

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6日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792428

 研究課題名（和文）エナメル蛋白による歯の移動時の歯周組織誘導能の探索と臨床応用
 研究課題名（英文）Effects of enamel matrix protein on the metabolism of periodontal tissue and application of enamel matrix protein for orthodontic treatment.

研究代表者

國松 亮（KUNIMATSU RYO）

広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号：40580915

研究成果の概要（和文）：

ヒト完全長アメロゲニンは、CD63 受容体を介してヒト由来セメント芽細胞およびヒト由来歯根膜細胞の増殖を亢進し、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。また、骨分化誘導を開始したヒトセメント芽細胞において、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。さらに、ビーグル犬を用いた in vivo 系実験の検討により、アメロゲニンの歯根表面への塗布は歯根吸収を抑制させた。以上より、アメロゲニンは、セメント芽細胞の細胞増殖能および石灰化能を亢進させること、そして、アメロゲニンの塗布が歯周組織の再生へ誘導することが示された。

研究成果の概要（英文）：

It is demonstrated that human full-length amelogenin enhances the proliferation of human cementoblasts lineage cells by an interaction with CD63 through MAPK-ERK signaling pathway. In addition, amelogenin up-regulated the expressions of bone specific marker and mineralization activity in the osteogenic differentiation of human cementoblasts. In vivo studies, it is demonstrated that application of amelogenin surely suppresses root resorption. It is thus confirmed that amelogenin may contribute to the regeneration of cementum in terms of the enhancement of human cementoblast lineage cells proliferation and differentiation, indicating an application of amelogenin to regeneration of periodontal tissue.

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	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：矯正歯科

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：蛋白質、生理活性、シグナル伝達、歯学、再生歯学

1. 研究開始当初の背景

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る蛋白である。無細胞性に硬組織を誘導するとともに、歯周組織構成細胞に対するさまざまな生理活性が広く知られている。ブタ歯胚由来のエナメル基質抽出成分はエムドゲイン®として既に商品化され、歯周組織再生治療に臨床応用されている。このように、エナメル蛋白は医薬品として一定の実績を有しているものの、多種類の蛋白を含み、全成分が明らかに

されてはいない。したがって、歯周組織を構成するいずれの細胞に対して、どの成分が効果を発揮しているのか不明な点が多く、作用機序に対する十分なエビデンスが確立されているとは言えない。しかし、近年、エナメル蛋白の主成分であるアメロゲニンには、歯髓細胞や歯根膜細胞に対する細胞増殖や石灰化の促進効果があることが明らかになった。そこで、申請者はアメロゲニンの効果に着目し、ヒトリコンビナントアメロゲニン（rh174）を精製した。リコンビナント蛋白を

用いる理由として、ヒト歯胚の入手の機会が限定的であることに加えて、アメロゲニンは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ために精製効率が低いことが挙げられる。さらに、rh174では、ウイルス等の混入による人体への危険性はきわめて低いことから、ブタ由来のエムドゲインと比較して最終的には安全性および効果の安定性において優れていると考えられる。rh174の歯周組織への適用により、歯槽骨と同時に歯根膜やセメント質も含めた包括的な組織誘導効果が期待されることから、健全な歯周組織の回復を目指した本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果を進展させ、rh174による歯周組織の再生効果を検証し、そのメカニズムを解明することを目的とした。そのために、研究期間内において、以下の項目を検討した。

実験1では、歯周組織構成細胞を用いた *in vitro* 実験系により、増殖能および基質産生能に対する rh174 の影響について検討を行った。

実験2では、rh174のシグナル伝達機構の解明を行った。

実験3では、動物実験による検討を行った。すなわち、ビーグル犬を用いて、rh174添加による歯周組織の量的変化を検討した。

3. 研究の方法

実験1 歯周組織構成細胞の代謝に対する rh174 の作用の検討

リコンビナントヒト完全長アメロゲニン (rh174) は、ヒト *AMELX* cDNA を pRSET A ベクターに組み込み、大腸菌を用いて発現させ、研究協力者らの手法により精製した (Tanimoto *et al.*, *J Dent Res.* 87(1):39-44, 2008)。そして、ヒト由来セメント芽細胞株 (HCEM) およびヒト由来歯根膜細胞 (HPDL) を用いて以下の検討を行った。

① 細胞増殖能に対する rh174 添加の影響

各培養細胞に 0.01 -1.0 $\mu\text{g/ml}$ rh174 添加した際の増殖能への影響について、ELISA BrdU assay (Roche Diagnostics) および MTS assay を用いて解析した。

② 基質代謝能に対する rh174 添加の影響

各細胞の基質代謝能の検討では、0.01 -1.0 $\mu\text{g/ml}$ rh174 添加時の骨代謝マーカー (アルカリフォスファターゼ、I型コラーゲン、bone sialoprotein (BSP) など) の発現レベルについて定量 PCR 解析および定量 Western blot 解析を行った。また、アルカリフォスファターゼ

活性および培養液中の Ca レベルを定量評価し、アリザリンレッド染色法を用いて石灰化度の検討を行った。

実験2 歯周組織構成細胞における関連レセプターと rh174 受容後のシグナル伝達機構の解明

① 歯周組織および各培養細胞における CD63 発現様相の検討

採取した歯周組織の免疫染色により、生体における CD63 の発現分布を検討した。

② 細胞増殖能に対する rh174 添加の影響と CD63 の関与の検討

各細胞の基質代謝能の検討では、0.01 -1.0 $\mu\text{g/ml}$ rh174 添加し、rh174 受容後のシグナル経路の活性化について ELISA、Western blot 解析を行った。また CD63 のブロッキング抗体存在下で rh174 を添加した場合の増殖能の変化について同様の方法を用いて解析した。

