

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K17040

研究課題名(和文) 2種類のエナメルプロテインを用いた多機能性歯周組織再生用メンブレンの開発

研究課題名(英文) Development of a Multifunctional Membrane for Periodontal Tissue Regenerative Therapy with Two Enamel Proteins

研究代表者

池田 裕一 (Yuichi, Ikeda)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：30736179

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)：アメルチン(AMTN)は、歯のエナメル質の成熟期に発現するタンパク質で、歯の石灰化において重要な役割を担っている。本研究では、AMTNの骨の治癒への効果をin vivoのマウス頭蓋骨欠損モデルを用いて検討した。AMTNを含んだ新たなメンブレンを作成し、欠損部に設置して経過をマイクロCT等を用いて効果を検討した。術後2週後には骨の治癒が開始され、8週間後にはAMTN含有メンブレンを設置した欠損の大部分が有意に硬組織で閉鎖されていた。また、その周囲には、CD31陽性細胞が観察された。この結果は、今後AMTNが歯周組織再生治療だけでなく、整形外科領域など様々な領域で応用できる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではアメルチンという、歯の石灰化や歯と歯肉の接着に関与するタンパク質を用いて、歯周組織再生用の膜を作成した。マウスを用いた実験によって、咲く際したこのメンブレンには、通常に使われているメンブレンに比べて有意に骨の治癒を促進させる効果を持っていることが示唆された。また、AMTNには骨の細胞の石灰化を促進させる効果や、骨の細胞の細胞分裂を促進させる効果などを持つことも明らかになった。このことから、将来歯周組織再生治療にアメルチンが使用される可能性、また整形外科領域など様々な領域で応用できる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Amelotin (AMTN) is a protein expressed during tooth enamel maturation and plays an important role in tooth mineralization. In this study, the effect of AMTN on bone healing was investigated using an in vivo mouse skull defect model. A new membrane containing AMTN was prepared and placed in the defect, and bone healing was examined using micro-CT and other techniques. Bone healing started 2 weeks after surgery, and most of the defects where the AMTN-containing membrane was placed were significantly closed with hard tissue at 8 weeks. In addition, CD31-positive cells were observed around the defect. These results suggest that AMTN may be applied not only in periodontal regenerative therapy but also in various other areas, such as orthopedic surgery.

研究分野：歯周病学

キーワード：エナメル蛋白質 骨 接合上皮

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯槽骨や結合組織などの歯周組織の破壊を伴う炎症性疾患であり、その進行により歯の喪失を伴う生活習慣病である。我が国の国民の約80%が歯周病に罹患しているとも言われ、国民病とも呼べる疾患である。歯周病が進行した症例では歯周組織の再生を目的に歯周組織再生治療がおこなわれる。その一つである Guided Tissue Regeneration (GTR) 法は GTR メンブレンを歯肉と骨の間に介在させ上皮組織と結合組織を排除することで、選択的に骨組織やセメント質、歯根膜などを新生させる治療法である。メンブレンは糸で歯に固定されるのでメンブレンが歯にしっかりと密着しているわけではなく、組織とメンブレンの間には隙間が生じている。つまり閉鎖が不十分な状態であり安定性が低い。また、GTR 法の併発症として歯肉弁の退縮による膜の露出が数多く報告され、感染の危険性の上昇や再生量の減少などが生じ、その確率は60~87%と言われている (Tonetti 1993, Murphy 1995, Cortellini 1995)。さらに、メンブレン自体には組織再生を直接誘導する能力は備わっていない。つまり GTR メンブレンには不十分な部分が多く、改善の余地が多く残されている。以上の問題点が解決できれば GTR 法の確実性はさらに向上すると考えられる。

そもそも軟組織である歯肉がどうして硬組織である歯質と接着できるのか、そこに問題解決の糸口があるのではないかと考えた。歯肉は接合上皮で歯質と接着している。さらに接合上皮と歯質の間には様々なタンパク質が介在し、2つの組織をつないでいることが明らかになっている。特にその中でもアメロチン (AMTN) は、歯質の主成分であるハイドロキシアパタイトとの結合性が強く、骨芽細胞の石灰化結節の形成を促進することが明らかになっている。この接合上皮中の AMTN の配置をメンブレン上で再現することができれば、メンブレンに①歯と骨に接着する性質、②膜表面が生体内で石灰化する性質、③骨芽細胞の石灰化を誘導する性質、④歯肉結合組織の膜表面への接着を促進する性質の4つの性質を持たせることができ、GTR 法の成功率を飛躍的に上げることができると考えた。さらに開発に成功すれば歯科以外の他分野での応用も期待できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では AMTN を含有した新たな GTR 膜を作成し、マウス頭蓋骨欠損モデルを用いて、*in vivo* においてこのメンブレンの骨の治癒への効果を調べることである。また、*in vitro* においても AMTN の骨芽細胞への効果を観察する。

