

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10177

研究課題名（和文）ラパマイシンとBMPの相互作用の解析と硬組織再生治療への応用

研究課題名（英文）Bone and tooth differentiation induced by BMP and rapamycin

研究代表者

大井田 新一郎 (Oida, Shinichiro)

鶴見大学・歯学部・名誉教授

研究者番号：10114745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）： 歯と骨の形成におけるラパマイシンと骨形成タンパク質(BMP)の相互作用を検討した。ブタ歯髄由来の象牙芽細胞様株細胞(PPU-7)を用いた三次元培養では、BMPにより球状の細胞層に囲まれた石灰化組織が観察され、ラパマイシンの投与でさらに石灰化が促進した。マウス歯胚の器官培養系を用いた実験も、PPU-7を用いた実験と同様の結果が確認された。マウスの骨芽細胞系株細胞(C2C12)を用いた実験では、両者の投与で著しい相乗効果が認められ骨形成が促進した。骨芽細胞への分化誘導経路は各種の阻害剤を用いた実験で検討した。以上の結果から、ラパマイシンとBMPは、骨および歯の再生治療への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯や骨の分化に対するBMPとラパマイシンの作用を検討し、学術的にはBMPは歯と骨の細胞増殖と分化を促進し、ラパマイシンは細胞増殖を抑制するが、BMPとの相乗効果で著しく分化を促進するという結果が得られた。これらの結果から社会的意義としては、ラパマイシンは歯や骨の形成過程で、BMPの分化誘導効果を促進し、再生治療に活用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： We investigated the interaction between rapamycin and bone morphogenetic protein (BMP) in the formation of teeth and bone. In three-dimensional cultures using a cell line resembling pig dental pulp (PPU-7), administration of BMP resulted in the observation of calcified tissue surrounded by spherical cell layers, with further enhancement of calcification upon rapamycin administration. Similar results were confirmed in experiments using mouse tooth germ organ culture systems. In experiments using mouse osteoblast cell line cells (C2C12), a significant synergistic effect was observed with the administration of both substances, leading to the promotion of bone formation. The differentiation induction pathway of osteoblasts was examined through experiments using various inhibitors. These findings suggest the potential application of rapamycin and BMP in regenerative therapies for bone and teeth.

研究分野：分子生化学

キーワード：ラパマイシン BMP 骨の再生 歯の再生 石灰化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨形成タンパク質(BMP)は、1990年までには遺伝子やタンパク質の構造も明らかとなり、歯や骨の細胞分化を促進し、硬組織形成期に關与する可能性が示唆されていた。外部から大量のBMPを投与し、骨や歯の形成を促進するというのが方法で再生治療が試みられたが有効な臨床応用は実現していなかった。一方、ラパマイシン(Rapamycin)は免疫抑制剤としてすでに臨床使用されている低分子の抗生物質であるが、我々はラパマイシンがBMPの分化誘導作用を著しく促進することを発見した。

(2) 当研究室では培養系を用いて、歯や骨の分化機構を研究する様々な実験系が確立されており、これらの方法はラパマイシンの作用機構の解明に有効であると考えられた。

## 2. 研究目的

- (1) 歯と骨の分化における、BMPとラパマイシンの作用機構を解明すること。
- (2) 研究結果をもとに、歯や骨の再生へのラパマイシンの臨床応用を検討すること。

## 3. 研究方法

### (1) 歯の細胞を用いた研究

ブタ歯髓由来細胞(PPU-7)を用いた実験

ブタ歯髓由来細胞(PPU-7)を非吸着性U字型96穴シャーレで培養し、球形の細胞塊(spheroid)の大きさと石灰化度を測定し、組織標本で観察した。

マウス歯胚の器官培養を用いた実験

まだ石灰化していない歯冠形成初期の歯胚(胎生16.5日)を器官培養し、ソフトX線像および組織標本で結果を観察した。

### (2) 骨芽細胞を用いた研究

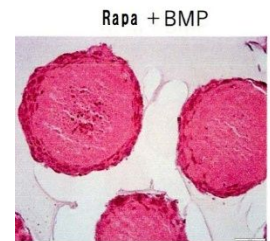
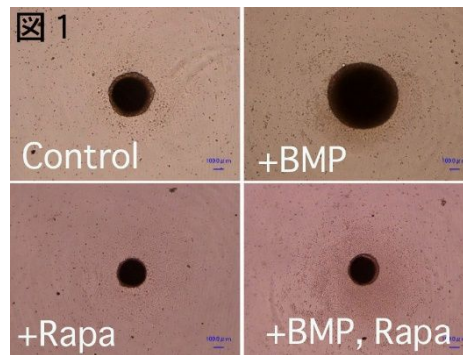
マウスの骨芽細胞系株細胞(C2C12)を細胞培養し、細胞分化の指標としてアルカリホスファターゼ(ALP)活性を測定し、石灰化の指標としてカルシウムを定量した。

