

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：30110
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592190
 研究課題名（和文） ヒト歯髄をバイオマテリアルとして用いた骨形成の解析

研究課題名（英文） Analysis of bone morphogenesis using human dental pulp as biomaterial
 研究代表者

伊藤 勝敏 (ITO KATSUTOSHI)
 北海道医療大学・歯学部・助教
 研究者番号：50433438

研究成果の概要（和文）：ヒト歯髄組織および象牙質をバイオマテリアルとして再利用するために、それらに含まれると考えられる組織再生因子の解析を行った。その結果、歯髄組織には強力な骨形成タンパク質である BMPs はもとより、様々な硬組織関連因子や組織再生因子が発現していることが確認された。また、それらの担体として用いられるマテリアルも、BMP-2 や BMP-7 を含むことが確認され、硬組織再生に有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：It was analyzed the tissue regeneration factor included in the human pulp tissue and dentin for reusing as biomaterial. In the result, it was revealed there existed many hard tissue relative factors and tissue regeneration factors in addition to BMPs, strong bone morphogenetic factor. It was affirmed that the materials using as carriers for dental pulp included BMP-2 and BMP-7, it was suggested they were useful as hard tissue regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、歯科医用工学・再生歯学

キーワード：ヒト歯髄、BMP、骨形成、fg-HAp

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯の形成・維持に重要な役割をもっているヒト歯髄組織には、強力な硬組織形成因子である骨形成タンパク質 (BMP) の存在が知られており、通常廃棄される抜去歯に含まれる歯髄組織は、硬組織の再生に利用できる可能性がある。また、硬組織を効率よく再生するためには、歯髄組織と担体との親和性も重要な要件である。

(2) 肝細胞増殖因子 (HGF) は、血管や様々な組織・臓器の再生機能を有することが解明されており、肝疾患や腎疾患、肺疾患などへの臨床応用が期待されている。神経栄養因子 (NGF) は、脳神経の機能回復を促し、アルツハイマー病や痴呆症の治療および予防に効果があるといわれている。もし、これらの組織再生因子が歯髄組織に含まれていることが明らかになれば、歯髄組織のさらなる再利用の可能性が高くなる。

2. 研究の目的

- (1) 抜去歯に含まれるヒト歯髄組織を用いた硬組織関連因子および組織再生因子の解析
- (2) 歯髄組織の担体との親和性の解析を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯髄組織の遺伝子解析

抜去歯からヒト歯髄組織を採取し、total RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を作製する。作製した cDNA を用いて PCR を行い、BMP 遺伝子および硬組織関連因子、組織再生因子の解析を行う。

(2) ヒト歯髄組織のタンパク質解析

抜去歯からヒト歯髄組織を採取し、採取した歯髄組織を用いて SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングを行い、BMP タンパク質および硬組織関連タンパク質、組織再生因子の解析を行う。

(3) ヒト歯髄組織のタンパク質の発現状態を解析

BMP 遺伝子のタンパク質認識配列部 (CDS) を tag ベクターへ組み込み、COS7 等の細胞にトランスフェクションし融合タンパク質を発現させる。融合タンパク質を回収した後、(2)と同様に SDS-PAGE とウェスタンブロッティングを行い、発現状態を解析する。

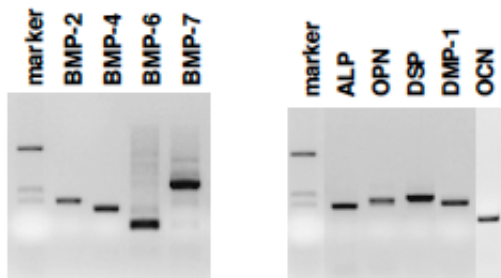
(4) 担体のタンパク質解析

歯髄組織の担体として用いる材料も、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングを行い、BMP タンパク質の解析を行う。

4. 研究成果

(1)

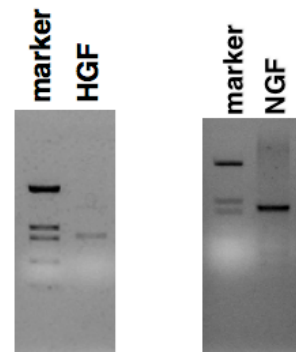
① ヒト歯髄組織における BMPs および硬組織関連遺伝子の発現



RT-PCR の結果、BMPs のうち BMP-2、BMP-4、BMP-6、BMP-7 の遺伝子発現が認められた。また、アルカリフォスファターゼ (ALP)、オステオポンチン (OPN)、象牙質シアルタンパク質 (DSP)、象牙質マトリックスタンパク質-1 (DMP-1)、オステオカルシン (OCN) の発現も

