

平成 23 年 5 月 25 日現在

機関番号：33602
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009 ～ 2010
 課題番号：21792039
 研究課題名（和文） 無機ポリリン酸ナトリウムを用いた歯槽骨再生治療薬の開発
 研究課題名（英文） Development of alveolar bone is treatment that uses inorganic Polyphosphate
 研究代表者
 高田 匡基（MASAKI TAKADA）
 松本歯科大学 歯学部 助手
 研究者番号：00507684

研究成果の概要（和文）：

ポリリン酸の軟骨細胞分化への作用を検討した。その結果、ポリリン酸によって軟骨細胞前駆細胞は軟骨細胞形質を獲得することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The present study was aimed to clarify the effects of inorganic polyphosphate on the chondrogenic precursor cells and demonstrated the involvement of inorganic polyphosphate in the acquisition of chondrogenic phenotype in chondrogenic precursor cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：歯科

科研費の分科・細目：若手研究（B）

キーワード：ポリリン酸，リン代謝，ATDC5，軟骨形成，骨形成，軟骨分化

1. 研究開始当初の背景

骨形成や骨基質の石灰化におけるリン代謝機構を研究し、ポリリン酸が石灰化におけるリンの供給源となること、また、動物実験において骨形成能を有することを示唆するデータを得たこのことからポリリン酸は歯槽骨再生促進薬としての条件を有することが考えられるが、ポリリン酸の骨形成にかかわる機構は明らかではない。そこで本研究では、ポリリン酸の歯周組織構成細胞に対する作用とそのメカニズムを明らかにすると

もに、新しい歯槽骨再生促進薬としての有用性について検討する。

原始エネルギーとされるポリリン酸は、オルソリン酸(P04)が直鎖状に高エネルギーリン酸結合で重合した生体高分子である。単純な構造でありながら、ATP と同等のエネルギーを持つとされる。嫌気性菌では、ATP の代わりにポリリン酸を基質として用いる酵素（進化途上酵素：Exo-Poly(P)ase）が存在していることが明らかにされ、微生物におけるポリリン酸の生理的役割が明らかにされつ

つある。しかし、哺乳動物では、ATPなどの三リン酸の研究が推進されてきたものの、ポリリン酸については、その精製法や鎖長の分割法が明らかにされていなかったことから、ポリリン酸の生物学的役割については未だ明らかにされていない。2000年に柴らは、分割ポリリン酸の精製法とポリリン酸を基質とするExo-Poly(P)ase活性が線維芽細胞に存在することを明らかにした。また、Schröderらは、血清、骨芽細胞、歯髄および歯肉線維芽細胞にその酵素活性が存在することを報告しNocitiらはセメント芽細胞が、リン酸に対して極めて感受性が高いことを報告した。すなわち、リン酸が重合した生体高分子であるポリリン酸が、歯と骨の形成に重要な役割を果たしていることが推測される。

国内外の研究では、ポリリン酸は、1) 嫌気条件下で合成される、2) 転写因子の転写活性を調節する、3) Ca^{++} をトラップする、4) Ca^{++} と複合体を形成して細胞膜上のポンプによって輸送される。などが明らかにされているが、ポリリン酸の骨芽細胞、破骨細胞、歯髄細胞、歯根膜細胞への作用と細胞内シグナル伝達機構についての研究報告はない。本研究は、国内外においてもポリリン酸の生理的作用を明らかにする初めての研究となる。

2. 研究の目的

大学発ベンチャー創出推進事業（委託研究：科学技術振興機構）において、「医薬品の臨床試験（GCP）と非臨床試験（GLP）の実施基準（1997年厚生省令第28号）」に基づいて、ポリリン酸の精製と安全性試験を行った。その研究過程において、ポリリン酸の生理的役割についての詳細な研究が必須であることが明らかとなった。そこで、鎖長の異なるポリリン酸を骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1細胞）に作用させたところ、平均鎖長60-70のポリリン酸（1mM）によって、osteopontin（OPN）、osteocalcin（OCN）およびI型collagen mRNAの発現が亢進し、石灰化物の形成がみられた。また、ポリリン酸は歯周病菌である*P. gingivalis*に対して0.1mMという低濃度で抗菌作用を示すこと、さらにポリリン酸が、歯髄より分離した線維芽細胞様細胞の増殖能とアルカリホスファターゼ活性を上昇させることを明らかにした。すなわち、ポリリン酸は抗菌作用に加え、成熟骨芽細胞や象牙芽細胞への分化促進作用し、歯・歯周組織再生促進薬としての条件を有することが示唆された。そこで本研究では、ポリリン酸の歯・歯周組織構成細胞に対する作用とそのメカニズムを明らかにするとともに、新しい歯・歯周組織再生促進薬としての有用性について検討する。

