

## 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 21 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592233

研究課題名（和文）歯の形成・発育におけるメラトニンの生理学的役割と歯の再生医療

研究課題名（英文）A physiologic role of the melatonin in the formation and the growth of the tooth and the regenerative medicine of the tooth

研究代表者

橘 竜佑 (TACHIBANA RYUSUKE)

鶴見大学・歯学部・臨床助手

研究者番号：80514926

研究成果の概要（和文）：ヒト歯胚およびマウス歯胚を用いて、メラトニン 1a レセプターの発現につき免疫組織化学的検討でその発現が確認された。ヒトならびラット歯原性細胞において、*in vitro* でもメラトニン 1a レセプターの発現が確認された。さらに、ヒト歯乳頭細胞の増殖に対するメラトニンの影響は認められなかったが、ヒト歯乳頭細胞の分化においてメラトニンは濃度依存的に、象牙芽細胞および骨芽細胞の分化マーカーの発現量を増加させた。

研究成果の概要（英文）：Expression found immunohistochemical study for expression of the Mel1aR using human embryos and mouse tooth germs. Expression of Mel1aR in human as well as rat tooth cells, *in vitro*. Further, significant effect of melatonin on the proliferation of human dental papilla cells melatonin increased expression of odontoblast cells and Osteoblast differentiation markers dependently on the *in vitro* differentiation of human dental papilla cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：メラトニン・歯

## 1. 研究開始当初の背景

主に夜間、松果体より分泌されるホルモンであるメラトニンは、1958年にLernerらによって、ウシ松果体より分離・精製された。その分泌は光刺激により調節されており、夜間には多く分泌され、日中にはほとんど分泌されない。現在までに報告されているメラトニンの生理作用として、概日リズム調節作用、抗性腺作用に起因するとされる季節繁殖動物の性周期の調節、また抗老化作用として老

齢マウスの生存率を高める作用やリンパ球や単球に作用してインターフェロンやインターロイキン-2, 4, 6などのサイトカインの産生を促す免疫賦活作用、さらには MCF-7などの乳癌細胞の増殖を抑制するという抗腫瘍作用などが報告されている。さらに最近、メラトニンがヒトやマウスの骨形成を促進する作用を有していることが明らかとなった (J. Pineal Res. 42:231-239, 2007)。歯が顎骨内で形成され、周囲の骨組織と協同的に発育する事実を考えると、顎骨の成長と

歯の成長をコントロールしている何らかの非局所的共通メカニズムが存在していることが予想される。このことからわれわれは、最近骨組織の成長を促進する作用を有していることが明らかとなった概日リズム調節ホルモンであるメラトニンが、同時に歯の成長に対しても何らかの生理的作用を有している可能性に着目した。そこで、メラトニンが骨形成・骨格成長ばかりでなく、歯の形成・発育にも深く関与していることを強く示唆しているものと考えられる。このような観点から、本研究においては、歯の形成・発育に対するメラトニンの生理的作用を明らかにするとともに、歯の再生医療実現におけるメラトニン利用の有用性について検討を行うこととした。

## 2. 研究の目的

われわれが保有しているヒトの歯乳頭細胞や歯小囊細胞、マウスのエナメル芽細胞株および象牙芽細胞株、ラットの歯原性上皮細胞株 (HAT-7) の増殖・分化に対するメラトニンの作用を分子細胞生物学的に解明することを目指す。さらに、マウスの歯胚の成長速度に対するメラトニン投与の影響を明らかにすることにより、歯の再生医療実現のためのメラトニンの有用性について検討する。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト、マウスおよびラットの歯胚におけるメラトニンレセプター (Mel1aR) の発現。ヒト、マウスおよびラットの歯胚の脱灰切片を製作して、免疫組織学染色により Mel1aR の発現を検討した。

(2) 各種歯原性細胞における Mel1aR の発現。各種歯原性細胞に対するメラトニン作用通常の一層細胞培養系を用いて、ラット歯原性上皮細胞 (HAT7)、ヒト歯乳頭細胞 (DP805) 各種歯原性細胞の増殖に対するメラトニンの影響を crystal violet 染色法により検討した。またこれらの細胞の象牙芽細胞、セメント芽細胞、エナメル芽細胞への分化に対するメラトニンの作用について、それぞれのマーカー分子と考えられる dentin sialophosphoprotein、dentin matrix protein 1、nestin、N-tenacin、amelogenin、ameloblastin、enamelin、tuffterin の遺伝子発現およびタンパク質発現を指標として、real time RT-PCR 法およびウェスタンブロット法により検討した。

ヒト歯乳頭細胞、ヒト歯小囊細胞などを用いた細胞培養系、ラット歯胚の器官培養系、マウスへのメラトニン投与などにより、歯の形成、発育に対するメラトニンの作用について分子細胞生物学的手法、組織学的手法により

解明する。

## 4. 研究成果

(1) ヒト、ラットおよびラット歯胚におけるメラトニンレセプターの発現。免疫組織学的染色にてエナメル芽細胞、象牙芽細胞および中間細胞において Mel1aR の発現を確認した。(図1~3)

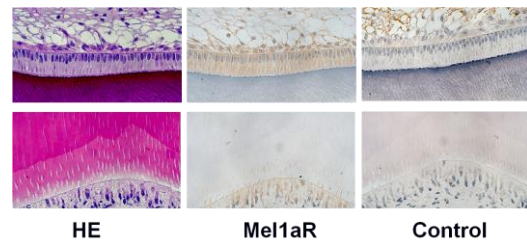


図1  
免疫組織学的検討によるヒト第三大臼歯歯胚における Mel1aR の発現  
(上段: エナメル芽細胞、下段: 象牙芽細胞  
ならび中間細胞)

