

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2011～2012

課題番号：23659980

研究課題名（和文）低分子化合物を用いた新規歯周病治療薬スクリーニングシステムの開発
 研究課題名（英文）Establishment of screening system for novel therapeutics for periodontal disease by using low molecule compound.

研究代表者

齋藤 正寛 (SAITO MASAHIRO)

東京理科大学・基礎工学部・准教授

研究者番号：40215562

研究成果の概要（和文）：これまで研究代表者は微細線維の再構築が歯周組織再生に有効であることを示してきた。歯周病治療薬を開発するため、本研究は微細線維形成因子である ADAMTSL6 β の遺伝子発現を上昇させる低分子コンパウンドのスクリーニングを試みた。この実験を達成させるため、ADAMTSL6 β のプロモーター領域の下流に EGFP を組み換えた reporter を有する細胞の作製が有効であることを示した。

研究成果の概要（英文）：We have shown that regeneration of periodontal tissue is required for reorganization of microfibril. To develop a novel therapeutics for periodontal disease, we attempt to develop low molecular compound to stimulate expression of ADAMTSL6 β in which promotion of microfibril assembly. To achieve these purposes, we demonstrated that generation of cell possessing EGFP reporter under control by ADAMTSL6 β promoter.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：挑戦的萌芽研究

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周免疫機能学

1. 研究開始当初の背景

マイクロフィブリルとは結合組織の弾性を制御する細胞外マトリックス成分である。これまで申請者は、マイクロフィブリルの主成分である *fibrillin-1* に遺伝子変異が生じると、歯根膜形成不全が引き起こされることから、同分子が歯根膜形成に必須である事を見出した。また、ADAMTSL6 β が *fibrillin-1* の重合誘導能を有しており、また同分子の局所投与により歯根膜の創傷治癒を促進することも明らかにしている。これらの研究成果より ADAMTSL6 β が新規歯周病治療の創薬ターゲットになる可能性が示された

2. 研究の目的

本研究では新規歯周病治療薬の開発を目的

に、歯周組織再生誘導能を有する低分子化合物のスクリーニングシステムの構築を進める。これまで申請者は ADAMTSL6 β が歯根膜の弾性機能を司るマイクロフィブリル重合の誘導を介して歯根膜形成を制御するばかりでなく、歯根膜創傷治癒を促進する事を実証し、同分子が新規歯周病治療薬の新たな標的になる事を示してきた。本研究課題では、新規歯周病治療薬開発の基盤技術として、1) ADAMTSL6 β 遺伝子発現誘導をモニターするレポーターシステムの開発、2) ADAMTSL6 β レポーターを活性化する低分子化合物の探索、3) 歯根膜損傷動物モデルを用いた新規歯周病治療薬の開発を推進する。

3. 研究の方法

ADAMTSL6βの発現を誘導する補填剤を開発するため、歯周組織再生誘導能を有する低分子化合物のスクリーニングシステムの構築する評価システムの構築を試みた。そのため ADAMTSL6β遺伝子発現誘導をモニターするレポーターシステムの開発、2) ADAMTSL6βレポーターを活性化する低分子化合物の探索、3) 歯根膜損傷動物モデルを用いた新規歯周病治療薬の開発を推進した。

4. 研究成果

ヒト ADAMTSL6βexon1 の開始コドンの直下に EGFP あるいはルシフェラーゼを組み込んだ targeting construct を作製し、組み換え酵素を用い 15 番染色体で ADAMTSL6βexon1 の領域と置き換えた。次年度は ADAMTSL6β発現細胞の探索と、人工染色体ベクターへの組み換え、および同細胞への遺伝子導入を予定している。また歯周病モデルの確立に関しては、マルファン病モデルマウスの歯根膜に損傷を加えることで、歯周組織の治癒不全を誘導出来ることが判明した。同モデルを用いれば、歯周病に対する影響も解析出来る可能性が示された。

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 10 件)

