

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791397

研究課題名 (和文) 修復象牙質形成における発現遺伝子のプロファイリング

研究課題名 (英文) Gene Expression Profiling during Reparative Dentinogenesis

研究代表者

高橋 雄介 (TAKAHASHI YUSUKE)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：60397693

研究成果の概要：本研究は、生物学的な作用を発揮する覆髄材料の開発を念頭におき、修復象牙質を積極的に誘導するような特異的な分子の同定を目的として遂行された。ラット臼歯に窩洞形成を行った後の歯髄において発現する遺伝子をマイクロアレイ法にて網羅的検索を行い、得られた結果をリアルタイム PCR にて詳細な解析を行った。その結果、Matrix Metalloprotease (MMP)-3、MMP-13、TIMP-1 の3分子が修復象牙質形成に関与している可能性があることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯学、再生医学、マイクロアレイ、リアルタイム PCR、修復象牙質

1. 研究開始当初の背景

歯周病と並んで歯科領域における二大疾患の一つであるう蝕は、現在でも極めて発症率の高い感染性疾患である。う蝕治療の基本概念は、う蝕細菌に感染したエナメル質ならびに象牙質を物理的に除去した後、修復材料を用いて欠損部の補填を行うことであるが、う蝕の進行が象牙質を超えて歯髄にまで到達している場合には、覆髄剤で露髄面を被覆して保護するような直接覆髄処置、もしくは歯髄を除去する抜髄処置のいずれかが選択されることが多い。直接覆

髄処置は侵襲が少なく、生体組織の犠牲という点では抜髄処置に比べてはるかに有利な治療法であるが、歯髄への細菌感染のコントロールと共に、露髄面に貼付する薬剤や材料によって修復象牙質を確実に誘導できるか否かも治療の予後を左右する重要な因子である。

これまで、直接覆髄処置には水酸化カルシウム製剤やレジン系材料が使用されてきたが、いずれの材料も生体の治癒には影響を与えないか、わずかに促進する程度であった。そのため、より積極的な象牙質再生

能を備えた覆髄剤(材)が求められており、一つの候補として、修復象牙質の形成メカニズムに基づく生物学的な作用を発揮する材料の開発に期待が寄せられている。しかし、いまだ修復象牙質形成のメカニズムは明らかとなっておらず、後天的に形成される修復象牙質を積極的に誘導するような特異的な分子については未知のままである。

2. 研究の目的

上記のような背景から、我々はまず象牙質の石灰化に關与することが明らかとなっている分子の一つである **Dentin Matrix Protein 1(DMP1)** (Ye L *et al.* *J. Biol. Chem.*18:19141-48, 2004)に着目し、窩洞形成後の修復象牙質形成過程における DMP1 の発現や局在についてラットを用いた動物実験系にて検討してきた。そして、修復象牙質の形成過程において、DMP1 遺伝子が経時的な発現の変化を示し、また分泌されたタンパクも経時的な局在の変化を示すことを明らかにし、修復象牙質の形成に DMP1 が何らかの役割を果たしている可能性を示唆してきた (日歯保存誌, 47: 192, 2004; Takahashi Y *et al.*, 82nd General Session & Exhibition of the IADR, 2006)。しかし、DMP1 のみが修復象牙質の形成に關与している分子であるとは考えにくく、他の生命現象と同様に複数の分子が相互関係を持ちながら、修復象牙質が形成されている可能性が高い。そこで、本研究では、修復象牙質形成に關与する可能性のある複数の遺伝子群の検索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ法による修復象牙質形成過程における発現遺伝子の検索

我々がこれまでに行ってきたラットを用いた動物実験系を用いて、窩洞形成後の歯髓細胞や象牙芽細胞における遺伝子発現を、マイクロアレイ法にて経時的に検索した。

①窩洞形成および歯髓細胞からの Total RNA の抽出

規格窩洞形成器を用いて、9週齢雄性 Wistar系ラットの上顎第一臼歯近心面に全身麻酔下で、歯髓までの距離が約200 μ mとなるような深さの窩洞を形成し、従来型グ

ラスアイオノマーセメント(Fuji IX, GC, 東京)を充填した。

窩洞形成直後、および形成後1、3、7、14日目に被験歯を抜去し、サンドブラストを用いて歯根膜ならびにセメント質の除去を行った後、歯根を切断し、被験歯から歯髓細胞以外の細胞の除去を行い、液体窒素中に保管した。続いて、ホモジナイザー (TissueLyser®, Qiagen, Hilden, Germany) とジルコニアボールを用いて被験組織をホモジナイズし、RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen)を用いて、ラット歯髓腔内細胞のTotal RNAを抽出した。この際、他のゲノムDNAによる汚染を防ぐために、RNase-free DNase set (Qiagen)を用いた。なお、コントロールには窩洞形成を行わない歯を用いた。

②マイクロアレイ

被験歯より抽出したTotal RNAの純度を確認 (2100 Bioanalyzer, Agilent, Santa Clara, CA, USA)したのち、GeneChip遺伝子発現解析アレイ (Rat Genome 230 2.0, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)を用いて、マイクロアレイ解析を行った。その解析結果から、窩洞形成を行うことによって刺激を受けた歯髓細胞が発現する遺伝子群とコントロールで発現する遺伝子群を比較し、窩洞形成後に発現が増強する遺伝子群と減弱する遺伝子群に分類をDNA MicroArray Viewer Software (クラボウ、大阪)を用いて行った。

