

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791607

研究課題名（和文） アメロティンの機能解析と歯周組織再生療法への応用

研究課題名（英文） Functional analysis of amelotin and its application for periodontal regeneration.

研究代表者

岩崎 剣吾（IWASAKI KENGO）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：40401351

研究成果の概要（和文）：マウスアメロティンをマウス骨芽細胞株で強制発現させ骨芽細胞への分化誘導を起こしたところ、石灰化結節の形成が促進され、一方で分化関連遺伝子の発現には大きな変化をもたらさないことが確認された。マウスアメロティン抗体を作成し、アメロティンとの石灰化結節の結合の検討を免疫電顕で行った結果、アメロティンがカルシウムおよびリンへの結合を示す傾向が得られた。これらの結果はアメロティンが骨形成に促進的に関与することを示しており、歯周組織再生への応用の可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：Mouse amelotin gene was over-expressed in mouse osteoblastic cell line and osteoblastic differentiation was induced. We observed enhanced mineralized nodule formation, whereas osteoblastic differentiation marker gene expressions were not changed. In immuno-electron microscopic observation, we also found the tendency of amelotin to bind to calcium and phosphate when the cells were stimulated to form mineralized nodule. These data suggested the capacity of amelotin to enhance bone formation and possibility of its application for periodontal regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：再生、歯周組織

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病はグラム陰性菌を原因とする慢性炎症性疾患であり、進行した歯周病では高度

の骨吸収により歯を喪失する。進行した歯周炎では歯槽骨、歯根膜、セメント質からなる歯の付着器官が失われ、これらの組織の再生

が真の歯周治療の目的と考えられる。これまで、失われた歯周組織を再生する多くの試みが試されてきた。そのうち、現在、歯周組織再生を達成する方法として Guided Tissue Regeneration(GTR)法、およびエナメルマトリクスデリバティブの使用が臨床的に行われ、組織学的にも臨床的にも部分的な歯周組織の再生が達成されることが示されている。GTR 法では欠損部への上皮の深部増殖を抑制し欠損内の幹細胞を安定化させることにより歯周組織を再生させると考えられ、一方、エナメルマトリクスデリバティブはエナメル形成期にエナメル芽細胞から分泌される蛋白が幹細胞のセメント芽細胞分化を促進することより 歯周組織の再生を誘導すると考えられている。

エナメルマトリクス蛋白はエナメル質を形成するエナメル芽細胞から分泌される蛋白であり、エナメル質の形成に重要な役割を果たすことが知られている。我々は、マウス成熟期エナメル形成に特異的に発現する蛋白として、10 日齢マウス切歯のエナメル芽細胞より新規エナメルマトリクス蛋白を同定し、アメロチンと名付けた。アメロチンはマウスのエナメル質形成成熟期にエナメル芽細胞に特異的に発現し、細胞外へ分泌される蛋白であることが明らかとなった。生体で最も高度に石灰化した組織であるエナメル質の成熟期に発現することより、石灰化に何からの役割を果たすものと考えられるが、アメロチンの機能については全くわかっていない

歯周組織再生治療にエナメルマトリクス蛋白が応用され臨床的な再生が見られること、新規エナメル蛋白のアメロチンが石灰化に関与している可能性が示唆されることより、アメロチンが歯周組織再生能を有する可能性があるかもしれないという仮説を

立てた。

## 2. 研究の目的

歯周組織由来の細胞を用いてアメロチンの石灰化における作用を検討し、さらにそのメカニズムを検索し、歯周組織再生への有用性を検討すること。

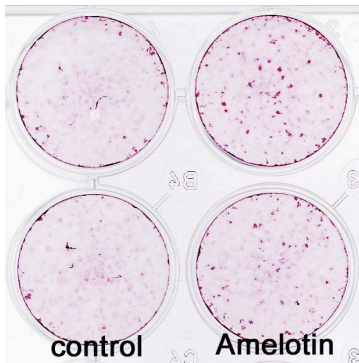
## 3. 研究の方法

まず、アメロチンの歯周組織細胞への影響を検討するため、アメロチン・リコンビナントタンパクおよび抗体を作製し、そのタンパクを骨芽細胞、歯根膜細胞や上皮細胞に作用させアメロチンの作用を検討した。また、アメロチン発現ベクターを作成し、遺伝子導入によりアメロチンを培養細胞に強制発現させ、石灰化や細胞増殖機能への影響を検討した。走査型電子顕微鏡および免疫電顕を用いて、マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 の石灰化物におけるアメロチンの局在を検討した。さらにここで作製したタンパクをラットでの実験的歯周組織欠損にも用いて再生療法としての有用性の検討を行った。

