

平成23年 5月 19日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21792124  
 研究課題名（和文） 新規アメロジェニン会合分子を標的とした歯周組織再生療法の発明  
 研究課題名（英文） The development of regenerative periodontal therapy targetting for the new amelogenin binding prpteins  
 研究代表者  
 福田 隆男（FUKUDA TAKAO）  
 九州大学・大学病院・医員  
 研究者番号：80507781

## 研究成果の概要（和文）：

歯周病患者の破壊された組織の再生にエナメル基質タンパク質(EMD)が用いられている。本研究ではEMDの主要成分であるアメロジェニンに注目し、その新規会合分子の解析により歯周組織再生機序の検討を行った。その結果、アメロジェニン新規会合分子としてYボックス結合タンパクおよび細胞骨格関連蛋白群を同定され、アメロジェニンがこれらの蛋白と会合することで歯周組織再生に関与する可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

Emdogain (enamel matrix derivative, EMD) is well recognized in periodontology, and it is used in periodontal surgery to stimulate regeneration of periodontal tissues. In this research, we investigated the proteins bound to amelogenin, to elucidate the molecules involved in the periodontal tissue regeneration. We identified new amelogenin binding proteins, YB-1 (human Y-box binding protein-1), and several cytoskeletal proteins. Our data suggest that these proteins are involved in regeneration of periodontal tissues by binding to amelogenin.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010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・歯周治療系歯学

キーワード：アメロジェニン・歯周組織・再生医学・歯学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病はプラーク（歯垢）中に存在する歯周病原性細菌の感染に起因した組織破壊を伴う慢性炎症性の疾患であり、歯を喪失する大きな原因となっている。近年では患者の

破壊された歯周組織を再生する再生治療が精力的に行われており成果を上げている。

(2) その中でも日本国内において最も頻度の高い再生療法は、発生学的に歯周組織を誘導するといわれている幼若豚の歯胚から抽出

されたエナメル基質タンパク質 (enamel matrix derivative: EMD) を利用したものである。

(3) 現在、EMD は Emdogain® Gel という名称で商品化されており、今のところ、増殖因子を初めとするタンパク質を利用した歯周組織再生用材料の中では唯一 Emdogain® Gel に厚生労働省の認可が下りている。

(4) しかし、長年 EMD の作用機序の解明を試みる研究が続けられてはいるが、シグナル伝達分子レベルでの統一的な見解は得られていない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、アメロジェニンとその会合分子の組換えタンパク質を原料とした、歯周組織再生のシグナルをより効果的に誘導する安全性の高い分子標的再生療法の開発を目的とする。

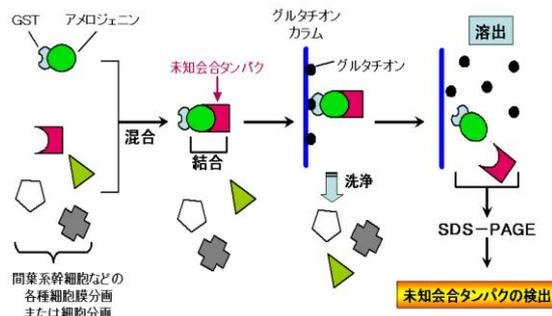
(2) そのために EMD の 90% 以上を占める主要成分であるアメロジェニンに注目してプロテオーム解析を行うことにより、新規アメロジェニン会合分子の同定を行い、その会合タンパク質による歯周組織再生機序の可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 新規アメロジェニン会合分子の検索

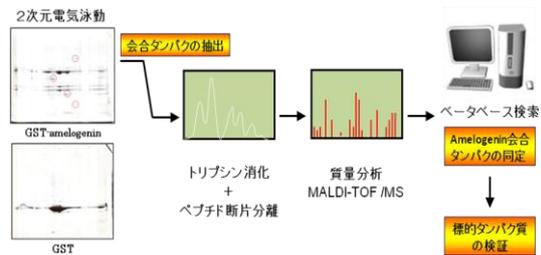
① 胎生マウス cDNA から GST 融合アメロジェニンを作成し、細胞抽出液と混合しアメロジェニンと会合したタンパク質の検出を行った。まず SDS-PAGE によるスクリーニングを行い、その結果をもとに 2 次元泳動からのプロテオーム解析を行った。

② アフィニティー樹脂による競合的溶出：GST Pull-Down assay にて GST 融合アメロジェニンと会合したタンパク質を二次元電気泳動で展開し、GST 融合アメロジェニンのみで展開した泳動と比較することで、アメロジェニン会合タンパク質のスポットを決定した。



③ そのスポットを切り出し、トリプシン消化し、MALDI-TOF (matrix assisted laser

desorption/ionization time of flight) によりアミノ酸配列を解読した。その情報をもとにデータベース検索を行い、タンパク質を同定した。