(2)リアルタイムPCR法による発現遺伝子の詳細な解析

実験1と同様の方法を用いて、ラットに対して窩洞形成を行った直後 (Day 0)、1、3日目に被験歯を抜去し、Total RNAの抽出を行い、それを逆転写酵素 (High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix, Applied Biosystems, Framingham, MA, USA)を用いてcDNAに逆転写を行った。実験1にて分類された遺伝子群を対象として、それぞれに特異的なプライマーの設計を行い、リアルタイムPCR (7500 Fast Real-time PCR system, Applied Biosystems)を行い、得られた結果をコントロールと比較してマイクロアレイにより得られた結果の検証を行った。試料数は3とした。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイ

ラットから抽出した Total RNA の量ならびに純度が解析可能なレベルであったので、マイクロアレイ解析を行い、窩洞形成を行った実験群と行っていないコントロール群の間で2倍以上の発現変化が認められる遺伝子について比較検討を行った。

その結果を以下の表1に示す。

表1 マイクロアレイにて2倍以上の発現変化を示した遺伝子数（総遺伝子数：31099）

	発現上昇	発現抑制
窩洞形成直後	308	203
1日後	329	123
3日後	337	169
7日後	130	289
14日後	299	237

上記結果の中から、窩洞形成直後より継続的な発現上昇が認められた遺伝子の抽出を行った。その結果、窩洞形成直後、1日後、3日後と継続して発現上昇を示した遺伝子数は7、窩洞形成直後ならびに1日後において発現上昇を示した遺伝子数は18、1日後ならびに3日後に発現上昇を示した遺伝子数は48認められた。

さらにこれらの中から、Gene Ontology 分類に基づいて、創傷治癒、炎症反応、組織再生などに関与していることがこれまでに報告されている9分子を抽出した。その結果を以下に示す。

1. *small proline-rich protein 3 (predicted)/Sprr3_predicted*
2. *transmembrane protease, serine 11d/Tmprss11d*
3. *tissue inhibitor of metalloproteinase 1/Timp1*
4. *matrix metalloproteinase 3/Mmp3*
5. *Fatty acid binding protein 5, epidermal/Fabp5*
6. *serine protease inhibitor, Kazal type 5 (predicted)/Spink5_predicted*
7. *chemokine (C-X-C motif) ligand 1/Cxcl1*
8. *matrix metalloproteinase 13/Mmp13*
9. *desmoplakin/Dsp*

(2) リアルタイム PCR

マイクロアレイにより得られた、上記の9遺伝子について、リアルタイムPCRを用いて、その発現についての詳細な解析を行った。

内在性コントロールには β -actin を用い、 $\Delta\Delta Ct$ 法にて解析を行った結果を以下の図1に示す。

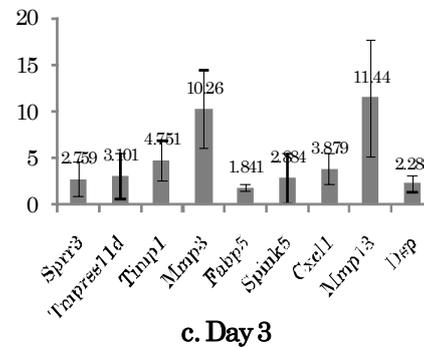
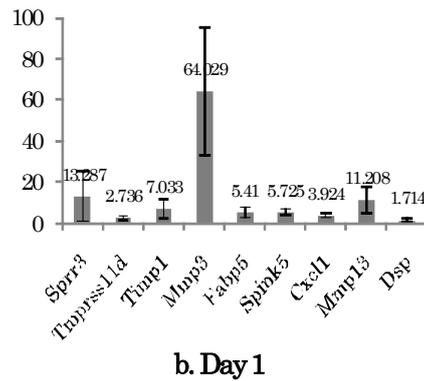
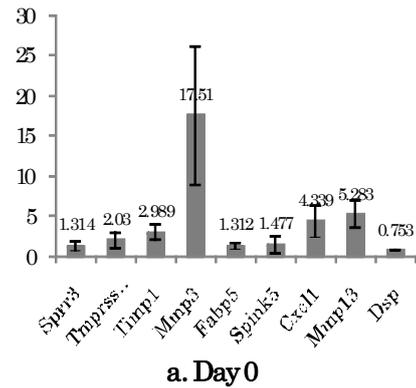


図1. リアルタイムPCRの結果
a. Day 0、b. Day 1、c. Day 3

以上より、リアルタイム PCR 法によって、マイクロアレイの結果と同様の傾向の結果が得られ、マイクロアレイの結果が検証された。これらの分子の中に、修復象牙質形成に関与するものが含まれている可能性は充分にあり、今後さらなる検討を行っていく予定である。

特に、上記の候補分子の中で、*MMP3*、*MMP13*、*TIMP1* の 3 遺伝子については、創傷治癒や、血管新生の促進、結合組織のリモデリング等の機能を有するといわれているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) ファミリーに属する分子であり、今後は、これら MMP ファミリー分子の局在や、機能についての詳細な解析を行っていく予定である。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 高橋雄介、吉岡靖介、今里 聡、騎馬和歌子、恵比須繁之：ラット修復象牙質における遺伝子発現の網羅的解析。日本歯科保存学会 2008 年度秋期学術大会 (第 129 回) (2008 年 11 月 7 日、富山市)。
- ② Yoshioka S, Takahashi Y, Imazato S, Ebisu S: Microarray-analysis of Pulpal Gene Expression in Response to Cavity Preparation. 86th General Session & Exhibition of the IADR (2008 年 7 月 4 日、トロント、カナダ)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 雄介 (TAKAHASHI YUSUKE)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：60397693

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者