

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11969

研究課題名(和文)エナメル質再石灰化を誘導するアメロジェニン活性領域の同定

研究課題名(英文)Identification of Amelogenin active sites on enamel remineralization

研究代表者

齊藤 正人 (SAITOH, Masato)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：50337036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：市販のエムドゲインは、ブタ歯胚より抽出したエナメルマトリックス抽出物で、その90%以上は疎水性のアメロジェニンからなるものである。アメロジェニンは、歯の形成期においてエナメル上皮細胞に発現するが、歯の形成が完了するとエナメル上皮細胞は消失するため、ヒトからアメロジェニンを採取することは困難であり、これまでにヒトアメロジェニンを使用した石灰化に関する報告はほとんどみられない。本研究は、ヒトアメロジェニンの機能を検証するために、全長リコンビナント・ヒトアメロジェニンを遺伝子導入により発現および精製し、ヒトアメロジェニンの詳細を明らかにすることを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アメロジェニンは、エナメル質の石灰化に非常に重要なタンパク質です。このタンパク質は、エナメル質が完成するとほとんど確認できなくなります。今日、歯周病によって減少した骨を再生するためにこのアメロジェニンはエムドゲインとして使用されています。しかし、エムドゲインはブタ由来のものを使用しており、ヒトからのアメロジェニンはこれまでありません。今回の研究によって、ヒトのアメロジェニンを抗体から作成できるようになりました。そのため、今後の歯科界にとっても非常に重要な研究になります。

研究成果の概要(英文)：objective: Amelogenins are major components of extra cellular matrix proteins in developing teeth, and regulate the growth of enamel crystals. They also function as signaling molecules in cell differentiation. This study aimed to determine the biological effects of amelogenins on the differentiation of HAT-7 dental epithelial cells and MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells using full-length recombinant human amelogenin (rh-AMEL). Results: Western blotting and silver staining confirmed the successful purification of rh-AMEL. Mineralization and ALP activity in HAT-7 cells were significantly higher after treatment with 4 μg / mL rh-AMEL, but not after treatment with EMD. In MC3T3-E1 cells, on the other hand, rh-AMEL showed biphasic effects on differentiation. Treatment with low concentrations of rh-AMEL and EMD increased mineralization and ALP activity in MC3T3-E1 cells, whereas treatment with high concentrations of rh-AMEL (4 μg/ mL) and EMD (100 μg/ mL) had the opposite effect.

研究分野：小児歯科

キーワード：アメロジェニン 再生医療 MIH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦では齲蝕が著しく減少してきているが、Molar Incisor Hypomineralization (MIH) が認めることが報告されつつある。MIH は、第一大臼歯としばしば永久切歯において、遺伝性ではないエナメル質形成不全と定義され、約 5~25%の小児に生じることが、ヨーロッパを中心に数多く報告されている。申請者は日本小児歯科学会臨床研究推進委員会の調査責任者として、MIH の全国有病者数を調査した。本邦では、小児人口の 1/3,000 程度に配分した被験者数、約 5000 名の 7~9 歳の男女小児において約 20%程度の発症率であることを、2016 年アジア小児歯科学会国際小児歯科学会教育レクチャーにおいて講演した。MIH の発症要因としては、出生前後の母体や乳幼児の環境に起因しているとの報告があり、特に母体および乳児のビタミン D 不足が原因の一つと想定されている。ビタミン D は生体内で活性化され、歯や骨の石灰化に強く影響する。申請者は、石灰化培地に活性化ビタミン D を加えると歯原性上皮細胞は石灰化し、さらに Ca²⁺センサーを用いた長時間ライブセルイメージングにおいて、歯原性上皮細胞内の自発的 Ca²⁺応答が増加することを確認した 1、2)。永久歯の形成不全は、審美的な問題や齲蝕の発生、さらには歯列・咬合の崩壊を招くことから、小児歯科臨床においてきわめて重要な課題である。

