

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19800039

研究課題名（和文） ヒト歯髄組織の生化学的分析

研究課題名（英文） Biochemical analysis of human dental pulp

研究代表者

伊藤 勝敏（KATSUTOSHI ITO）

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：50433438

研究成果の概要：

ヒト歯髄組織には、様々な硬組織再生因子が発現しており、なかでも強力な硬組織形成因子である BMP-2 に関しては、タンパク質が発現しているのも確認されたが、その分子量は成熟型より高い分子量を示した。そこで、遺伝子を組み込んだ発現ベクターを細胞に導入して、タンパク質を発現させたところ、同じ高い値の分子量を示した。発現タンパク質にプロテアーゼを作用させたところ、数段階を経て成熟型となった事より、ヒト歯髄組織中の BMP-2 タンパク質は前駆体で存在し、何らかの刺激により成熟型として分泌されることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,320,000	0	1,320,000
20 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：骨形成タンパク質、BMP-2、ヒト、歯髄、再生

## 1. 研究開始当初の背景

歯髄組織は歯の形成・維持にとって重要な働きをする。2003 年、ヒト成人歯髄組織から多能性幹細胞の存在が発見されて以来、歯髄組織は象牙質の修復や歯周病による骨欠損の回復に有益であるばかりでなく、脳神経外科領域における神経再生研究も含めた、再生医学全般においても注目されるようになってきた。歯髄組織は歯の形成終了後、主に象牙質への栄養を供給したり象牙質からの知覚を受容したりするが、齶蝕などによって象牙質の破壊が起こると、硬組織誘導因子群を

活性化し、第三象牙質形成を促す働きを担っている。しかし、その分子メカニズムは未だ明らかになっていない。こうした歯髄組織の硬組織誘導現象には、骨形成タンパク質（BMP）の関与が想像されるが、分子レベルでの研究は現在まで十分なされていない。そこで本研究では、ヒト歯髄組織に含まれる BMP を含む他の硬組織関連因子の解析をおこない、歯髄組織の再利用の可能性を解析する。

## 2. 研究の目的

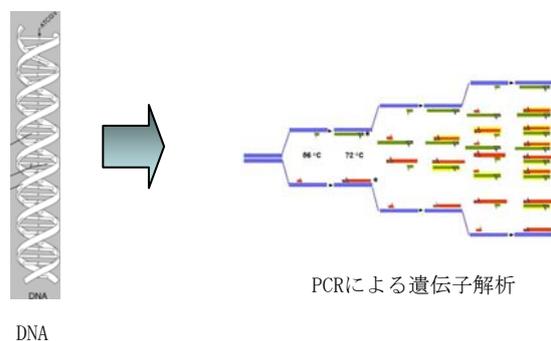
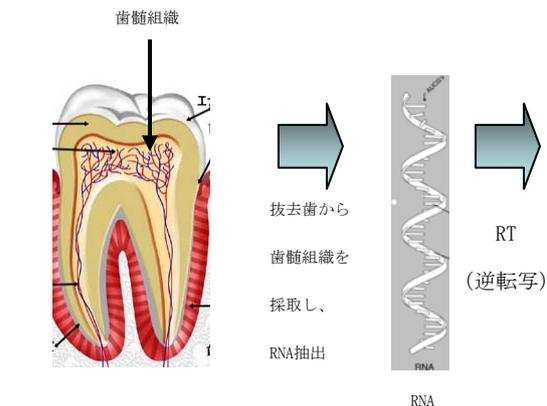
BMP は、骨から抽出・精製された骨誘導因

歯髄組織子であるが、培養ヒト歯髄細胞やヒト歯髄組織からも BMP 遺伝子が発現していることが報告されたことから、ヒト歯髄組織の硬組織形成に BMP が関与していると想像した。しかし、ヒト歯髄組織における硬組織誘導因子に関するタンパク質レベルでの解析は、これまで十分なされていない。そこで本研究では、ヒト歯髄組織における BMP を含む硬組織関連因子の発現状態を分子生物学的に解析する。

### 3. 研究の方法

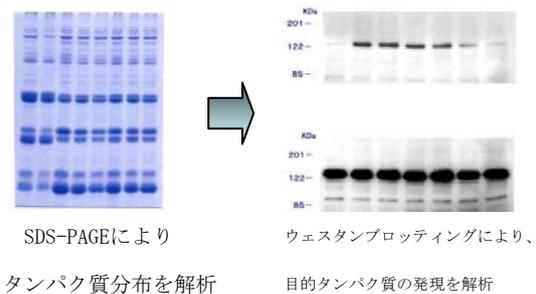
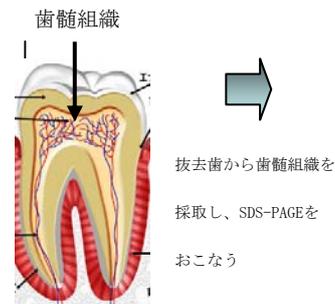
抜去歯より採取したヒト歯髄組織から、硬組織関連遺伝子および硬組織関連タンパク質を抽出し、その発現状態を解析した後、前駆体から成熟型へのプロセッシング実験をおこなう。