本研究では、ポリリン酸の歯・歯周組織再

生促進に加え抗菌作用を有する歯周病治療薬の開発に発展すると考えている。

ポリリン酸による歯・歯周組織再生促進メカニズムを明らかにすることを目的とし、①ポリリン酸の骨芽細胞、破骨細胞、歯髄細胞、歯根膜細胞への作用、②ポリリン酸に応答する遺伝子の発現と細胞内シグナル伝達機構の解明、③*in vivo*における歯・歯周組織再生促進作用、および④作用メカニズムに適した分割ポリリン酸製剤の鎖長、濃度について検討を行う。

ポリリン酸の歯・歯周組織構成細胞に対する作用として、鎖長の異なる分割ポリリン酸を用いるという特色がある。この分割ポリリン酸は臨床応用のための原体規格を用いることから、研究結果は直接臨床応用への基礎データとなる。ポリリン酸は鎖長の違いによって細胞内シグナル伝達機構が異なる可能性が高く、分割ポリリン酸の鎖長の違いで適用を選択するという独創性がある

3. 研究の方法

本研究は、ポリリン酸の骨形成作用にかかわるメカニズムを解明し、ポリリン酸を用いた歯槽骨再生薬剤を開発することを目的とし、マウスより得られた培養細胞にポリリン酸を作用させ、マイクロアレイによるスクリーニングにより遺伝子の挙動を網羅的に解析したのちにポリリン酸特異的に応答する遺伝子を同定する。続いて*in vivo*での発現解析、機能解析を行い、ポリリン酸の生体適用法を検討する。①ポリリン酸の骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞、歯髄細胞、歯根膜細胞への作用、②ポリリン酸に応答する遺伝子の発現と細胞内シグナル伝達分子の同定を行う。分割ポリリン酸は、柴らの方法で精製する。本研究における分割ポリリン酸の精製、供与ならびに利用については既に承諾済みである。

<ポリリン酸の骨芽細胞、軟骨細胞、破骨細胞、歯髄細胞、歯根膜細胞への作用の検討>細胞の採取と培養：松本歯科大学動物実験規程に従ってマウスを処理し、無菌的に組織を採取する。Balb/cマウスより採取した組織より各細胞を採取し、10%牛胎児血清添加 α -MEM培地を用いて培養する。骨芽細胞として頭蓋冠骨芽細胞をGallagherらの方法で分離培養する。破骨細胞は骨髄細胞と頭蓋冠骨芽細胞の共存培養系、歯髄細胞と歯根膜細胞はExplant Culture法で培養する。組織よりoutgrowthした細胞は分散後、分化誘導する。

①分割ポリリン酸の細胞増殖、分化および機能に対する作用の検討：分割ポリリン酸を0~2mM（添加可能な濃度）で添加し、細胞増殖（MTSおよびMTT assay）、前駆細胞の成熟細胞への分化および機能について

検討する。骨芽細胞は、0.1mMデキサメタゾン、0.05mMアスコルビン酸、10mM β-グリセロフォスフェイトを含むMSC培地を用いて培養する。骨芽細胞は、osteocalcin (OC), alkaline phosphatase (ALP), Type I collagen, receptor activator of NF-κB (RANKL)の発現を、石灰化物は、アリザリンレッド染色を施行して同定する。破骨細胞については、骨髄細胞と頭蓋骨骨芽細胞の共存培養系に活性型vitamin D3, Prostaglandin E2などの骨吸収因子を添加して培養する。破骨細胞はカルシトニンレセプターの局在とTRAP染色および象牙質片上の吸収窩形成実験(pit formation assay)で同定する。歯髄細胞は、0.1mMデキサメタゾン、0.05mMアスコルビン酸、10mM β-グリセロフォスフェイトを添加したDMEM培地を用いて培養する。象牙芽細胞の同定はdentin matrix protein (DMP)1, core binding factor β (Cbfa1), Bone sialoprotein (BSP), DMP 2, OC, ALPの発現を検討する。歯根膜細胞ではコラーゲン合成能を検討する。ポリリン酸添加と非添加の実験において、前駆細胞と成熟細胞の割合を検討する。細胞の観察には、倒立顕微鏡(ニコン: ECLIPSE TE2000)を用いる。また、前駆細胞では、ABC cassette transporterのbcrp-1/ABCG2が発現していることから、bcrp-1/ABCG2発現細胞の割合をフローサイトメトリー (FCM) で検討し、成熟細胞との比を求める。以上により分離培養した細胞の形質を明らかにし、マイクロアレイによる解析に供する。