(2) 新規アメロジェニン会合分子 YB-1 (Y-box binding protein-1) の機能解析

① His-tag 融合 YB-1 を作成し、GST Pull-Down assay により GST 融合アメロジェニンとの結合を検証した。

② Glutathion Sepharose 4B に結合させた GST 融合アメロジェニンをカラムクロマトグラフィーで洗浄後、PreSission Protease により切断・溶出させて組み換えアメロジェニン蛋白の精製をおこなった。

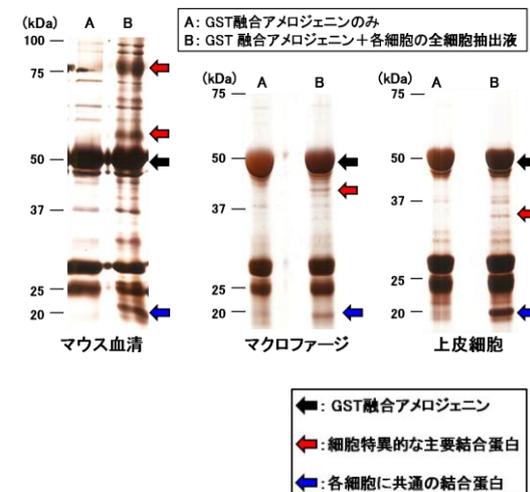
③ 骨芽細胞 (SaOS-2) を用いて YB-1 蛋白の siRNA による knock down を行い、② で精製したアメロジェニン刺激による細胞増殖能について MTT assay で検討した。

## 4. 研究成果

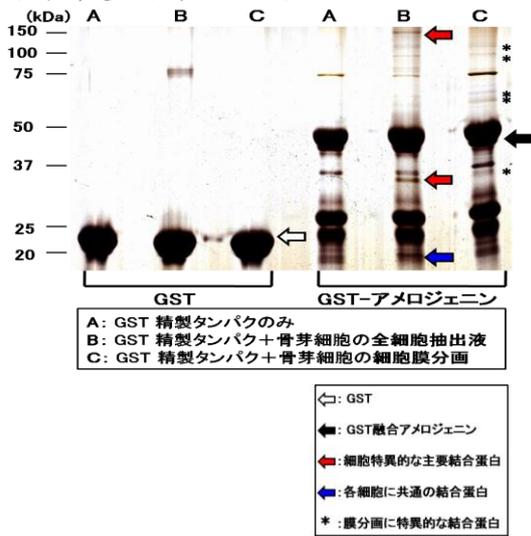
(1) GST 融合アメロジェニンを作成し、歯周組織を構成する各種細胞抽出液を用いた GST Pull down assay を行った。

① SDS-PAGE からの銀染色におけるスクリーニングの段階で、各細胞とも約 20kDa の位置にアメロジェニンとの結合タンパクとともに細胞特異的な分子量の結合タンパクのバンドを確認した (図 1)。

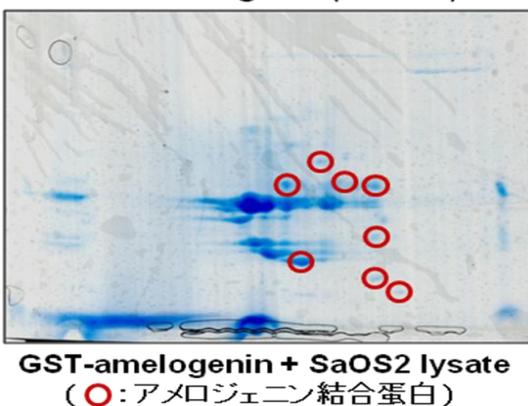
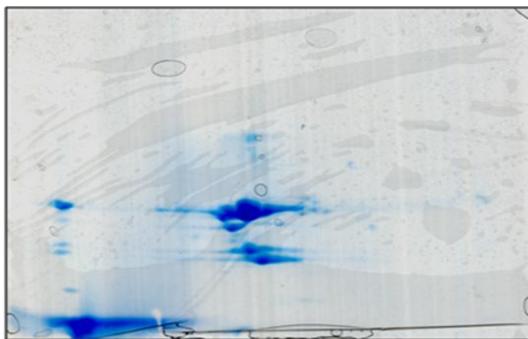
図 1：アメロジェニン会合蛋白のスクリーニング



さらに骨芽細胞 (Sa0s-2) における結合タンパクの分布について検討した結果、膜分画にも複数存在していることを確認した。  
 図2：アメロジェニン会合蛋白の細胞膜分画におけるスクリーニング