3. 研究の方法

本研究では大腸菌 (Rosetta [DE3] 株) に発現させたリコンビナントヒト (rh) AMTN タンパク質を精製し、実験に用いた。

まず *in vivo* 実験では Cytoplast RTM Collagen Membrane を基板のメンブレンとして用いた。まず、5 mg/ml のコラーゲン溶液であるアテロコラーゲン、0.1M の水酸化ナトリウム、20mM の Genipin、PBS を混和させ 3.4mg/ml のコラーゲングルを作成し、その溶液を 15 μ l を 4mm 四方のメンブレン上に添加した。30 分間 37°C のインキュベーター内で放置した後に、8.0 μ g の rhAMTN タンパク質を含んだコラーゲングル溶液 15 μ l を上から添加し、37°C のインキュベーター内で乾燥させて 2 層のゲル構造のメンブレンを作成し、実験に用いた。コントロール群では rhAMTN タンパク質を含んでいないメンブレンを用いた。

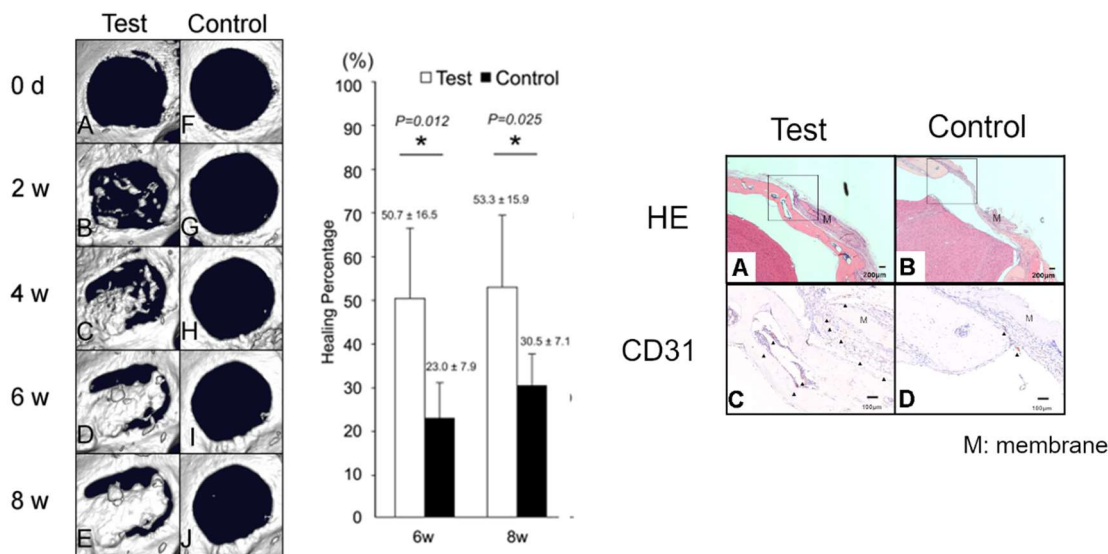
5 週齢の C57BL/6N マウスに頭蓋骨左側に直径 3mm の骨欠損を作製し、欠損部に作成したメンブレンを設置、縫合、閉鎖した。術後、および 2 週間毎にマイクロ CT 撮影を行い、骨の治癒を評価した。術後 8 週後に安楽殺し、組織学的評価を行った。



また *in vitro* の実験ではマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 (subclone 14) を 24 ウェルプレートに 50,000 細胞/ウェルの濃度で播種し、翌日に L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩 n 水和物と β グリセロリン酸を含んだ骨誘導培地に 50 μ g/ml の rh アメロチン、もしくは 0.1 μ g/ml の rhBMP-2 を加えた培地に交換し、培養を行った。3 日目、10 日目に細胞から RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて遺伝子発現 (*Gapdh*, *Alp*, *Bglap2*, *Spp1*, *Colla1*) の変化を解析した。細胞の石灰化の評価は、アリザリンレッド染色を用いて石灰化面積の評価を行った。また発現したアルカリホスファターゼの活性を ALPassay を用いて測定した。さらに細胞増殖能を調べるために、WST8 アッセイを行った。MC3T3-E1、またヒト由来骨芽細胞様細胞 HCO を 96 ウェルプレートに 5,000 細胞/ウェルの濃度で播種した。1 時間後に 50 μ g/ml の rh アメロチンを培地に添加し、24 時間後に水溶性テトラゾリウム塩を添加し、その 4 時間後に吸光度を測定した。

