

機関番号：15401  
 研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20390522  
 研究課題名(和文) バイオミネラリゼーションモデルを用いたエナメル質形成不全症(AI)発症機構の解明  
 研究課題名(英文) Elucidation of onset mechanism of amelogenesis imperfecta (AI) using a biomineralization model  
 研究代表者  
 谷本 幸太郎 (KOTARO TANIMOTO)  
 広島大学・病院・講師  
 研究者番号：20322240

## 研究成果の概要(和文)：

本研究の目的は、エナメル蛋白であるアメロゲニンの変異がエナメル質形成機構に及ぼす影響についてリコンビナント蛋白を用いて検討し、エナメル質形成不全症の発症機序の解明を行うことである。

ヒト正常完全長アメロゲニンと、ヒト変異完全長アメロゲニン(P41T)のリコンビナント蛋白をそれぞれ作製した。ヒト正常完全長アメロゲニンとヒト変異完全長アメロゲニンとは、中性溶液中(pH 7.4)における凝集能に相違が認められた。また、ヒトリコンビナントMMP20を作製し、これによるヒト完全長アメロゲニンの分解様相を調べたところ、ヒト変異完全長アメロゲニンは、ヒト正常完全長アメロゲニンに比較してMMP20による分解速度が遅くなること示された。

以上のことから、アメロゲニンの変異が歯の形成期においてエナメル質の構造の異常を生じさせる可能性が強く示唆された。

## 研究成果の概要(英文)：

The purpose of this study was to investigate the effects of mutation of amelogenin, an enamel matrix protein, on the enamel crystal formation, and to elucidate of onset mechanism of amelogenesis imperfecta (AI).

Wild-type recombinant human full-length amelogenin and mutated recombinant human full-length amelogenin (P41T) were synthesized. There was a difference in the aggregation ability in solution at neutral pH (pH 7.4) between the wild-type and mutated full-length amelogenins. In addition, recombinant human MMP20 was synthesized, and the digestion of recombinant human full-length amelogenin by the MMP20 was investigated. The digestion of mutated recombinant human full-length amelogenin was delayed as compared with that in wild-type amelogenin.

From these results, it was strongly suggested that a mutation of amelogenin may induce the abnormality of enamel structure during tooth formation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	7,400,000	2,220,000	9,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：エナメル蛋白、バイオミネラリゼーション、エナメル質形成不全症、アメロゲニン、ヒドロキシアパタイト

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子の変異により、エナメル質形成不全症が発症することが知られていたが、詳細な発症機構については不明であった。すなわち、エナメル質形成に関わる遺伝子は多数であり、また様々な変異が単独あるいは複合的に生じているため、病因究明が困難であった。そこで、本研究では、エナメル蛋白の中でも特に多く産生され、ハイドロキシアパタイト結晶生成に重要な役割を果たしているアメロゲニン蛋白の変異に着目した。この変異は、ただ一つのアミノ酸の置換により、エナメル質形成に異常を生じさせるものであり、変異アメロゲニン蛋白の機能を詳細に解析することにより、エナメル質形成不全症の発症メカニズムの一部が解明されると考えられた。

## 2. 研究の目的

エナメル蛋白であるアメロゲニンの変異がエナメル質形成機構に及ぼす影響について、アメロゲニンおよびその特異的分解酵素であるMMP20のリコンビナント蛋白を用いて検討し、エナメル質形成不全症の発症機序の解明を行うこと。

## 3. 研究の方法

ヒト完全長アメロゲニンおよびMMP20のリコンビナント蛋白を作製し、機能解析を行う。変異型ヒト完全長アメロゲニンを正常型と比較することにより、エナメル質形成機構への影響を明らかにする。アメロゲニンを中性水溶液中に拡散させ、凝集状態について原子間力顕微鏡を用いて観察した。また、アメロゲニン溶液中にMMP20を添加し、一定時間分解させた後に、アメロゲニン断片の発現様相をSDS-PAGEおよび質量分析装置(mass spectrometry; MS)を用いて解析した。

## 4. 研究成果

アメロゲニンの中性溶液中における凝集能は、変異アメロゲニンにおいて亢進することが明らかとなった。さらに、MMP20による分解が変異アメロゲニンにおいて遅延することが明らかになった。これらの結果から、

変異アメロゲニンでは、凝集能が高く、MMP20による分解も正常型に比較して受けにくくなることから、エナメル質形成時においてハイドロキシアパタイト表面に蛋白が長期間滞留し、その結果、結晶形成不全が惹起されると考えられた。本研究により、エナメル蛋白アメロゲニンおよびその分解酵素であるMMP20をそれぞれリコンビナント蛋白として精製し、これらの相互的な機能解析を行うことが有用であることが示された。これにより、アメロゲニンの遺伝子変異がエナメル質形成に影響を与え、エナメル質形成不全症を発症させるメカニズムが示唆された。

## 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6件)

1. Kunimatsu R, Tanimoto K, Tanne Y, Kamiya T, Ohkuma S, Huang YC, Yoshimi Y, Miyauchi M, Takata T, Tanne K. Amelogenin enhances the proliferation of cementoblast lineage cells, J Periodontol, 査読有, 2011, in press.

2. Huang YC, Tanimoto K, Tanne Y, Kamiya T, Kunimatsu R, Michida M, Yoshioka M, Yoshimi Y, Kato Y, Tanne K: Effects of human full-length amelogenin on the proliferation of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. Cell Tissue Res. 342(2), 査読有, 2010, 205-12.

3. Zhu L, Tanimoto K, Le T, DenBesten PK, Li W: Functional roles of prolines at amelogenin C terminal during tooth enamel formation. Cells Tissues Organs. 189(1-4), 査読有, 2009, 203-6.

