

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10213

研究課題名(和文) マラッセ遺残上皮細胞の機能解析

研究課題名(英文) Effect of extracellular matrix protein of epithelial rests of Malassez supernatants

研究代表者

齊藤 正人 (SAITOH, Masato)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：50337036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯を支える歯周組織は、歯肉、歯槽骨、セメント質、歯根膜から構成されている。歯根膜は、線維芽細胞、骨芽細胞、セメント芽細胞などの間葉系細胞と、歯原性上皮である外胚葉系由来細胞のマラッセ上皮遺残細胞(epithelial rest of Malassez: ERM)が存在している。ERMは、歯原性上皮由来で歯根形成後も終始存在し続ける希有な特徴を持ち、エナメル質形成に關与するエナメルマトリックスプロテインのアメロジェニンやアメロプラスチンを発現している。本研究では、マラッセ上皮遺残細胞の培養上清をマウス歯胚に添加することによりエナメル質ハイドロキシアパタイトを誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、エナメル質の形成に関わっているタンパク質は明らかになっているものの、生体内での形成のため不明な点が多かった。今回我々の研究で、培養歯胚にエナメル質形成タンパクの一つであるアメロジェニンを添加することにより、エナメル質ハイドロキシアパタイトの形成を誘導することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The periodontal tissue supporting the teeth is composed of gingiva, alveolar bone, cementum, and periodontal ligament. The periodontal ligament contains mesenchymal cells such as fibroblasts, osteoblasts, and cementoblasts, as well as epithelial rest of Malassez (ERM) cells, which are derived from the odontogenic epithelium of the ectoderm, and are unique in that they remain present throughout root formation. ERMs are derived from the odontogenic epithelium and express the enamel matrix proteins amelogenin and ameloblastin, which are involved in enamel formation. In this study that the addition of culture supernatant of Malasse epithelial remnant cells to mouse tooth embryos induces enamel hydroxyapatite.

研究分野：小児歯科

キーワード：マラッセ上皮遺残細胞 アメロジェニン

1. 研究開始当初の背景

歯を支える歯周組織は、歯肉、歯槽骨、セメント質、歯根膜から構成されている。歯根膜は、線維芽細胞、骨芽細胞、セメント芽細胞などの間葉系細胞と、歯原性上皮である外胚葉系由来細胞のマラッセ上皮遺残細胞 (epithelial rest of Malassez: ERM) が存在している。ERM は、歯原性上皮由来で歯根形成後も終始存在し続ける希有な特徴を持ち、エナメル質形成に関与するエナメルマトリックスプロテイン (EMP) の Amelogenin や Ameloblastin を発現している。エナメル質 HAP 再生を目的とする研究は、歯胚のエナメル質の形成を模倣し amelogenin が多く研究されている。Amelogenin 欠損マウスのエナメル質の厚さは正常マウスの 10~20%程度、無秩序な結晶構造、低石灰化および歯の色調異常が認められ、エナメル質の HAP 形成において Amelogenin が必要不可欠であることを示唆している。

Amelogenin 遺伝子は脊椎動物の種を越えて高度に保存されており、エナメル質形成に重要な役割を果たしている。構造は N 末端側に疎水性領域、C 末端側に親水性領域をもち、最も研究が進んでいるマウス amelogenin では、すべてのエクソンが翻訳されると 194 アミノ酸からなる。しかし、前駆体 mRNA に由来する 16 以上の選択的スプライシングバリエーションが存在し、代表的な選択的スプライシングフォームとして、エクソン 1、エクソン 4 が欠失した M180 と、エクソン 4 とエクソン 6 の大半が欠失した M59 (leucine-rich amelogenin peptide: LRAP) が知られている。エナメル質の厚さ、および結晶構造形成において Amelogenin KO マウスは野生型に比較し、エナメル質の厚さが 10~20%減少し結晶構造が不規則になる。Amelogenin KO マウスにトランスジェニック (Tg) -LRAP マウスを交配させても子孫のエナメル質に変化はないものの、Tg-M180 マウスと交配した子孫はエナメル質の厚さの増加および結晶構造が規則的になり、さらに Tg-LRAP マウスを交配させることでエナメル質の厚さおよび結晶構造が野生型と類似することから、M180 と LRAP が相互作用する可能性が報告されている。Amelogenin は MMP-20 および KLK4 により分解されるが、分解物の代表的なものに 45 アミノ酸のチロシンリッチアメロゲニンペプチド (tyrosine-rich amelogenin peptide: TRAP) がある (Wyganowska-Świątkowska et al., 2015)。TRAP に点変異をもつマウスでは、エナメル質の形成不全が生じることが報告されており、TLAP もエナメル質の形成に関与しているとみられるが、詳細は不明である。これまでに、大腸菌や酵母、ウイルス発現系など様々な方法で組み換え Amelogenin が生産されているが、リン酸化の関与などの不確実性があるため、安全性に問題がある。そこで、より信頼性が高く、安全な Amlex を生産するシステムを構築する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、安全性に配慮が必要な Amelogenin の全長またはスプライスフォームの組換えではなく、Amelogenin を発現する ERM から ERM Conditional Medium (CM) を用いて歯胚の未熟エナメル質の結晶化を促進することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 細胞培養

本研究で使用した ERM は、Islam らが過去に報告した細胞を使用した。

ERM は、KGM に KGM-TM Bullet Kit を添加した Keratinocyte Cell Basal Medium (KBM) を用いて培養した。