エナメル質形成不全を防ぐ方法としては、母体の健康を保つことはもちろん、妊産婦および乳児の適度な日光浴によりビタミン D を生体内で合成させることが望ましいが、形成不全が生じた歯の対応は制約が多い。形成不全が著しい場合は修復処置となるが、コンポジットレジン接着が阻害されその予後は悪いため、グラスアイオノマー修復や臼歯部では既成冠修復が用いられる。形成不全が軽度の場合は、フッ化物や CPP-ACP により再石灰化療法が行われるが、白斑など色調変化の改善には年単位の時間を要する。脱灰エナメル質の再石灰化実験で、豊富な Ca、P そしてフッ化物に加えリコンビナント・ブタアメロジェニンタンパク 3) や市販のエムドゲインにより、エナメル質の再石灰化が促進することが報告されている 4)。エムドゲインはブタ歯胚より抽出したエナメルマトリックス抽出物で、その 90%以上は疎水性のアメロジェニンからなる 5)。アメロジェニンは、ALP 活性の上昇や、骨細胞の分化など石灰化誘導能を持つとされているが、申請者らはアメロジェニンを分泌するブタマラッセ遺残上皮様細胞を分離し、骨芽細胞と共培養したところ、骨芽細胞の石灰化能および ALP 活性を低下させたことを報告しており、アメロジェニンの濃度に起因している可能性が高く、詳細は不明である。

2. 研究の目的

市販のエムドゲインは、ブタ歯胚より抽出したエナメルマトリックス抽出物で、その 90%以上は疎水性のアメロジェニンからなるものである。アメロジェニンは、歯の形成期においてエナメル上皮細胞に発現するが、歯の形成が完了するとエナメル上皮細胞は消失するため、ヒトからアメロジェニンを採取することは困難であり、これまでにヒトアメロジェニンを使用した石灰化に関する報告はほとんどみられない。

本研究は、ヒトアメロジェニンの機能を検証するために、全長リコンビナント・ヒトアメロジェニンを遺伝子導入により発現および精製し、ヒトアメロジェニンの詳細を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) リコンビナント・ヒトアメロジェニン発現プラスミドの作成

pCMV6 Entry vector の PmeI サイトに HisTag のオリゴヌクレオチドを挿入し c-Myc-DDK-HisTag Entry vector を作製した。次に、ヒトアメロジェニンレンチウイルスベクター (Origene 社; Lenti ORF clone of human AMELX, transcript variant 3, Myc-DDK-tagged) と c-Myc-DDK-HisTag Entry vector 共通の制限酵素サイト (Sgf1, Mlu1) を使い、AMELX 遺伝子を c-Myc-DDK-HisTag Entry vector に挿入してヒトアメロジェニン発現プラスミド (pAMELXv3-Myc-DDK-HisTag) を作製した。

(2) リコンビナント・ヒトアメロジェニンの同定および生成

pAMELXv3-Myc-DDK-HisTag 遺伝子をタンパク質発現用哺乳類浮遊細胞 (EXPI 細胞) に導入し、無血清培地を用いて、37 °C、5%CO₂ 条件下で 7 日間培養した。細胞浮遊液を遠心分離し、その上清を実験に用いた。リコンビナント・タンパク質のアフィニティー精製には、DDK アフィニティービーズを用いた。上清とビーズを 4 °C、overnight で反応させ、TBS を用いて洗浄した。溶出には IgG elution buffer を用い、中性化には 1M Tris を用いた。タンパクの定量には Quant-iT™ Protein Assay Kit を使用した。

リコンビナント・ヒトアメロジェニン同定においては、サンプルを SDS-PAGE 法によって分離し、転写した。その後、ニトロセルロースメンブレンをブロッキング、1 次抗体として抗アメロジェニン抗体と抗 DDK 抗体を室温にて 1 時間反応させ、2 次抗体として 10000 倍希釈した goat anti rabbit IgG を 1 時間室温にて反応させた。洗浄後、SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate にて発光させ Light capture (ATTO) を用いて観察した。

(3) エムドゲイン (EMD) およびリコンビナント・ヒトアメロジェニンによる細胞増殖能

リコンビナント・ヒトアメロジェニンと EMD 添加による細胞増殖能の変化を確認するため、HAT-7 と MC3T3-E1 を 96well plate に播種し、細胞定着後 (24 時間後)、リコンビナント・ヒト

アメロジェニン(0, 0.01, 1, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)もしくはEMD(0, 0.01, 1, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)添加培地を添加し72時間培養した。細胞増殖能はCyQUANT[®]CELL Proliferation Assay Kitを使用し、DNA量をinfinit200にて測定した。