4. Zhu L, Tanimoto K, Robinsin S, Chen J, Witkowska E, Hall S, Le T, Denbesten PK, Li W: Comparative properties of recombinant human and bovine matrix metalloproteinase-20, Arch Oral Biol. 53(8),

査読有, 2008, 785-90.

5. Tanimoto K, Le T, Zhu L, Chen J, Featherstone JD, Li W, DenBesten P: Effects of fluoride on the interactions between amelogenin and apatite crystals. *J Dent Res*. 87(1), 査読有, 2008, 39-44.

6. Tanimoto K, Le T, Zhu L, Witkowska HE, Robinson S, Hall S, Hwang P, Denbesten P, Li W: Reduced amelogenin-MMP20 interactions in amelogenesis imperfecta. *J Dent Res*. 87(5), 査読有, 2008, 451-5.

[学会発表] (計 10 件)

1. 國松 亮, 谷本幸太郎, 丹根由起, 神谷貴志, 大熊 暁, 岩渕泰憲, 黄 郁芩, 吉岡基子, 尾崎徳継, 笹本智子, 道田将彦, 廣瀬尚人, 光吉智美, 吉見友希, 丹根一夫, 歯周組織構成細胞に対するヒトリコンビナントアメロジェニンの効果とシグナル伝達機構の解明, 第 69 回日本矯正歯科学会大会, 2010, 27-29 Sep, Yokohama

2. Huang YC, Tanimoto K, Tanne Y, Kamiya T, Inubushi T, Yoshioka M, Michida M, Sasamoto T, Yoshimi Y, Iwabuchi Y, Tanne K, Effects of amelogenin on the proliferation of mesenchymal stem cells, The 88<sup>th</sup> International Association for Dental Research, 2010, July 14-17, Barcelona, Spain

3. Huang YC, Tanimoto K, Tanne Y, Kamiya T, Ohkuma S, Inubushi T, Kunimatsu R, Yoshioka M, Michida M, Mitsuyoshi T, Yoshimi Y, Kato Y, Tanne K, Amelogenin Modulates the Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells through the MAPK-ERK Pathway, The 2<sup>nd</sup> International Conference on Orthodontic Treatment, 3-4, Apr 2010, Hiroshima

4. Kunimatsu R, Tanimoto K, Tanne Y, Kamiya T, Ohkuma S, Inubushi T, Huang YC, Yoshioka M, Hirose N, Mitsuyoshi T, Yoshimi Y, Miyauchi M, Takata T, Tanne K, Effects of recombinant human amelogenin

on the proliferation of cementoblasts and periodontal ligament cells, The International Workshop on BioDental Education & Research 2010, 11-12, Feb 2010, Hiroshima

5. 国松 亮, 谷本幸太郎, 田中伸明, 丹根由起, 神谷貴志, 大熊 暁, 犬伏俊博, 岩渕泰憲, Huang Yu-Ching, 吉岡基子, 尾崎徳継, 笹本智子, 道田将彦, 光吉智美, 丹根一夫, ヒト歯根膜細胞代謝調節機構に対するヒトリコンビナントアメロジェニンの効果, 第 68 回日本矯正歯科学会大会, 17-18, Nov 2009, 福岡

6. Kunimatsu R, Tanimoto K, Tanaka N, Tanne Y, Kamiya T, Ohkuma S, Inubushi T, Yu-Ching H, Yoshioka M, Hirose N, Mitsuyoshi T, Yoshimi Y, Miyauchi M, Takata T, Tanne K, Effects of recombinant human amelogenin on the proliferation of cementoblasts and periodontal ligament cells, 3<sup>rd</sup> Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 7-8, Nov 2009, Hiroshima

7. 国松亮, 谷本幸太郎, 田中伸明, 丹根由起, 神谷貴志, 大熊暁, Huang Yu-ching, 吉岡基子, 丹根一夫, ヒトセメント芽細胞の代謝に対するヒトリコンビナントアメロジェニンの影響, 第 67 回日本矯正歯科学会学術大会, 16-18, Sep 2009, 千葉市

8. 国松 亮, 谷本幸太郎, 田中伸明, 丹根由起, 神谷貴志, 大熊 暁, 黄 郁芩, 吉岡基子, 光吉智美, 宮内睦美, 高田 隆, 丹根一夫, アメロジェニンのセメント質代謝調節機構への影響, 第 42 回広島大学歯学会, 20, Jun 2009, 広島市

9. Huang YC, Tanimoto K, Tanaka N, Tanne Y, Kamiya T, Kunimatsu R, Yoshioka M, Michida M, Kato Y, Tanne K, Effects of Amelogenin on the Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells, Workshop on Bio-Dental Education and Research in Hiroshima, 7-8, Feb 2009, Hiroshima

10. Li W, Tanimoto K, Zhu L, Le T, Habelitz S, DenBesten PK, Amelogenesis Imperfecta Is Related to Decreased Amelogenin-MMP20 Interactions, 86th General Session & Exhibition of the IADR, 2-5, Jul 2008, Toronto, Canada

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：エナメル質再生液及びエナメル質再生キット

発明者：谷本幸太郎、丹根一夫、国松 亮、神谷貴志

権利者：広島大学

種類：特許

番号：特願 2011-027923

出願年月日：2011 年 2 月 10 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷本 幸太郎 (TANIMOTO KOTARO)

広島大学・病院・講師

研究者番号：20322240

### (2) 研究分担者

丹根 一夫 (Tanne Kazuo)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30159032

田中 伸明 (NOBUAKI TANAKA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90397869

(H20→H21)

### (3) 連携研究者

田中 栄二 (Tanaka Eiji)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：40273693