2) ERM の特性解析

ERM から通法に従い RNA を採取し、cDNA を作製した。作成した cDNA は、Amelogenin、Ameloblastin、KLK4、MMP-20 および GAPDH の特異的プライマーにより発現を確認した。なおコントロールにはクローニング前の CRUDE ERM、サンプルには Amelogenin 高発現を認める ERM-2 を用いた。

3) マウス歯胚の採取

マウス歯胚は、妊娠中の雌 C57BL/6J マウスを購入し、個々のケージで飼育し、生後 3 日目のマウスの下顎第一大臼歯から歯胚を使用した。

4) ERM 培養上清の作製

ERM-2 細胞およびブタ歯肉上皮細胞 (GE) を KGM で培養した。GE はネガティブコントロールとして使用した。KBM による 4 日間の細胞培養の後、上清を回収しフィルター濾過した後、この上清を ERM CM と GE CM として使用した。

5) 歯胚の器官培養

歯胚の器官培養は、ERM CM と GE CM として使用し 1 日、3 日、7 日、14 日間行った。上清は 2 日ごとに交換した。器官培養した歯胚は、ピペッティングによりエナメルと歯胚を分離し、走査型電子顕微鏡 (SEM) にて表層を観察した。

6) si エナメルマトリックスプロテインの導入および si-ERM CM の作製

siRNA は、si-Amelogenin、si-ameloblastin、si-KLK4、si-MMP-20 を si-SNIPER により作成し使用した。トランスフェクション後、培地を KBM に交換し 48 時間培養したものを si-EMPs ERM2 CM として使用した。

7) si-EMPs CM を用いた器官培養歯胚の SEM 解析

C57BL/6J マウス下顎第一大臼歯の歯胚を si-EMPs ERM2 CM を使用し 1 日、3 日、7 日、14 日間行った。上清は 2 日ごとに交換した。器官培養した歯胚は、ピペッティングによりエナメルと歯胚

を分離し、走査型電子顕微鏡 (SEM) にて表層を観察した。

4 . 研究成果

1)ERM の特性解析

CRUDE ERM と ERM-2 の EMP 発現量を qPCR で比較したところ、Amelogenin は 2 倍、Ameloblastin は 4 倍、KLK4 と MMP-20 は 1.2 倍となり有意に高い発現量を示した。

2) ERM-2 CM と GE CM による歯胚の器官培養

器官培養 1 日目、ERM-2 CM を用いた歯胚は、GE CM に比べ、エナメル質表面に針状構造の集合体からなる柱状構造の沈着が認められた。一方、GE CM では、エナメル質全体に柱状構造の沈着は見られなかった。器官培養 3 日目と 7 日目に、ERM-2 CM で培養した歯胚は、柱状構造の伸長が密になった。ERM-2 CM で培養 14 日目には、柱状構造が密になり集合し、HAP 様の六角形の柱状構造を形成した。一方、GE CM では明確な柱状構造は観察されなかった。

3) si-ERM2 CM による歯胚の器官培養

Si-EMP を導入した ERM-2 と Si-Negative Control それぞれの CM で 1、3、7、14 日間培養し、SEM で観察した。Si-negative コントロール ERM CM で 1 日目に培養した歯胚は、エナメル質表面に柱状構造の沈着を認めた。Si-negative コントロール ERM-2 CM で 3 日目と 7 日目に培養した歯胚は、柱状構造の伸長が密になった。Si-negative コントロール ERM-2 CM で 14 日間培養することにより、柱状構造はより密になり HAP 様の六角形の柱状構造を形成して集合した。一方、各 si-EMPs ERM-2 CM では、明確な柱状構造は観察されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mashima Izumi, Theodorea Citra F., Djais Ariadna A., Kunihiro Tadao, Kawamura Yoshiaki, Otomo Maiko, Saitoh Masato, Tamai Riyoko, Kiyoura Yusuke	4. 巻 71
2. 論文標題 Veillonella nakazawae sp. nov., an anaerobic Gram-negative coccus isolated from the oral cavity of Japanese children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 33263509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.004583	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Neopane Puja, Kurashige Yoshihito, Yoshida Koki, Uehara Osamu, Paudel Durga, Morikawa Tetsuro, Sato Jun, Saitoh Masato, Abiko Yoshihiro	4. 巻 44
2. 論文標題 Involvement of RNase 7 in the malignant potential of oral squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 1216 ~ 1223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2020.7678	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 松岡 陽子、福本 敏、山田 亜矢、倉重 圭史、毛利 志乃、梶 美奈子、片山 博道、伊藤 誠、芝田 憲治、 藁輪 映里佳、齊藤 正人	4. 巻 41
2. 論文標題 障害者歯科診療に携わる指導歯科衛生士および認定歯科衛生士と一般歯科衛生士間における研修ガイドラ イン達成状況の比較	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本障害者歯科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 277 ~ 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14958/jjsdh.41.277	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 藁輪 映里佳、岡田 悠之介、福田 敦史、大友 麻衣子、梶 美奈子、倉重 圭史、松岡 紘史、安彦 善裕、 齊藤 正人	4. 巻 35
2. 論文標題 不安階層表を用いることで歯科治療が可能になった歯科恐怖症の1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯科心身医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 31 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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	谷村 明彦 (TANIMURA Akihiko) (70217149)	北海道医療大学・歯学部・教授 (30110)	
研究分担者	安彦 善裕 (ABIKO Yoshihiro) (90260819)	北海道医療大学・歯学部・教授 (30110)	

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