(4) エムドゲイン (EMD) およびリコンビナント・ヒトアメロジェニンによる石灰化能

1) アリザリンレッド S 染色

HAT-7を播種し、定着後、リコンビナント・ヒトアメロジェニンないしEMD添加し、10日間培養した。また、MC3T3-E1を播種し定着後、リコンビナント・ヒトアメロジェニンないしEMDを添加し20日間培養した。培養後、70%エタノールで冷却固定、洗浄し、アリザリンレッドSで5分間染色した。

2) アルカリフォスファターゼ・アッセイ (ALP assay)

アリザリンレッドS染色後のプレートをpH7.0に調整したCetylpyridinium chlorideで脱色を行い、ラボアッセイTMALPにてALP assayを行った。405 nmの吸光度はBIO-RAD model 680 micro plate readerで測定した。

4. 研究成果

(1) リコンビナント・ヒトアメロジェニンの発現

pAMELXv3-Myc-DDK-HisTag遺伝子を導入した精製前のEXPI細胞の培養上清のウエスタンブロッティング解析において、抗DDK抗体に反応する30kDa, 33kDa, 65kDaの複数のバンドが確認された。単量体は27 kDaであるが、抗c-Myc抗体および抗DDK抗体では27 kDaよりも大きな分子量のバンドが複数確認されたので、本当にアメロジェニンなのか確認するため、アメロジェニン抗体で確認したが、他の抗体と同じ結果であった。

溶出したサンプルを、ウエスタンブロッティングを行い精製度の検討を行った。MEM-Code染色によるタンパク質染色でビーズ結合前は、多数のバンドが現れているのに対し、精製後のバンドは27 kDaに認められた。ウエスタンブロッティングでも同様なバンドが確認できた。銀染色でも精製後のタンパクのバンドは27 kDa, 54 kDaに現れ、ウエスタンブロッティングでも同様なバンドが認められた。以上のことよりDDKアガロースビーズによって、高純度のリコンビナント・アメロジェニンが精製されたことが示された。アフィニティー精製したタンパクは濃度測定の結果から、細胞上清50 mLあたり約450gのリコンビナント・ヒトアメロジェニンが精製できることが確認された。また、27 kDaより小さい分子量のバンドが確認されず、全長でとれていることを確認した。

(2) EMD およびリコンビナント・ヒトアメロジェニンによる細胞増殖能

リコンビナント・ヒトアメロジェニンとEMD添加による細胞増殖能の変化を確認した。EMDを0, 0.01, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加時において、72時間後、HAT-7において有意な細胞数の低下を認めた。また、MC3T3-E1において細胞の有意な増殖を認めた。リコンビナント・ヒトアメロジェニンを0, 0.01, 1, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加時において、72時間後、HAT-7において有意な細胞数の低下を認めた。また、MC3T3-E1において有意差は認められなかった。

(3) EMD およびリコンビナント・ヒトアメロジェニンによる石灰化能

リコンビナント・ヒトアメロジェニンとEMD添加によるALP assayを行なった。EMDを0, 0.01, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加時において、20日後、HAT-7では有意差を認めなかった。MC3T3-E1においては、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EMD添加することにより有意な石灰化の減少を認めた。リコンビナント・ヒトアメロジェニンを0, 0.01, 1, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加時において、20日後、HAT-7に4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加することにより有意な石灰化の亢進を認めた。MC3T3-E1においては、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EMD添加することにより有意な石灰化の減少を認めた。