認められた。

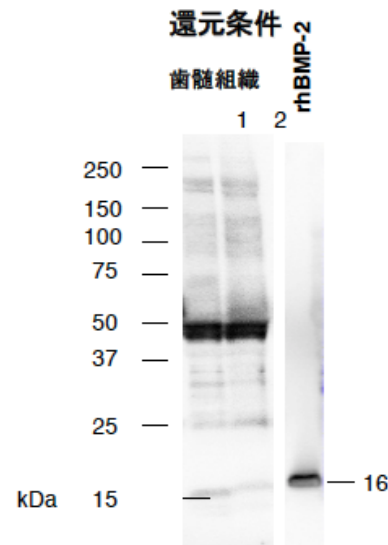
② ヒト歯髄組織における HGF および NGF 遺伝子の発現



RT-PCR の結果、ヒト歯髄組織には HGF および NGF の遺伝子発現が認められた。

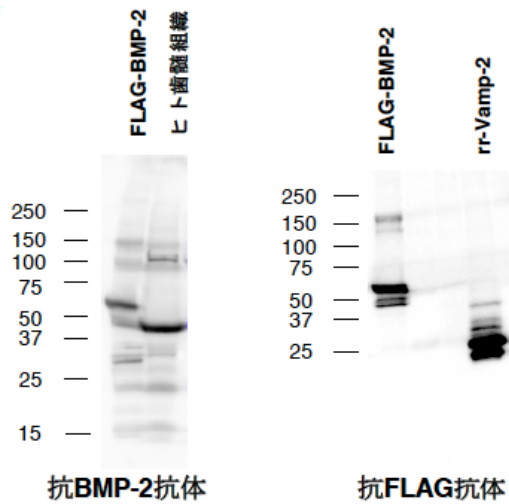
(2)

① ヒト歯髄組織に抗 BMP-2 抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果



還元条件のため、rhBMP-2 は二量体の s-s 結合が切れて 16kDa の位置に存在している。一方、ヒト歯髄組織は強いシグナルを示すバンドが 50kDa に検出され、弱いシグナルのバンドが 34kDa、25kDa、16kDa の位置に検出された。

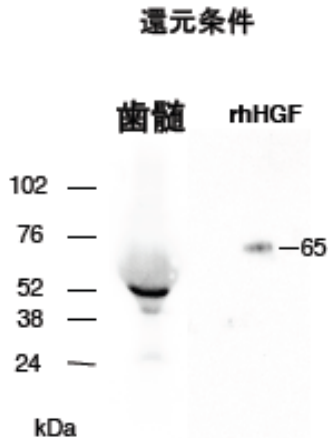
② FLAG-BMP-2 融合タンパク質およびヒト歯髄組織に抗 BMP-2 抗体と抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果



構築ベクターにより発現させた抗 BMP-2 抗体と抗 FLAG 抗体は、同じ位置に検出された。

①と②に結果より、ヒト歯髄組織中の BMP-2 は、主に前駆体の状態であることが示唆された。

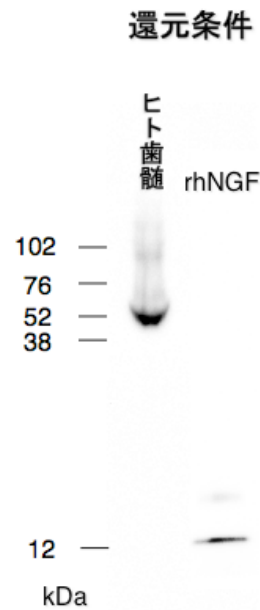
③ ヒト歯髄組織に抗 HGF 抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果



還元条件のため、分子量 83kDa である成熟型 rhHGF は、重鎖と軽鎖の s-s 結合が切れ、重鎖のバンドのみ 65kDa の位置に存在している。

一方、ヒト歯髄組織は、強いシグナルを示す重鎖のバンドが 53kDa の位置に検出され、弱いシグナルのバンドが 40kDa と軽鎖の 30kDa の位置に検出された。

