

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890164

研究課題名（和文）未分化間葉系幹細胞による骨再生誘導に対応した微小環境構築への
アメロゲニンの応用研究課題名（英文）Applications of amelogenin to the induction of bone regeneration by
using mesenchymal stem cells

研究代表者

丹根 由起 (TANNE YUKI)

広島大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50526241

研究成果の概要（和文）：アメロゲニンは、LAMP-1 受容体を介して骨髄由来ヒト MSC の増殖を亢進し、その細胞内シグナリング経路として MAPK-Erk 経路の関与が証明された。さらに、骨分化誘導を開始した骨髄由来ヒト MSC において、アメロゲニンは骨分化マーカーの遺伝子発現および石灰化度を亢進することが明らかとなった。また、アメロゲニンは骨分化の促進因子として注目されている BMP-6 の発現を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：It is demonstrated that amelogenin increases the proliferation of MSCs by an interaction with LAMP1 through MAPK-ERK signaling pathway. In addition, amelogenin up-regulated the expressions of bone specific marker and mineralization activity in the osteogenic differentiation of MSCs. Amelogenin increases the expression of BMP-6, known as a promoting factor for bone differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,040,000	312,000	1,352,000
2010 年度	880,000	264,000	1,144,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,920,000	576,000	2,496,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：アメロゲニン、未分化間葉系幹細胞、骨再生治療、エナメル蛋白

1. 研究開始当初の背景

近年、幹細胞の臨床応用に向けた研究が国内外において加速し、従来の手法では治療困難であった疾患に対する新たな治療法としての期待が大きい。歯科医療領域においては、喪失した歯槽骨の修復や口蓋裂患者における顎裂閉鎖を目的として、MSC による骨再生治療の実現に向けた研究が行われてきた。一般的に、再生治療では最適な微小環境を治療部位に構築する

ことが重要な要素であることが示唆されているが、MSC による骨再生誘導においても、細胞を移植部に定着させ、再生の足場となる材料に加えて、細胞の増殖や分化を調節する生理活性物質の有効性が明らかにされている。このうち、MSC の代謝調節のための生理活性物質として、fibroblast growth factor (FGF) や bone morphogenetic protein (BMP) などが報告されているが、臨床応用のためには高度

な安全性と効果との両立が要求され、いずれも実用化に至っていない。

エナメル蛋白は、エナメル質形成期にエナメル芽細胞により特異的に産生され、無細胞性に硬組織を誘導する蛋白として認識されてきた。近年、エナメル蛋白の主成分であるアメロゲンinは歯髄細胞においても発現が報告され、細胞の増殖や石灰化の促進作用を有していることが明らかになった。また、ブタ歯胚由来のエナメル基質抽出成分はエムドゲインとして商品化され、歯周組織再生治療に臨床応用されていることから、エナメル蛋白は医薬品として既に一定の安全性と効果が実証されていることが特徴である。しかしながら、エムドゲインには蛋白質など多数の成分が混在しており、全成分が明らかにされていないことから、いずれの歯周構成細胞に対してどの成分が効果を発現しているのか不明な点が多い。とりわけ、組織再生には幹細胞が重要な役割を果たしている可能性が高いと推察されるものの、エナメル蛋白の幹細胞への影響についてほとんど明らかにされていない。

一方、本研究で用いるヒトアメロゲニンinは、リコンビナント蛋白であるため、純度が高く、ウィルス等の混入による人体への危険性はきわめて低いと考えられ、ブタ由来のエムドゲインと比較して最終的には安全性において優れていると考えられる。また、本研究により、ヒトリコンビナントアメロゲンinの細胞レベルあるいは生体に対する効果を詳細に検討することにより、安全性が高く、より効果的な適用が可能となると考えられる。これまで、ヒト歯胚の入手の機会は限定されていることに加えて、アメロゲンin蛋白はN末端側に広範な疎水領域を有し、疎水性がきわめて高いことから精製効率が悪く、これを用いた研究報告は限定されていた。応募者らの所属機関において、リコンビナントアメロゲンinの大量精製法により、細胞に対する真の効果を検証することが可能となった

ことから、骨再生治療への適用を目指した本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究の究極の目的は、リコンビナントヒトアメロゲンinのMSCの増殖および骨分化能に対する作用を解明し、これを骨再生治療に導入することである。

まず始めに、ヒトMSCにおけるLAMP-1およびCD63の発現を証明し、これらのレセプターを介したアメロゲンinの機能を検討することを目標とする。当研究科では、以前よりMSCの抽出、培養および移植実験をin vitro/in vivo両レベルで実現しており、それぞれの実験手技については確立されている。予想されるアメロゲンinの機能として、細胞増殖能の亢進あるいはMSCの骨芽細胞への分化過程における促進効果が挙げられる。MSCの増殖能については、アメロゲンin添加による細胞増殖様相の検討に加えて、アメロゲンinレセプター結合後のMAPK-Erk経路の活性化について検討する。