4. 研究成果

マウス頭蓋骨欠損モデルを用いた動物実験において、テスト群はコントロール群と比較して、2 週後から骨の治癒の開始が観察できた。6 週後、8 週後においては統計学的な解析においても、骨欠損部の有意な骨治癒が認められた。組織学的観察においても、テスト群ではメンブレン下に骨の再生が認められ、既存骨と新生骨の間には濃く染色されるコラーゲン線維の走行が確認できた。また、テスト群において新生骨内、そして含有メンブレンの周囲に CD31 陽性細胞が顕著に認められた。

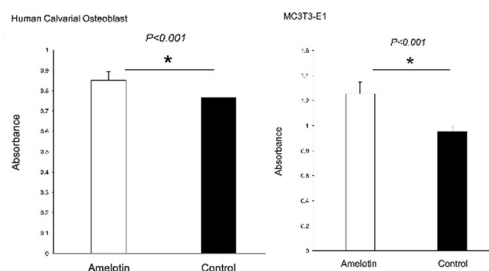
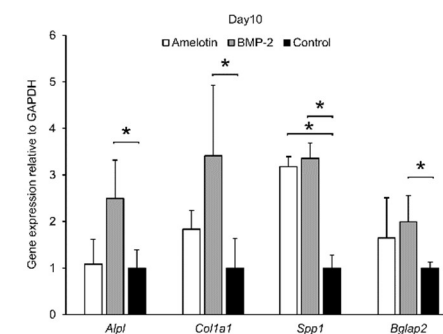
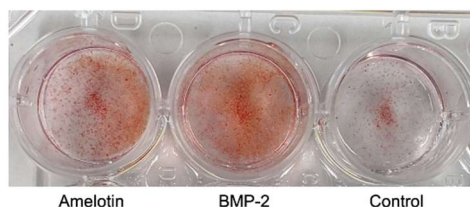


また *in vitro* においては MC3T3-E1 細胞を rh アメロチン存在下で培養すると、10 日目において rhBMP-2 と同様に顕著にアリザリンにて染色された像が確認でき、石灰化面積はコントロール群と比較して有意に増加していた。また、リアルタイム PCR にて遺伝子発現量の変化を確認したところ、3 日後、10 日後ともにテスト群はコントロール群に比べ *Spp1* の発現が上昇していた。他の遺伝子に関して有意差は認められなかった。アルカリホスファターゼ活性はテスト群とコントロール群では有意差はなく、BMP-2 群はコントロール群と比較すると有意差が認められた。

また WST8 アッセイを用いて細胞増殖能の解析をおこなったところ、HCO 細胞株、MC3T3-E1 細胞株共に、rhAMTN を添加した 24 時間後に有意に生細胞数が増加していた。

本実験から新たに作成した rhAMTN を含有させた GTR 膜は、骨の治癒を促進させる可能性を有しており、今後歯周組織再生治療だけでなく、整形外科領域など硬組織の治療にも用いることも期待される。

今後は作製した GTR 膜の詳細な機能の分析、大型の動物を用いた *in vivo* での検討、ほかのエナメル蛋白質を用いた検討などを行っていく予定である。



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Tanaka D, Ikeda Y, Ikeda E, Yokose M, Ganss B, Iwata T	4. 巻 49(12)
2. 論文標題 Effect of Amelotin on Bone Growth in the Murine Calvarial Defect Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 3676-3684
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10439-021-02867-z	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中大貴、池田裕一、池田恵莉、横瀬真子、岩田隆紀.
2. 発表標題 マウスの頭蓋骨欠損モデルにおけるアメロチンの骨再生への効果
3. 学会等名 第63回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 Biological agents for the induction of biomineralization	発明者 Bernhard Ganss, Yuichi Ikeda	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、CA2968134C	取得年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 Device including biological agents for in vitro induction of biomineralization	発明者 Bernhard Ganss, Yuichi Ikeda	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、US10596301B2	取得年 2020年	国内・外国の別 外国

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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			
カナダ	トロント大学			