## 4. 研究成果

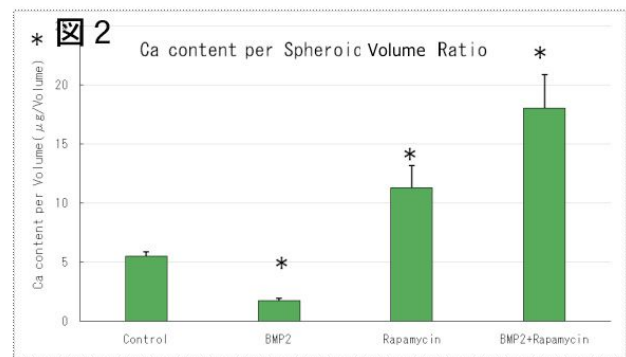
### (1) 歯の細胞に対するラパマイシンの作用

ブタ歯髓由来細胞(PPU-7)は、BMPを加えるとコントロールに比べ大きな細胞塊細胞塊

(spheroid)を形成する。ラパマイシンを加えると BMP によるこの増殖は完全に抑制される<図 1 左>。石灰化した中心部を取り巻く細胞層は、BMP 投与でコントロールよりさらに厚くなり、ラパマイシンを追加すると非常に薄くなる<図 1 右>。



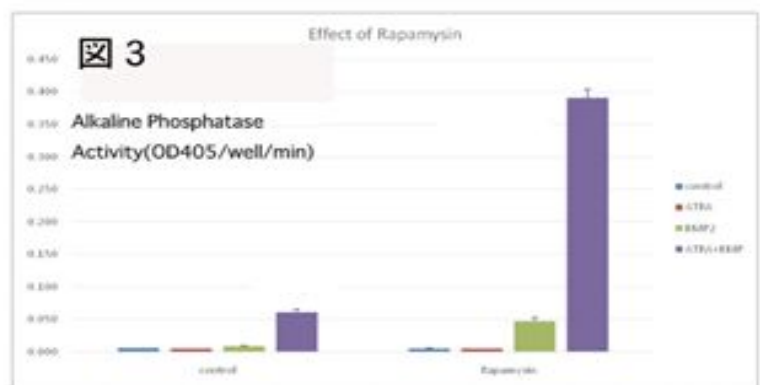
形成された細胞塊の体積あたりのカルシウム含有量は、BMP とラパマイシンを加えたものが一番高く、次にラパマイシンのみを加えたものであった。BMP のみを加えたものはカルシウムの全量は増加するが、コントロールより体積あたりのカルシウム含有量は減少していた。この結果は BMP により細胞増殖が促進し、ラパマイシンで増殖が抑制されると同時に、石灰化が促進することを示唆している<図 2 >。



マウス歯胚の器官培養を用いた実験でもラパマイシンの投与で石灰化度の高い、小さな歯が形成された。この結果は PPU-7 の実験結果と類似している。

## (2) C2C12 を用いた骨芽細胞分化の研究

マウス筋由来の骨芽細胞系株細胞(C2C12)に BMP とレチノイン酸を加えると、分化マーカーの ALP 活性が上昇した<図 3 左、紫の棒グラフ>、さらにラパマイシンを加えると ALP 活性は著しく上昇した<図 3 右、紫の棒グラフ>。



BMP の細胞内シグナル伝達物質である smad を阻害すると ALP 活性は抑制された。ラパマイシンは細胞内の mTOR を阻害し細胞増殖を抑制することが知られている。本実験でも増殖抑制効果は認められたが、BMP との相乗効果で ALP 活性を上昇させ、分化を促進するシグナル伝達経路の詳細はいまだ不明である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	寺島 達夫  (Terashima Tatsuo)  (20114770)	鶴見大学・歯学部・非常勤講師   (32710)	
研究分担者	山本 竜司  (Yamamoto Ryuji)  (20410053)	鶴見大学・歯学部・講師   (32710)	
研究分担者	唐木田 丈夫  (Karakida Takeo)  (40367305)	鶴見大学・歯学部・准教授   (32710)	
研究分担者	大熊 理紗子  (Chiba-Okuma Risako)  (50804887)	鶴見大学・歯学部・学部助手   (32710)	
研究分担者	斉藤 まり  (Saito Mari)  (60739332)	鶴見大学・歯学部・助教   (32710)	

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
---------	---------