②発現型DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現の解析ポリリン酸を作用させた骨芽細胞、破骨細胞、歯髄細胞、歯根膜線維芽細胞のmRNAを抽出する。mRNAは発現解析型DNAマイクロアレイに供する。mRNA からT7-RNA transcriptionによりdigoxigeninラベルcRNAを逆転写酵素で合成し、ターゲットcRNAを合成する。各種遺伝子を固定したマイクロアレイ上でポリリン酸処理細胞と非処理細胞から得たcRNAをハイブリダイズさせることによって、マイクロアレイ上に固定した全ての遺伝子の発現を解析する。

1) mRNA 抽出: 骨芽細胞, 破骨細胞, 歯髄細胞, 歯根膜線維芽細胞を, β-メルカプトエタノールを添加した細胞溶解液で処理し, RNeasy ミニスピンカラムを用いて高純度 total RNA を回収する。2) cRNA の蛍光ラベルとハイブリダイゼーション: Amino Allil Message Amp cRNA (Ambion 社) を用いて cRNA を合成し, 固定化されたアレイにハイブリダイズする。3) 画像処理と定量化: クラスター解析ソフトと視覚化表示ソフトは TreeView (Stanford Univ. E. M. より供与)を用い, セレラ社のデ

ータベースよりグラフィカル表示で発現を確認する。RT-PCR による発現遺伝子の同定: マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い, 高発現遺伝子を選択する。シグナルの高い遺伝子についてプローブを作製し, RT-PCR で同定する。セルトランスフェクションアレイによる遺伝子の機能解析: マイクロアレイの網羅的遺伝子発現解析から, ポリリン酸によるシグナル伝達分子の候補を明らかにするために, リバーストランスフェクションによる RNAi を行い, セルトランスフェクションアレイによってその遺伝子抑制による挙動を検討する。

4. 研究成果

これまでに、軟骨細胞前駆細胞において軟骨分化関連遺伝子が発現させ、リン酸の Transporter である, Pit-1 や, ピロリン酸の産生に関わる Exopolyphosphatase phosphodiesterase 1 (ENPP1) が早期に誘導されるとともに、基質を石灰化することを明らかにした。ポリリン酸存在下でアルカリホスファターゼ以外のリン代謝酵素の存在を示唆するデータを得ている。

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)

口腔組織培養学会誌

「In vitro 内軟骨性骨化モデルにおけるポリリン酸の石灰化促進作用」

内橋隆行, 上松隆司, 高田匡基, 秋田大輔, 丸川和也, 中澤高志, 山岡稔, 古澤清文

〔学会発表〕(計 6 件)

①高田匡基, ポリリン酸の軟骨前駆細胞に対する作用, 第 55 回日本口腔外科学会, 幕張市, 2010 年 10 月 18 日

②高田匡基, Inorganic polyphosphate accelerates mineralization in chondrogenic precursor cells, 第 88 回国際歯科研究学会, バルセロナ 2010 年 7 月 17 日

③高田匡基, ポリリン酸の軟骨前駆細胞に対する作用, 第 64 回日本口腔科学会学術集会, 札幌, 2010 年 6 月 25 日

④高田匡基, Effect of Inorganic Polyphosphate on Chondrogenic Precursor Cell Line ATDC5, 第 87 回国際歯科研究学会, マイアミ, 2009 年 4 月 2 日

⑤高田匡基, ポリリン酸は軟骨前駆細胞の分化を促進する, 第 63 回日本口腔科学会, 浜松市, 2009 年 4 月 17 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 匡基 (MASAKI TAKADA)
松本歯科大学 歯学部 助手
研究者番号：00507684

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：