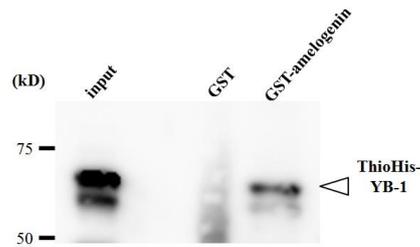
②次に申請者は骨芽細胞 (Sa0s-2) における GST 融合アメロジェニンへの新規結合蛋白を 2次元電気泳動で展開し、質量分析による結合蛋白の同定を行った (図3)。  
 図3：2次元泳動によるアメロジェニン会合分子の検出



その結果、アメロジェニン会合分子の候補として actin, myosin, tubulin, vimentin などの細胞骨格系の蛋白が複数同定された。このことから、アメロジェニンが細胞骨格に会

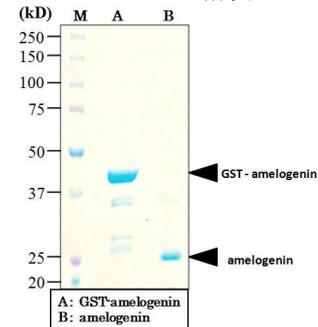
合することで歯周組織再生における骨形成に関与する可能性が示唆された。同時に、申請者は新規アメロジェニン結合蛋白としてヒト Y-Box 蛋白である YB-1 を同定した。

(2) 新規アメロジェニン会合分子 YB-1 (Y-box binding protein-1) の機能解析  
 ① His-tag 融合 YB-1 を作成して GST Pull-Down assay を行った結果、両者の *in vitro* における結合を確認した (図4)。  
 図4：*in vitro* におけるアメロジェニンと YB-1 の結合



②骨芽細胞 (Sa0S-2) を用いてアメロジェニンと YB-1 が細胞増殖に及ぼす影響について検討した。まず組み換えアメロジェニン蛋白の精製を行い (図5)、

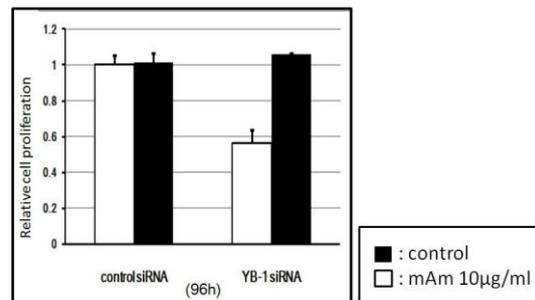
図5：アメロジェニンの精製



アメロジェニンが骨芽細胞の増殖に及ぼす影響について MTT assay で検討したところ、アメロジェニン刺激による細胞増殖能の変化はみられなかった。

次に YB-1 蛋白を siRNA により knock down したところ細胞増殖が有意に抑制されたが、アメロジェニン刺激により細胞増殖が回復することが確認された (図6)。

図5：アメロジェニンと YB-1 が骨芽細胞の細胞増殖に及ぼす影響



以上の研究結果より、YB-1 とアメロジェニンの結合が骨芽細胞の細胞増殖の制御に関

与していることが示唆された。

また、アメリロジェニン会合蛋白のプロテオーム解析から細胞骨格蛋白群とも結合しており、これらの会合が細胞動態にどう影響を与えてゆくかについて検討してゆくことは、将来的にアメリロジェニンとその会合蛋白の組換え蛋白を原料とした、歯周組織再生のシグナルをより効果的に誘導する安全性の高い次世代の分子標的再生療法の開発につながると考えられる。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

① 福田隆男

歯周組織細胞群における新規アメリロジェニン結合タンパク質の検索  
第 52 回春季日本歯周病学会  
2009. 5. 15. 岡山

② 福田 隆男

Analysis of the novel protein bound to amelogenin in periodontal tissue cells  
The 11th Joint-Scientific Meeting between KACD & JSCD  
2009. 11. 12. Jeju, Korea

③ 福田 隆男

Analysis of the molecular mechanisms of periodontal regeneration by EMD  
口腔再生国際シンポジウム  
2010. 2. 5. 福岡

④ 福田隆男

YB-1 is important for amelogenin induced periodontal Regeneration  
第 88 回 IADR (第 88 回国際歯科研究学会)  
2010. 7. 15.

Centre Convencions Internacional  
Barcelona, Spain

⑤ 福田隆男

Characterization of the amelogenin binding proteins  
第 96 回アメリカ歯周病学会 (AAP) 共催日本歯周病学会 (JSP) 2010 年大会  
2010. 11. 1.  
Hawaii Convention Center, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/perio/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 隆男 (FUKUDA TAKAO)  
九州大学・大学病院・医員  
研究者番号：80507781

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：