④ ヒト歯髄組織に抗 NGF 抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果

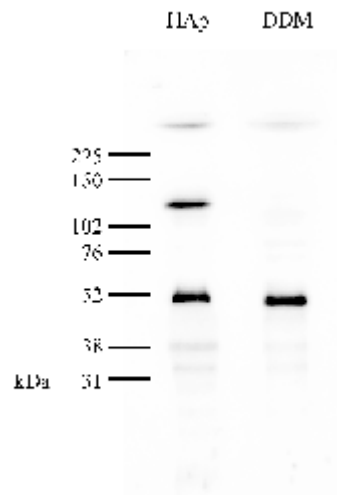


還元条件のため、分子量 26kDa である成熟型 rhNGF は、二量体の s-s 結合が切れて 13kDa に存在している。

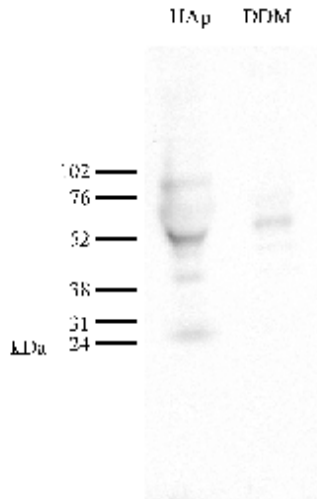
一方、ヒト歯髄組織は、強いシグナルを示すバンドが前駆体 NGF の分子量である 53kDa の位置に検出された。

③と④の結果より、ヒト歯髄組織はHGFやNGFを含んでおり、組織再生因子として再利用できる可能性があることが示唆された。

⑤ 担体として用いるマテリアルに抗 BMP-2 抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果



⑥ 担体として用いるマテリアルに抗 BMP-7 抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果



担体として用いられる材料として、ハイドロキシアパタイト (HAp: APACERAM-AX®) と象牙質から作製されるヒト脱灰象牙質 (DDM) をラットの背部皮下に埋植後、1日後に摘出し抗 BMP-2 抗体および抗 BMP-7 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。⑤と⑥の結果より、どちらのマテリアルも BMP-2 および BMP-7 との親和性がよく、担体として有益であることが示唆された。

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 2 件)

①Junichi Tazaki, Katsutoshi Ito, Surface Characteristics and Osteoinductivity of Biomimetic Ceramic Scaffolds, Bioceramics Journal, Key Engineering Materials, 査読有、529-530 巻、2013、44-49

②K. Ito, M. Murata, BMPs as Adsorptive Proteins for Ceramic Scaffolds, Key Engineering Materials, 査読有、493-494 巻、2011、808-812

[学会発表] (計 6 件)

①Junichi Tazaki, Katsutoshi Ito, Surface Characteristics and Osteoinductivity of Biomimetic Ceramic Scaffolds, BIOCERAMICS 24、2012 年 10 月 21~24 日、福岡

②Md. Arafat Kabir, Katsutoshi Ito, Bone Regeneration by Patient-own Demineralized Dentin Matrix, 3rd National & International Dental Congress, 3rd National & International Dental Congress, ダッカ (バングラデシュ)

③伊藤勝敏、村田 勝、ヒト象牙質・歯髄組織における BMP-2 の検出、第 65 回 NPO 法人 日本口腔科学会学術集会、第 65 回 NPO 法人 日本口腔科学会学術集会、東京

④K. Ito, M. Murata, BMPs as Adsorptive Proteins for Ceramic Scaffolds, BIOCERAMICS 23、November 6-9、Turkey

⑤伊藤勝敏、村田 勝、ヒト歯髄組織における肝細胞増殖因子の発現、第 19 回 硬組織再生生物学会、2010 年 9 月 4 日、岡山

⑥Katsutoshi Ito, Masaru Murata, Single standing implant in the region of immediate autograft of demineralized dentin matrices for bone augmentation, The 6th Asian Sciences Seminar in Taiwan, 2010 年 11 月 20 日~22 日、台湾

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 勝敏 (ITO KATSUTOSHI)
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号：50433438

(2) 研究分担者

村田 勝 (MURATA MASARU)
北海道医療大学・歯学部・准教授
研究者番号：00260662

(3) 連携研究者

()

研究者番号：