(1) 実験 I 遺伝子解析 ヒト歯髄組織を抜去歯から採取し、RNA を抽出する。採取した歯髄組織から total RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を作製する。作製した cDNA を用いて PCR をおこない、BMP を含めた硬組織関連遺伝子の解析をおこなう。



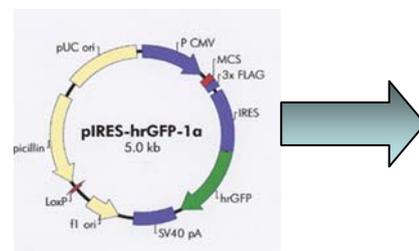
### (2) 実験 II タンパク質解析

ヒト歯髄組織を抜去歯から採取し、採取した歯髄組織を用いて SDS-PAGE によるタンパク質分布の解析をおこなう。また、組織再生因子の抗体を用いてウェスタンブロッティングをおこない、組織再生タンパク質の発現状態を解析する。さらに前駆体で存在するタンパク質が意図的にプロセッシング可能かを解析する。



### (3) 実験 III タンパク質の発現状態を解析

組織再生因子のタンパク質認識配列部 (CDS) を tag ベクターへ組み込み、COS7 等の細胞にトランスフェクションし融合タンパク質を発現させる。融合タンパク質を回収した後、実験 II と同様に SDS-PAGE とウェスタンブロッティングをおこない、発現状態を解析する。

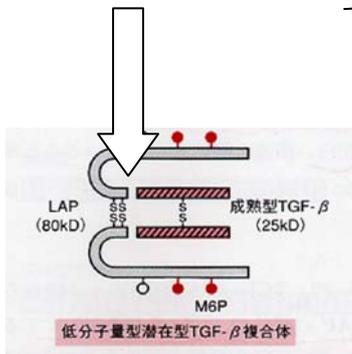




#### (4) 実験 IV 前駆体で発現するタンパク質の解析

前駆体で発現するタンパク質を Furin などのプロテアーゼを用いて、意図的に成熟型へとプロセッシング可能かを解析する。

成熟型タンパクへのプロセッシングを意図的におこなえるかどうかを解析する。



#### 4. 研究成果

##### (1) 実験 I 遺伝子解析

この実験において、ヒト歯髄組織には BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 の各 BMP 遺伝子が存在することを確認し、さらに ALP, OPN, OCN, DSP, MGP, DMP-1, MSX-2 といった硬組織関連遺伝子が発現していることを確認した。

##### (2) 実験 II タンパク質解析

この実験において、ヒト歯髄組織中の BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, および OPN, OCN, DSP の各タンパク質を検出したが、いずれも既知の値より高い分子量を示した。

##### (3) 実験 III タンパク質の発現状態を解析

この実験において、BMP-2 タンパク質は成熟型よりも大きな分子量の前駆体で存在している事が判明した。

##### (4) 実験 IV 前駆体で発現するタンパク質の解析

この実験において、発現した融合タンパク

質をプロテアーゼである Furin を用いてプロセッシングさせたところ、いくつかのステージを経て成熟型となった。

以上の結果より、ヒト歯髄組織中には、硬組織再生に関連する遺伝子が発現していることが確認された。また BMP-2 タンパク質は前駆体の状態で存在することが証明され、何らかの刺激において成熟型に分泌されることが示唆された。ヒト歯髄組織中に存在する強力な硬組織形成因子である BMP-2 を、意図的にプロセッシングできるようになれば、硬組織形成に有用である事と考えられた。

#### 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 2 件)

① 伊藤 勝敏, 荒川 俊哉, 村田 勝, 田隈 泰信, 有末 真: ヒト歯髄組織における骨形成タンパク質の発現: Journal of Hard Tissue Biology 16 巻 199-204 2007 年 査読有

② Katsutoshi Ito, Toshiya Arakawa, Masaru Murata, Junichi Tazaki, Taishin Takuma, Makoto Arisue: Analysis of bone morphogenetic protein in human dental pulp: Archives of Bio Ceramics Research Proceeding of the Asian BioCeramics 2008 vol 8, P166-169, 2008, 査読 有

〔学会発表〕(計 1 件)

① Katsutoshi Ito, Toshiya Arakawa, Masaru Murata, Junichi Tazaki, Taishin Takuma, Makoto Arisue: Analysis of bone morphogenetic protein in human dental pulp: the 8th Asian Bioceramics Symposium (ABC 2008) 2008 年 11 月 6 日 インド (チェンナイ)

〔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

伊藤 勝敏

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号: 50433438

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者