1. Yokoi, T., Saito, M.,* Nishida, E., Kosaka, K., Tsubakimoto, T. and Teranaka, T.: Characterization of immortalized mouse dental follicle cells. **Bull Kanagawa Dent Col** **33(1)** : 136-140, 2005
2. Saito, M.,* Tsunoda, A., Yokoi, T., Hattori, S., Tsubakimoto, T., Nishida, E., Kousaka, K., Toyoda, M., Sato, S., Noguchi, T. and Teranaka, T.: Molecular mechanisms of Periodontal development, and its prospect of regenerative medicine for periodontium. **Bull Kanagawa Dent Col** **33(1)** : 31-35, 2005
3. Saito, M.,* Handa, K., Kiyono, T., Hattori, S., Yokoi, T., Tsubakimoto, T., Harada, H., Noguchi, T., Toyoda, M., Sato, S. and Teranaka, T.: Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT. **J Bone Miner Res** **20(1)** : 50-57, 2005.
4. Matsubara, T., Suardita, K., Ishii, M., Sugiyama, M., Igarashi, A., Oda, R., Nishimura, M., Saito, M., Nakagawa, K., Yamanaka, K., Miyazaki, K., Shimizu, M., Tsuji, K., Nakamura, K. and Kato, Y.* : Alveolar Bone Marrow as a Cell Source for Regenerative Medicine: Differences between Alveolar and Iliac Bone Marrow Stromal Cells. **J Bone Miner Res**, **20(3)** : 399-409, 2005.
5. Yasukawa M., Ishida K., Yuge Y., Hanaoka M., Minami Y., Ogawa M., Sasaki T., Saito M., Tsuji T. Dpysl4 is involved in tooth germ morphogenesis through growth regulation, polarization and differentiation of dental epithelial cells. **Int J Biol Sci** 2013 Apr 26;9(4):382-90. doi: 10.7150/ijbs.5510. Print 2013.
6. Hayano, S., Kurosaka, H., Yanagita, T., Kalus, I., Milz, F., Ishihara, Y., Nurul, Islam, M., Kawanabe, N., Saito, M., Kamioki, H., Adachi, T., Dierks, T. and Yamashiro, T.*: Roles of Heparan Sulfate Sulfation in Dentinogenesis. **J Biol Chem** **287(15)**:12217-12229, 2012.
7. Arakaki, M., Ishikawa, M., Nakamura, T., Iwamoto, T., Yamada, A., Fukumoto, E., Saito, M., Otsu, K., Harada, H., Yamada, Y. and Fukumoto, S.*: Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. **J Biol Chem** **287(13)** : 10590-10601 2012.
8. Saito, M.,* Kurokawa, M., Oda, M., Oshima, M., Tsutsui, K., Kosaka, K., Nakao, K., Ogawa, M., Manabe, R., Suda, N., Ganjargal, G., Hada, Y., Noguchi, T., Teranaka, T., Sekiguchi, K., Yoneda, T. and Tsuji, T.: ADAMTSL6Lβ rescues fibrillin-1 microfibril disorder in Marfan syndrome mouse model through the promotion of fibrillin-1 assembly. **J Biol Chem** **286(44)** : 38602-38613, 2011.
9. Oshima, M., Mizuno, M., Imamura, A., Ogawa, M., Yasukawa, M., Yamazaki, H., Morita, R., Ikeda, E., Nakao, K., Takano-Yamamoto, T., Kasugai, S., Saito, M. and Tsuji, T.*: Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. **PLOS ONE** **6(7)** : e21531. doi: 10.1371/journal.pone.0021531, 2011.
10. Matsumoto, A., Harada, H., Saito, M. and Taniguchi, A.*: Induction of enamel matrix protein expression in an ameloblast cell line co-cultured with a mesenchymal cell line in vitro. **In Vitro Cell Dev Biol Anim** **47(1)** :39-44, 2011.

[学会発表] (計 4 件)

1. 齋藤正寛 : 細胞外マトリックス補充療法による新規歯周病治療技術の開発、第 6 回日本再生歯科医学会シンポジウム、帯広、2012 年 10 月 7 日。(シンポジウム)
2. 齋藤正寛 : 細胞外マトリックス補充療法による新規歯周病治療技術の開発、第 12 回日本外傷歯学会総会学術

大会、岐阜、2012年10月13日。(シンポジウム)

3. Saito, M. and Tsuji, T: Forefront of periodontal regeneration therapy, ISBB meeting Taipei, Taiwan, 2011 July 8. (シンポジウム)
4. 齋藤正寛、辻 孝 : 抗加齢医学における歯の再生の役割 第11回抗加齢学会、京都、2011年5月27日。(シンポジウム)

[図書] (計1件)

1. M.Saito. and T. Tsuji: "Tooth regeneration therapy" as a next generation of regenerative medicine., Hiromasa Yoshie, At the forefront. Illustrated Topics in dental research and clinical practice, Quintessence Publishing Co, Inc., Hanover Park, 2012,39-42.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 正寛 (SAITO MASAHIRO)
東京理科大学・基礎工学部・准教授
研究者番号：503339131

(2) 研究分担者

辻 孝 (Tsuji Takahi)
東京理科大学・総合研究機構・准教授
研究者番号：503339131

山田 聡 (Yamada Satoru)
大阪大学・大学院歯学研究科
研究者番号：40359819

(3) 連携研究者

無し