

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792286

研究課題名(和文) アメロラスチンによる歯根象牙質の形成促進機構の解明と歯根吸収治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism ameloblastin upregulates formation of tooth root, and a application to the treatment of root resorption

研究代表者

廣瀬 尚人(Hirose, Naoto)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：50611935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：アメロラスチンはエナメル芽細胞の増殖に関与していることが明らかとなった。その調節機構は細胞周期のp21Cip1およびp27Kip1を抑制することで細胞増殖を抑制していることが明らかとなった。またアメロラスチンは根尖部のHertwig's上皮鞘の増殖も制御していることが明らかとなった。エナメル芽細胞と象牙芽細胞の共培養に対するアメロラスチンの添加実験においてアメロラスチンの石灰化促進機能が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It was revealed that ameloblastin was related to proliferation of ameloblasts. Its regulatory mechanism was that the protein inhibited p21Cip1 and p27Kip1 which were both negative factors in cell cycle. Additionally, ameloblastin also regulated proliferation of Hertwig's Epithelial cells in apical tooth root. Furthermore, it was suggested that ameloblastin had the function of upregulating calcification in interaction between ameloblasts and odontoblasts.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、矯正・小児系歯学

キーワード：蛋白 再生医療

1. 研究開始当初の背景

近年、日本において子供の顎骨成長と歯の大きさとの不調和が顕著になり、これに伴い矯正歯科治療を必要とする患者は増加傾向にある。矯正歯科治療では歯根周囲は常に軽度の炎症が生じており、ときに重篤な悪影響を及ぼす。その一つが歯根吸収である。歯根吸収がセメント質に限局したものであれば二次セメント質によって修復されるが、高度に象牙質まで進行した歯根吸収では修復が生じにくく、歯の正常な機能を維持することが難しくなる。現在、矯正歯科治療中に歯根吸収が疑われた場合、さらなる進行を防ぐため、装置を一時撤去して治療を中断することが行われているが、歯根吸収した歯を直接的に回復させる方法は未だ確立されていない。

アメロラスチンはエナメル芽細胞より分泌されるエナメルタンパクの一つで、歯の硬組織形成に関与していることが明らかとなっている。しかし近年アメロラスチンはそのほかにも様々な生理活性が明らかになってきている。例えば象牙質形成を促進することやエナメル芽細胞の増殖に関与することなどである。歯根はエナメル芽細胞と象牙芽細胞の相互作用によって形成されるが、アメロラスチンは数あるエナメル蛋白の中で唯一歯根根尖にて発現が確認されており、両細胞に作用し、歯根形成をコントロールしているという仮説を立てた。

2. 研究の目的

これまでに申請者らはアメロラスチンを発現しているエナメル芽細胞に対して siRNA を用いてアメロラスチンを発現抑制を行うとともに、アメロラスチンを発現していないアメロブラ

スチンに遺伝子導入によりアメロラスチンを過剰発現させた結果、アメロラスチンはエナメル芽細胞の増殖を抑制し、またその他エナメル蛋白の発現を亢進することを明らかにしている。またアメロラスチンの遺伝子発現を抑制する siRNA のマウス歯根への投与により歯根の成長抑制が確認されている。そこでアメロラスチンはエナメル芽細胞の増殖分化に関与していると推測されるが、そのメカニズムは明らかにされていない。また歯根象牙質に対する影響に関してはこれまで報告がほとんど無い。これらを明らかにし、アメロラスチンの歯根形成における機能を解明し、最終的にはアメロラスチン投与による歯根吸収部位の修復治療を目指すことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞増殖活性および分化関連因子の発現に対するアメロラスチンの影響の検討

アメロラスチン非発現エナメル芽細胞 (ALC) および象牙芽前駆細胞をリコンビナントヒトアメロラスチン (rmAMBN) 存在下、非存在下で培養し、アメロラスチンが両細胞の増殖および分化に与える影響について検討する。増殖能の検討については ELISA BrdU アッセイ、細胞数の計測にて行う。分化能の検討については定量 PCR を各種エナメル蛋白 (アメロジェニン、エナメリン、タフテリン、エナメリシン) および骨関連マーカー (BSP、型コラーゲン、アルカリホスファターゼ、RUNX2、オステオポンチン、オステオカルシン、オステオネクチン) について行い、遺伝子解析を行う。またその他 ALP 活性の測定

などにより石灰化度の検討も行う。

(2)アメロラスチンの生理活性発現における CD63 の関与についての検討

実験には ALC と象牙芽細胞前駆細胞を用いる。両細胞について免疫組織学的に CD63 の発現分布を検討する。また CD63 ブロッキング抗体存在下で rmAMB N を添加した場合の両細胞の細胞増殖能の変化、基質代謝能の変化について実験 1 と同様の方法で解析する。

(3)アメロラスチンがエナメル芽細胞と象牙芽細胞前駆細胞の相互作用に与える影響の検討

歯根の形成にはエナメル芽細胞と象牙芽細胞の相互作用が必須である。よってこれらの相互作用に対して rmAMB N が与える影響について検討を行う。両細胞を三次元細胞培養ディッシュにて共培養し、実験 1 と同様の方法で遺伝子解析を行う。