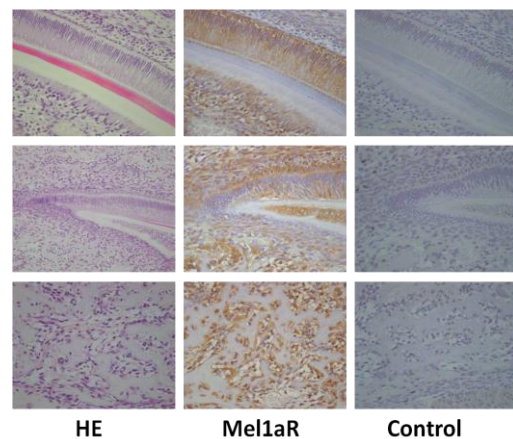


図2  
免疫組織学的検討によるマウス切歯における Mel1aR の発現  
(上段: エナメル芽細胞、中段: 象牙芽細胞、  
下段: 中間細胞)

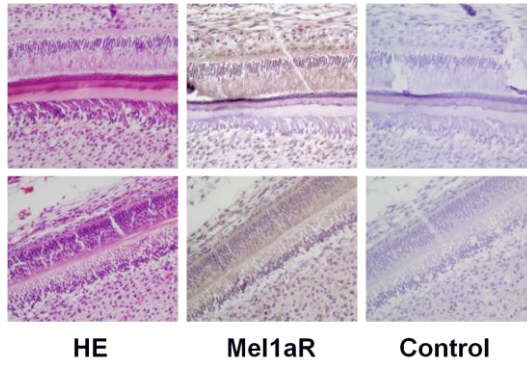


図 3  
免疫組織学的検討によるラット切歯における Mel1aR の発現  
(上段：エナメル芽細胞、下段：象牙芽細胞  
ならび中間細胞)

(2) ヒト歯乳頭細胞 (DP805) およびラット歯原性上皮細胞 (HAT7) で mRNA レベルでの Mel1aR の発現が RT-PCR およびウェスタンブロット法により確認した。(図 4~5)

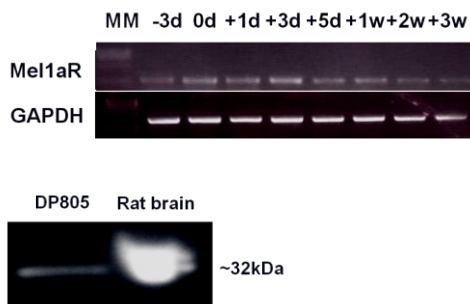


図 4  
ヒト歯乳頭細胞における Mel1aR の発現

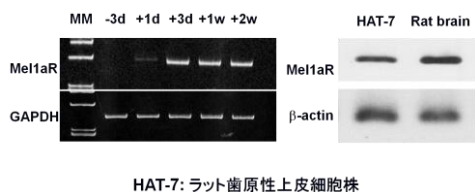
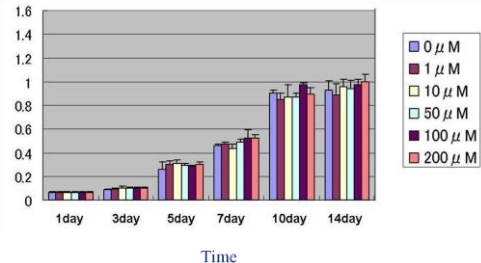


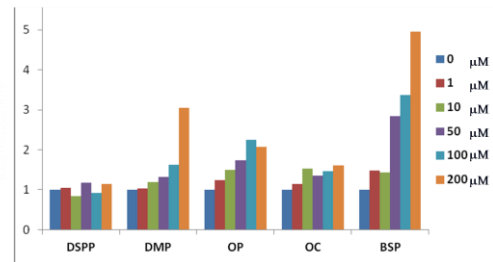
図 5  
ラット歯原性上皮細胞における Mel1aR の発現

(3) ヒト歯乳頭細胞 (DP805) の増殖に対するメラトニンの影響は認められなかった。しかし、分化に対する影響では DMP-1 ならび DSPP で濃度依存性に形成促進を認めた。

(図 6~7)



ヒト歯乳頭細胞の増殖に対するメラトニンの影響 (図 6)



ヒト歯乳頭細胞の分化に対するメラトニンの影響 (図 7)

## 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)

Kumasaka S, Shimozuma M, Kawamoto T, Mishima K, Tokuyama R, Kamiya Y, Davaadorj P, Saito I, Satomura K, Possible involvement of melatonin in tooth development, *Histochemistry and Cell Biology*, 査読有, 133 巻, 2010, 577-584  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20372918>

[学会発表] (計 2 件)

①下間 雅史、梅木 泰親、徳山 麗子、館原 誠晃、美島 健二、斎藤 一郎、里村 二人、唾液腺におけるメラトニン合成酵素の発現とその局在、2011、第 11 回日本抗加齢医

学会総会、5月27日～29日

②熊坂 祝、下間 雅史、徳山 麗子、齋藤  
一郎、里村 一人、歯の発生におけるメラト  
ニンの関与、2010、第55回日本口腔外科学  
会総会・学術大会、10月16日～18日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橘 竜佑 (TACHIBANA RYUSUKE)

鶴見大学・歯学部・臨床助手

研究者番号：80514926

### (2) 研究分担者

里村 一人 (SATOMURA KAZUHITO)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：80243715

館原 誠晃 (TATEHARA SEIKO)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：90380089

山本 英雄 (YAMAMOTO HIDEO)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：10220493

### (3) 連携研究者

なし