロキシアパタイトの誘導が可能と考える。

2. 研究の目的

Amelx は、エナメル基質中の 90%以上を占める主要なエナメル蛋白であり、エナメル質形成に深く関与している。エナメル質の形態はアメロジェニンにより作られ、その空間に過飽和のカルシウムおよびリン酸イオンが集積することにより、結晶成長が生じると考えられているものの、詳細は不明である。

本研究は、マウス歯胚において、Amelx を作用させることにより、短期間でエナメル小柱類似石灰化物を既存エナメル質に誘導させ、歯質の強化および結晶構造からも色調改善を図ることを目的とするバイオミネラル化の基盤研究を目的とした。

3. 研究の方法

マウス歯胚におけるアメロジェニンの発現

研究対象に、生後 3 日目 (PN3) のマウスの下顎第一大臼歯歯胚を使用した。マウスの下顎第一大臼歯歯胚に対して、HE 染色および抗アメロジェニン抗体を使用した免疫組織染色を行った。

コンディショナルメディアム (CM) による器官培養

CM は、マラッセ上皮遺残細胞から単離したアメロジェニン高発現 ERM-2 クローン細胞とブタ歯肉上皮細胞 (GE) を KGM 中で培養したものをを使用した。

si-エナメルマトリックスタンパク質導入細胞における CM での培養

ERM-2 クローン細胞に si-Amelx、si-Ameloblastin (Ambn)、si-Kallikrein 4 (KLK4)、si-Matrix metalloproteinase 20 (MMP-20) 配列を含む si-RNA で個別にトランスフェクションを行った CM を使用した。上記 CM において PN のマウスの下顎第一大臼歯歯胚を、1、3、7、14 日間培養し SEM にて観察を行った。

4. 研究成果

PN3 のマウス歯胚切片 HE 染色では、PN3 の歯胚はエナメル質の薄い層を持つ蕾状期であった。免疫組織化学染色では、Amelx タンパク質はエナメル質を形成しているエナメル芽細胞に特異的に陽性であったが、エナメル質の薄い領域のエナメル芽細胞では Amelx タンパク質の発現は低く、エナメル質の厚いエナメル芽細胞では強発現を認めた。PN3 マウスから抽出した歯胚を SEM で観察した。PN3 歯胚は薄いエナメル冠形態を有し、高倍率で観察するとエナメル質表面は平滑に見えた (図 2)。

器官培養 1 日目、ERM-2-CM を添加した歯胚は、GE-CM と比較してエナメル質表面に針状構造の集合体からなる柱状構造の沈着を示した。一方、GE-CM のコントロールでは石灰化物の沈着は認められなかった。器官培養 3 日目に、ERM-2-CM で培養した歯胚は、細長く密に詰まった柱状構造の形成を示した。7 日目には、これらの柱状構造は太く高くなり、いくつかの柱状構造は融合して形成され成熟していた。

その後、ERM-2-CM で培養して 14 日目になると、柱状構造はより密になり、凝集してハイドロキシアパタイト (HAP) 様の六角形の柱状構造を形成した。一方、対照群では明確な柱状構造は観察されなかった。

器官培養した歯胚のエナメル質表面における Amelx、Ambn、KLK4、MMP-20 を含む EMP の役割を

調べるために、si-Amelx、si-Ambn、si-KLK4、si-MMP-20を導入したERM-2とsi-ネガティブコントロールのそれぞれのCMを用いて歯胚を1、3、7、14日間培養し、SEMにて観察した。1日目にsi-ネガティブコントロールのERM-CMで培養した歯胚は、柱状構造の沈着を認めた。si-ネガティブコントロールERM-2のCMで3日目と7日目に培養した歯胚は、柱状構造の伸長と緻密化を示した。Si-ネガティブコントロールERM-2-CMで培養して14日目には、柱状構造はより緻密で凝集したように見え、HAP様の六角形の柱状構造を形成した。一方、各si-Amelx、si-Ambn、si-KLK4、si-MMP-20、ERM-2-CMでは、明確な柱状構造は観察されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Giri Sarita, Takada Ayuko, Paudel Durga, Uehara Osamu, Kurashige Yoshihito, Kuramitsu Yasuhiro, Furukawa Masae, Matsushita Kenji, Arakawa Toshiya, Nagasawa Toshiyuki, Abiko Yoshihiro, Furuichi Yasushi	4. 巻 66
2. 論文標題 Oral infection with Porphyromonas gingivalis augmented gingival epithelial barrier molecules alteration with aging	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 126 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2024.01.012	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugaya Hiroyuki, Kurashige Yoshihito, Suzuki Kai, Sakakibara Sayaka, Fujita Yusuke, Islam Syed Taufiqul, Nezu Takashi, Ito Shuichi, Abiko Yoshihiro, Saitoh Masato	4. 巻 56
2. 論文標題 Correction: Regaining enamel color quality using enamel matrix derivative	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 303 ~ 303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-023-00369-6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minowa Erika, Hayashi Yoshinobu, Goh Kenji, Ishida Narumi, Kurashige Yoshihito, Nezu Akihiro, Saitoh Masato, Tanimura Akihiko	4. 巻 58
2. 論文標題 Enhancement of receptor mediated calcium responses by phenytoin through the suppression of calcium excretion in human gingival fibroblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 274 ~ 282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.13089	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugaya Hiroyuki, Kurashige Yoshihito, Suzuki Kai, Sakakibara Sayaka, Fujita Yusuke, Islam Syed Taufiqul, Nezu Takashi, Ito Shuichi, Abiko Yoshihiro, Saitoh Masato	4. 巻 1
2. 論文標題 Regaining enamel color quality using enamel matrix derivative	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-022-00346-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
研究分担者	吉田 光希 (Yoshida Koki) (30453260)	北海道医療大学・歯学部・講師 (30110)	
研究分担者	伊藤 修一 (Ito shuichi) (50382495)	北海道医療大学・歯学部・教授 (30110)	
研究分担者	中尾 友也 (Nakao Yuya) (90733048)	北海道医療大学・歯学部・講師 (30110)	

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