実験3 歯根吸収に対する rh174 の影響についての検討

イヌ (ビーグル犬) の下顎第三切歯を抜歯し、フィッシャーバーにて歯根欠損部を作製した。その後、対照群には、アルギン酸ポリエチレングリセロール (PGA) を、実験群には PGA+rh174 を塗布し、再植した。再植後、歯根欠損部の変化について X線写真による経時的な検討を行った。

4. 研究成果

1. rh174 は培養ヒト歯根膜細胞とセメント芽細胞の増殖能を亢進させることが明らかとなった。

2. rh174 は、培養ヒトセメント芽細胞および歯根膜細胞に対して、CD63 および ERK1/2 のリン酸化を介して細胞増殖に影響を与えることが認められた。

3. 基質形成期において、rh174 は培養ヒトセメント芽細胞の石灰化能を亢進することが明らかとなった。一方、培養ヒト歯根膜細胞においては石灰化能を抑制することが示された。

4. *In vivo* 系実験において、rh174 は歯根吸収を抑制させることが X線写真上で示された。

以上の結果より、rh174 は HCEM、HPDL の細胞増殖能および石灰化能に対して大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。また、その作用機序として、CD63 を介した ERK1/2 の活性化が示された。さらに、歯根吸収の抑制、健全な歯周組織の回復を可能にする歯周組織再生療法に対する rh174 の有用性が示された。

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4件)

1. Tanimoto K, Huang YC, Tanne Y, Kunimatsu R, Michida M, Yoshioka M, Ozaki N, Sasamoto T, Yoshimi Y, Kato Y, Tanne K. Amelogenin Enhances the Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow. Cells Tissues Organs. 2012, 196(5): 411-9, 査読有.

2. Tanimoto K, Kunimatsu R, Tanne Y, Huang YC, Michida M, Yoshimi Y, Miyachi M, Takata T, Tanne K. Differential effects of amelogenin on mineralization of cementoblasts and periodontal ligament cells. J Periodontol. 2012, 83(5): 672-9, 査読有.

3. Kunimatsu R, Tanimoto K, Tanne Y, Kamiya T, Ohkuma S, Huang YC, Yoshimi Y, Miyachi M, Takata T, Tanne K. Amelogenin enhances the proliferation of cementoblast lineage cells. J Periodontol. 2012, 82(11): 1632-8, 査読有.

4. 矯正歯科における初期う蝕への先進的対応 バイオミネラリゼーション技術によるハイドロキシアパタイトの結晶形成。谷本幸太郎、國松 亮、丹根一夫。広大歯誌、2012、44(2)、112-122、査読有。

[学会発表] (計6件)

1. Yoshimi Y, Tanimoto K, Kunimatsu R, Hirose N, Awada T, Mitsuyoshi T, Tanne K. Amelogenin variants promote the proliferation and differentiation of human cementoblasts. The 112th American association of orthodontics, 3~7 May, 2013, Philadelphia, USA.

2. エナメル蛋白アメロゲニンの C 末端側がヒトセメント芽細胞の増殖・分化に及ぼす影響。吉見有希、谷本幸太郎、國松 亮、廣瀬尚人、栗田哲也、丹根由起、吉岡基子、光吉智美、鷺見圭輔、蘇 少卿、沖 奈苗、岡本友希、高田 隆、丹根一夫、第 71 回日本矯正歯科学術大会 (盛岡) , 2012 年 9 月 26~28 日.

3. Differential effects of amelogenin on mineralization of periodontal cells. Yoshimi Y, Tanimoto K, Kunimatsu R, Takata T, Tanne K. The 59th annual meeting of Japanese association for dental research, 8~9 Oct, 2011, Hiroshima.

4. エナメル芽細胞の増殖および分化に対するアメロブラスチンの生理活性: 廣瀬尚人, 島津 篤, 谷本幸太郎, 丹根由起, 國松 亮, 尾崎徳継, 吉見友希, 内田 隆, 丹根一夫: 第 70 回日本矯正歯科学術大会・第 4 回国際会議 (名古屋) , 2011 年 11 月 17~20 日.

5. バイオミネラリゼーション技術を応用したエナメル質再生法-むし歯進行予防のための新たな戦略: 國松 亮, 谷本幸太郎, 丹根由起, 神谷貴志, 岩淵泰憲, 吉岡基子, 尾崎徳継, 廣瀬尚人, 笹本智子, 道田将彦, 光吉智美, 吉見友希, 鷺見圭輔, 蘇 少卿, 丹根一夫: 第 70 回日本矯正歯科学術大会・第 4 回国際会議 (名古屋) , 2011 年 11 月 17~20 日.

6. Amelogenin-guided Biomineralization of Hydroxyapatite Crystal on Tooth Enamel. Tanimoto K, Kunimatsu R, Yoshimi Y, Yoshioka M, Tanne Y, Tanne K. 4th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry. 8~9 Oct, 2011, Hiroshima.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

1. ヒトアメロゲニンペプチドとその生理活性を応用した薬剤.

発明者: 谷本幸太郎, 丹根一夫, 國松 亮, 吉見友希.

権利者: 国立大学法人広島大学

種類: 特願

番号: 2012-016734

出願年月日: 2012/1/30

国内外の別: 国内

2. エナメル質再生液及びエナメル質再生キット.

発明者: 谷本幸太郎, 丹根一夫, 國松 亮, 神谷貴志.

権利者: 国立大学法人広島大学

種類: 特願

番号: 2011-027923

出願年月日: 2011/2/10

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/orthod/orthod-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國松 亮 (KUNIMATSU RYO)

広島大学・病院 (歯) ・歯科診療医

研究者番号: 40580915

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：