一方、MSCにおける骨分化の誘導/促進因子としてBMP-6の重要性が示唆されている。そこで、本研究においては、MSCのBMP-6発現調節機構に対するアメロゲンinの影響を検討するとともに、MSCの骨分化過程における骨分化マーカーの発現および石灰化度へのアメロゲンin添加の影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒトMSC増殖期におけるアメロゲンinレセプターLAMP-1およびCD63の発現の検討

LAMP-1およびCD63の遺伝子発現レベルについて、定量PCR解析を行う。また、蛋白レベルの経時的発現については、Western blot分析を用いて検討する。さらに、LAMP-1およびCD63抗体を用いて、培養細胞の免疫染色を行い、ヒトMSCにおけるLAMP-1およびCD63の局在について検討する。

(2) ヒトMSC増殖能に対するアメロゲンin添加の影響

実験開始 24 時間前から段階的に無血清状態にした後 0-100ng/ml のアメロジェニンを添加し、実験開始 24 時間後に、ELISA 法を用いて測定を行う。

(3) MSC 増殖に対する LAMP-1 および CD63 の関与の検討 MSC を播種し、LAMP-1 および CD63 の中和抗体および siRNA を添加し、アメロジェニン添加/非添加で 24 時間培養し、細胞増殖の変化を検討する。

(4) ヒト MSC 増殖期におけるアメロジェニンに関連した細胞内シグナリング経路の検討

アメロジェニンを添加した際の Erk1/2 の活性の変化を ELISA 法および Western blot 法にて分析する。さらに、(3)と同様の手法により LAMP-1 および CD63 をブロックし、アメロジェニンを添加した際の Erk1/2 の活性の変化についての検討も行なう。

(5) ヒト MSC 骨分化能に対するアメロジェニン添加の影響

アメロジェニン存在/非存在下で培養を継続し、骨分化マーカーの発現レベルを定量 PCR および Western blot 法を用いて解析する。また、アリザリンレッド染色法を用いて石灰化度の検討を行うとともに、培養液中 Ca レベルの経時的検討も行う。さらに、ALP 活性についての評価を行う。また、BMP-6 の発現レベルの変化を BMP-6 の発現レベルの変化を定量 PCR および Western blot 法を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト培養MSCに対するアメロジェニンの影響について検討

アメロジェニンによる増殖能への影響について ELISA BrdU kit を用いて検討を行ったところ、MSC の細胞増殖能が亢進することが明らかとなった。

(2) MSC 増殖に対するアメロジェニンレセプター-LAMP-1 および CD63 の関与の検討

MSC の増殖期において、CD63 の発現は認められなかったが、LAMP-1 の遺伝子発現が確認された。また、免疫染色の結果、ヒト培養 MSC において、細胞質に LAMP-1 の局在が認められた。次に、LAMP-1 中和抗体を添加したところ、アメロジェニンによる細胞増殖能の亢進を抑制したが、CD63 中和抗体を添加した際には、細胞増殖能に影響を及ぼさなかった。このことより、アメロジェニンは MSC の増殖に対して

LAMP-1 を介して作用している可能性が示唆された。

(3) アメロジェニンに関連した細胞内シグナリング経路の検討

アメロジェニンを添加した際の Erk1/2 の活性の変化について検討を行ったところ、アメロジェニンの添加により Erk1/2 の活性が有意に亢進した。また、LAMP-1 中和抗体を添加することで、アメロジェニンによる Erk1/2 活性の亢進を抑制することが明らかとなった。

以上のことより、アメロジェニンが LAMP-1 を介して MSC の増殖を亢進しており、その細胞内シグナリング経路の一つとして MAPK-Erk 経路の関与が明らかとなった。

(4) ヒト MSC 骨分化能に対するアメロジェニン添加の影響

骨分化誘導を開始した骨髄由来ヒト MSC において、アメロジェニンは骨分化マーカーの遺伝子発現を亢進することが明らかとなった。また、骨分化後期において、アルカリフォスファターゼ活性の亢進およびアリザリンレッド染色や Ca 量の増加することが明らかとなった。以上のことよりアメロジェニンはヒト MSC の骨分化能を促進することが明らかとなった。特に骨分化後期においては、石灰化度の亢進を行うことが明らかとなった。また、アメロジェニンは骨分化の促進因子として注目されている BMP-6 の発現を促進することが明らかとなったことより、アメロジェニンによる MSC 骨分化能の促進には BMP-6 が関与している可能性が強く示唆された。

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 1 件)

1. Huang YC, Tanimoto K, Tanne Y et al., Effects of human full-length amelogenin on the proliferation of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, Cell Tissue Res, 査読有, 2010, 342, 205-212

[学会発表] (計 4 件)

1. 国松亮、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 年 9 月 27-29 日、横浜
2. Huang Yu-ching, Amelogenin Modulates the Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells through the MAPK-ERK Pathway, 88th IADR General Session,

- 14-17 July 2010, Barcelona, Spain
3. Yoshioka Motoko, Regeneration of maxillary bone with mesenchymal stem cells for the treatment of jaw cleft, 3rd Hiroshima Conference on education and Science in Dentistry, 7 Nov. 2009, Hiroshima
 4. Huang Yu-Ching, 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹根 由起 (TANNE YUKI)

広島大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50526241

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：