(4)ラット歯根吸収モデルによる検討

我々が使用しているラット歯根吸収モデルを使用し、臼歯に生じた歯根吸収部位ヘインスリンニードルを用いて rmAMB N の投与を行う。その後歯槽骨および歯根の形成の変化、吸収窩の修復度について HE 染色および骨関連マーカーを用い、免疫組織学的に検討を行う。

4. 研究成果

まず初めに、本研究に入る前段階として、これまで得られた結果についてさらに詳しい検討を行った。アメロラスチン過剰発現細胞を用い、アメロラスチンが細胞周期の制御にどのように機能しているかを検討した。アメロラスチンの過剰発現細胞ではコントロールと比較して細胞周期の抑制因子である P21Cip1 および p 2

27Kip1 の遺伝子発現が更新していた。しかし CDK1、4、6 の発現に変化は認められなかった。

アメロラスチン siRNA をマウス歯根根尖へ投与した以前の検討により、マウス歯根は成長抑制が認められたが、実際にその原因を探るべく免疫染色により検討を継続した。根尖部ヘルトビッチの上皮鞘細胞はその二層構造に乱れが生じており、また細胞増殖能にも異常が認められていた。

これらのことをふまえた上で本研究の実験を行った。

(1) rmAMB N の精製に困難な点が存在し、また出来上がった蛋白の性質および精度の確認に時間がかかり予定されていた検討を終えることはできなかった。アメロラスチンは発現するとすぐに分解されて大小様々なフラグメントとなる。それによりアメロラスチンの効果が大きく変化することが知られている。今回作製された rmAMB N 投与により ALC におけるエナメル蛋白の遺伝子発現は一部亢進した。しかし細胞増殖における影響は不明であった。ALC は元来細胞増殖が早く、蛋白添加の影響を判断することが困難であったと考えられる。

象牙芽前駆細胞に対するアメロラスチンの影響については数回の実験を行ったが分化能に対する影響が認められなかった。しかしこれはこのときに使用した rmAMB N の精度に問題があったと考えており、今後 rmAMB N を再作製するか、もしくはシークエンスを行うなどして蛋白の精度を向上することで何らかの結果が出るものと考えている。

(2) エナメル芽細胞における CD63 の分布については当初定量 PCR と Western

Blot を用いて検討を行う予定であったが、研究計画の遅れにより行われていない。

- (3) エナメル芽細胞と象牙芽前駆細胞の共培養における rmAMBN の影響について。この両細胞の共培養は困難を極めた。両細胞ともに細胞増殖スピードがきわめて速い。しかし ALC の増殖スピードが象牙芽前駆細胞よりもかなり速いことから、その相互作用において検討している遺伝子マーカーの発現が安定しない。共培養時象牙芽前駆細胞の石灰化が顕微鏡像で認められた。rmAMBN 添加時に亢進する傾向が認められた。またアリザリンレッド染色においても同様の傾向が認められた。しかし明らかな有意差は認められなかった。

- (4) ラット歯根吸収モデルによる検討。実験はラット臼歯を矯正用のスクリーより牽引し歯根吸収を強制的に生じさせて行った。rmAMBN の歯根周囲への投与による歯根形成および歯根吸収窩の修復へ与える影響はこれまで認められていない。実験によって形成される歯根吸収の程度が安定せず、定量的な測定では有意差が認められなかった。

これに関しては rmAMBN の精度の問題であるのか、アメロプラスチンの歯根象牙質の修復力に限界があるのかはこれまでのところ不明である。

すべての実験において rmAMBN の精度が大きく関わっているのは言うまでもない。これまでアメロプラスチンの研究が世界的に進んでいない理由の一つにアメロプラスチンの分子多様性にある。この蛋白は前述のとおり生体内ではすぐに分解され小さいフラグメントになる。それによって様々な生理活性

を発揮していると考えられているが、それが実験の不安定さにつながっているとも考えられる。今後は種を超えて安定している部位から作製されたペプチドを用いるなど対応策を考えたいと思う。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) Naoto Hirose, Atsushi Shimazu, Mineo Watanabe, Kotaro Tanimoto, Souichi Koyota, Toshihiro Sugiyama, Takashi Uchida, Kazuo Tanne

Ameloblastin in Hertwig's Epithelial Root Sheath Regulates Tooth Root Formation and Development

PLOS ONE8(1):

e54449.doi:10.1371/journal.pone.0054449/2013/1-8 (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

(1) Naoto Hirose, Atsushi Shimazu, Mineo Watanabe, Kotaro Tanimoto, Yuki Yoshimi, Tetsuya Awada, Takashi Uchida, Kazuo Tanne

Ameloblastin regulates proliferation and differentiation of ameloblasts and maintains morphology of Hertwig's root sheath

The 45th Annual Scientific Congress of Korean Association of Orthodontists
Nov.3.2012, Seoul, Korea

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況（計0件）

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 尚人（Hirose Naoto）

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・

助教

研究者番号 50611935