引用文献

- 村田佳織、高橋亜友美、齊藤正人、谷村 明彦、ストア作動性Ca²⁺流入によるエナメル質関連遺伝子の発現調節、北海道医療大学歯学雑誌、34巻2号、2015、139
- Murata K, Takahashi A, Morita T, Nezu A, Fukumoto S, Saitoh M, Tanimura A. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on spontaneous calcium responses in rat dental epithelial SF2 cells revealed by long-term imaging. *Biomed Res.* 37(6). 2016. 329-334.
- Fan Y, Sun Z, Moradian-Oldak J. Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials.* 30(4). 2009. 478-83.
- Cao Y, Mei ML, Li QL, Lo EC, Chu CH. Enamel prism-like tissue regeneration using enamel matrix derivative. *J Dent.* 42(12).2014. 1535-42.
- Hoang AM, Klebe RJ, Steffensen B, Ryu OH, Simmer JP, Cochran DL. Amelogenin is a cell adhesion protein. *J Dent Res.* 81(7). 2002. 497-500.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8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 Takahashi Ayumi, Morita Takao, Murata Kaori, Minowa Erika, Jahan Azmere, Saito Masato, Tanimura Akihiko	4. 巻 107
2. 論文標題 Effects of full-length human amelogenin on the differentiation of dental epithelial cells and osteoblastic cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 104479 ~ 104479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2019.07.004	査読の有無 有
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 Djais Ariadna A., Theodorea Citra Fragrantia, Mashima Izumi, Otomo Maiko, Saitoh Masato, Nakazawa Futoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification and phylogenetic analysis of oral Veillonella species isolated from the saliva of Japanese children	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 F1000Research	6. 最初と最後の頁 616 ~ 616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12688/f1000research.18506.5	査読の有無 有
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 村井 雄司, 齊藤 正人, 蓑輪映里佳, Syed Taufiqul Islam, 小橋 美里, 榊原さや夏, 菅谷 裕行, 倉重 圭史, 疋田 一洋.	4. 巻 9
2. 論文標題 小児におけるデジタル印象およびアルジネート印象のストレス評価	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 デジタル歯科学会誌	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Kondo Yuki, Ito Shuichi, Uehara Osamu, Kurashige Yoshihito, Fujita Yusuke, Saito Takashi, Saitoh Masato	4. 巻 35
2. 論文標題 Chemical and biological properties of new sealant-use cement materials	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dental Materials	6. 最初と最後の頁 673 ~ 685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dental.2019.02.014	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 有田憲司, 齊藤正人他	4. 巻 57
2. 論文標題 日本人小児における乳歯・永久歯の萌出時期に関する調査研究 II - その 2. 永久歯について -.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 小児歯誌	6. 最初と最後の頁 363-373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
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 有田憲司, 齊藤正人他	4. 巻 57
2. 論文標題 日本人小児における乳歯・永久歯の萌出時期に関する調査研究 II - その 1. 乳歯について -.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 小児歯誌	6. 最初と最後の頁 45-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
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 村田佳織, 石田成美, 齊藤正人, 谷村 明彦.	4. 巻 38
2. 論文標題 歯原性上皮細胞におけるマイグレーションの制御因子の 同定 成長因子とケモカインの相互作用 - ,	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 北海道医療大学歯学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
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 Saitoh Masato, Nakamura Yuki, Hanasaki Mika, Saitoh Issei, Murai Yuji, Kurashige Yoshihito, Fukumoto Satoshi, Asaka Yukiko, Yamada Masaaki, Sekine Michikazu, Hayasaki Haruaki, Kimoto Shigenari	4. 巻 23
2. 論文標題 Prevalence of molar incisor hypomineralization and regional differences throughout Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Environmental Health and Preventive Medicine	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1186/s12199-018-0748-6	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 -

1. 著者名 中村 由紀、齊藤 一誠、倉重 圭史、鈴木 淳司、星野 倫範、島村 和宏、飯沼 光生、早崎 治明、齊藤 正人。	4. 巻 55(3)
2. 論文標題 小児の歯の外傷 小児歯科雑誌の掲載報告と診療ガイドライン	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 小児歯科学雑誌	6. 最初と最後の頁 331-344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
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 Fukuda A, Hirose M, Murata Y, Otomo M, Yahata S, Fujita Y, Saitoh M	4. 巻 3
2. 論文標題 Examination of site specificity in oral cavity of cariogenic bacteria in dental plaque by real-time PCR method.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Dent Oral Craniofac Res	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 倉重 圭史、戸島 洋和、首藤 かい、村井 雄司、齊藤 正人。
2. 発表標題 エナメルマトリックスデリバティブを用いたエナメル質の再生
3. 学会等名 第14回日本再生歯科医学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋 亜友美、村田 佳織、谷村 明彦、齊藤 正人。
2. 発表標題 エナメル上皮細胞と骨芽細胞におけるリコンビナント・ヒトアメロジェニンの作用
3. 学会等名 第55回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2017年

〔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	谷村 明彦 (TANIMURA Akihiko) (70217149)	北海道医療大学・歯学部・教授 (30110)	
研究 分担者	安彦 善裕 (ABIKO Yoshihiro) (90260819)	北海道医療大学・歯学部・教授 (30110)	