## 4. 研究成果

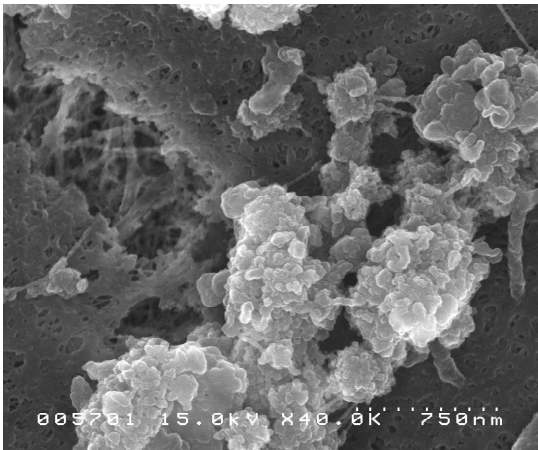
アメロチン抗体・発現ベクター・リコンビナント蛋白の作成を行った。

まず、作成した発現ベクターを用いて、アメロチンをマウス骨芽細胞株 MC3T3 - E1 に遺伝子導入し、強制的に発現させた後、細胞にアスコルビン酸・デキサメタゾン・beta グリセロリン酸を用いて石灰化誘導を行った。分化誘導後 2 週間で石灰化結節の形成が観察され、石灰化結節の形成がアメロチン遺伝子強制発現群においてコントロール群と比較して促進する結果が得られた。(図 1)

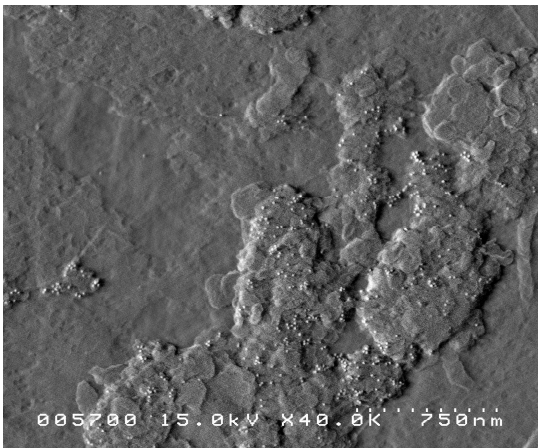


(図1)

また、石灰化結節におけるアメロティンの局在を走査型電子顕微鏡を用いて免疫電顕を行い検討したところ、石灰化沈着物へのアメロティンの沈着像が観察された。(図2、図3)



(図2、MC3T3による石灰化物 SEM 像)

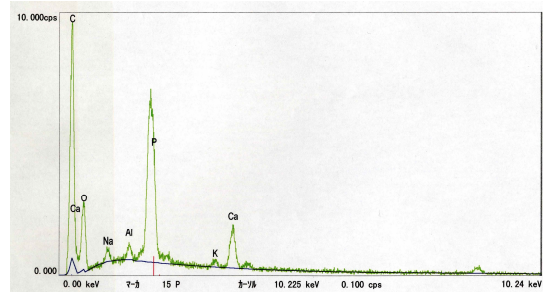


(図3：MC3T3による石灰化物におけるアメロティンの局在)

さらにエネルギー分散型 X 線分析装置(EDS)

を用いてアメロティンの結合部位の検討をしたところ、アメロティンがカルシウムおよびリンへの結合を示す傾向が得られた。

(図4)



(図4：アメロティンと石灰化物の結合)

これらの結果はアメロティンが骨芽細胞の石灰化において促進的に影響を及ぼすことを示している。

現在、リコンビナントアメロティン蛋白を用いて、実験的な歯周炎モデルへの応用による歯周組織再生能の検討を実行中である。

本研究により得られた結果は、新規エナメル蛋白であるアメロティンが骨形成に促進的に関与することを示しており、歯周組織再生への応用の可能性を示唆するものと考えられる。

## 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)

### 〔雑誌論文〕(計1件)

Feghali K, Iwasaki K, Tanaka K, Komaki M, Machigashira M, Ishikawa I, Izumi Y. Human gingival fibroblasts release high-mobility group box-1 protein through active and passive pathways. Oral Microbiol Immunol. 査読有 2009年 24巻 292-228

### 〔学会発表〕(計3件)

TANAKA K, IWASAKI K, FEGHALI K, YASHIRO R, IZUMI Y. Characteristics of periodontal ligament cells isolated using different methods. International Association of Dental Research, 87<sup>th</sup> General Session.

2009.4.3. Miami, Florida, USA.

田中 敬子, 岩崎 剣吾, 矢代 麗子, 石川 烈, 和泉 雄一 細胞移植に有用なヒト歯根膜細胞の採取法に関する基礎的検討 第8回日本再生医療学会総会 2009.3.6. 東京

FEGHALI K, IWASAKI K, TANAKA K, IZUMI Y. Human gingival fibroblasts release HMGB1 after stimulation with LPS. International Association of Dental Research, 86<sup>th</sup> General Session. 2008.7.3. Toronto, Ontario, Canada.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩崎 剣吾 (KENGO IWASAKI)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40401351

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし