

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893147

研究課題名(和文)機能性アメロゲニンペプチドによる歯周組織代謝活性機構の解明と歯根吸収予防への応用

研究課題名(英文)Application to root resorption prevention and elucidation of periodontal tissue metabolic activity mechanism by functionality amelogenin peptide

研究代表者

吉見 友希(Yoshimi, Yuki)

広島大学・大学病院・歯科診療医

研究者番号：50707081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エナメル蛋白の1つであるアメロゲニンの生理活性に着目し、歯根表面に存在するセメント芽細胞および破歯細胞に対する生理活性部位を明らかにし、さらに、解明した活性部位を有する機能性アメロゲニンペプチドを活用することで、矯正歯科治療中の歯根吸収の発症を安定的に予防する新規の治療法を確立することを最終的な目的として研究を行った。その結果、アメロゲニンのC末端側11塩基ペプチドの作用により、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が明らかとなり、機能性アメロゲニンペプチドがセメント芽細胞の細胞活性に有効であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Amelogenin is a major enamel matrix protein produced by ameloblasts. EMP plays a crucial role in periodontal tissue generation as well as amelogenesis. The purpose of this study was to explore bioactive domain of amelogenin, by examining the effect of several fragments of amelogenin on cementblasts and odontoclast, to reveal signal pathway of amelogenin, and to develop a new therapeutic method for prevent of root resorption with orthodontic treatment. It is shown that C-terminal of amelogenin peptide enhance the proliferation and differentiation of cementblasts, and C-terminal peptide of amelogenin enhance the proliferation of cementblast via MAPK-ERK pathway. It is thus suggested that C-terminal peptide of full-length amelogenin is a bioactive domein of amelogenin, and C-terminal peptide of amelogenin is effective to promote cellular activity of cementblast.

研究分野：矯正歯科

キーワード：アメロゲニン 歯根吸収

### 1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療は、歯周組織の骨改造現象を利用して歯を移動させるが、生じる副作用の一つとして歯根吸収が挙げられる。矯正歯科治療に伴う歯根吸収は、通常臨床症状を伴うことなく進行し、矯正歯科治療後の安定性に大きな影響を及ぼしたり、治療の中断を余儀なくされる。しかしながら、吸収した歯根を修復・再生させる治療法はこれまでのところ確立されていない。歯根吸収の発症因子として、過度な矯正力や治療の長期化に加えて、不正咬合の状態、年齢、骨代謝疾患などの全身的要因および歯根の形態なども関連していることが報告されている。もし、矯正歯科治療中に歯根吸収のリスクが高い歯に対して選択的に予防処置を行うことができれば、より安全で安定した矯正歯科治療を行うことが可能となる。

アメロゲニン<sup>®</sup>は、歯の発生過程においてエナメル芽細胞より分泌される細胞外基質のうち約90%を占める蛋白質である。硬組織を無細胞性に誘導する働きを有しており、エナメル質やセメント質形成に参与している。近年、ブタの幼若エナメル蛋白抽出物であるエムドゲイン<sup>®</sup>が製品化され、組織再生療法の一つとして臨床的に有用であることが数多く報告されている。しかしながら、エムドゲイン<sup>®</sup>は、多種のエナメル蛋白を含み、どの構成成分が組織再生効果に参与しているのかは未だ不明である。また、動物由来タンパクを用いていることから抗原性や品質の安定性は定かではない。そのため申請者らは、アメロゲニンの効果に着目し、ヒトリコンピナント完全長アメロゲニンを精製するとともに、歯周組織構成細胞に対する影響について検討を重ねてきた。その結果、アメロゲニンがヒトセメント芽細胞における細胞増殖能および基質産生能を亢進させることを明らかにした。また、アメロゲニンは破歯細胞活性化因子として知られるRANKLの発現を抑制し、破歯細胞数を減少させることが報告されている。しかしながら、アメロゲニンは、生体内では酵素により様々な断片に分解される。また、完全長アメロゲニンは、C末端側に親水性領域、N末端側に疎水性領域を持つため、強い極性を帯び、ミセル構造を呈す。その強い極性のため、生理的条件下では凝集し、生理活性の低下を引き起こす。そのため、安定した効果を得ることが難しかった。

蛋白質には、他の分子との相互作用に必要な活性部位が存在する。蛋白質の活性部位を探求することは、その蛋白質の構造や機能の解明に繋がる。そして、活性部位が明らかになれば、分子量の小さいペプチドを工業的に精製することが容易となり、安定した供給が可能となる。申請者らは、アメロゲニンの安定した効果を引き出すために、その活性部位を探求し、アメロゲニンの親水性領域であるC末端に活性部位が存在することを明らかにした。さらに、特定された蛋白質の活性部位

は、歯胚のエナメル基質中に検出される機能性ペプチド断片であったことから、副作用を起こす危険性は低く、必要な機能のみを発揮しやすい。また、アメロゲニンのC末端ペプチドの作用により、ヒト培養セメント芽細胞の増殖および分化の亢進が認められた。

以上の背景より、アメロゲニンの活性部位であるC末端側ペプチドはセメント芽細胞の代謝調節に影響を及ぼしている可能性が予想される。さらに、C末端側アメロゲニンペプチドの矯正歯科治療への適用により、セメント質の誘導が期待されることから、矯正歯科治療中の歯根吸収を予防する新たな治療法の確立を目指す本研究を着想するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、エナメル蛋白の一つであるアメロゲニンの生理活性に着目し、歯根表面に存在するセメント芽細胞および破歯細胞に対しての生理活性部位を明らかにする。さらに、解明した活性部位を有する機能性アメロゲニンペプチドを活用することで、矯正歯科治療中の歯根吸収の発症を安定的に予防する新規の治療法を確立することを最終的な目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究ではセメント質におけるアメロゲニンペプチドの役割を解明し、歯根吸収に対する予防法を確立することを目的とした計画を立案し、研究を行った。

(1) 機能性アメロゲニンペプチドの探索およびセメント芽細胞および破歯細胞の増殖・基質産生能に及ぼす影響 (in vitro)

#### C末端側アメロゲニンペプチドの設計

様々な大きさのC末端側ペプチドを作製し、最も効果が高く、安定した性質を有するアメロゲニンペプチドを探索した。

各種アメロゲニンペプチドがセメント芽細胞および破歯細胞の増殖・分化に及ぼす影響

数種類のアメロゲニンペプチドおよび完全長アメロゲニンをセメント芽細胞および破歯細胞に添加し、細胞増殖能の変化を解析した。また、セメント芽細胞および破歯細胞の基質産生能に対して、石灰化関連マーカーおよび骨吸収マーカーの遺伝子および蛋白発現レベルについて解析を行った。以上の結果を踏まえ、最も効果の高い機能性アメロゲニンペプチドを決定した。

機能性アメロゲニンペプチドの生理活性発現におけるシグナル伝達経路についての検討

アメロゲニンに対する有力な細胞表面レセプターとして近年報告された LAMP1 および CD63 とアメロゲニンペプチドとの相互作用とそれに続いて活性化されるシグナル伝達機構の探索を行った。

(2) ラット歯根における機能性アメロゲニンペプチドの影響 (in vivo)

申請者らが開発したラット歯根吸収モデルを使用した。12 週齢 Wistar 系ラットの上顎前方部に矯正用ミニスクリューを植立し、これを固定源として第一大臼歯をコイルスプリングで前方へ牽引する。過度な矯正力 (50fg) を負荷することで、牽引開始より数日後に上顎臼歯遠心根近心側に歯根吸収窩が形成される。

機能性アメロゲニンペプチドを 12 週齢 Wistar 系ラットの上顎第一大臼歯遠心根歯根膜腔に局所投与し、この歯根吸収抑制効果を評価した。

#### 4. 研究成果

各種の C 末端側アメロゲニンペプチドの作用により、セメント芽細胞の増殖および石灰化能の亢進が認められた。

各種の C 末端側アメロゲニンペプチドの中でも C 末端側より 11 塩基配列のものが最も有効であり、これを機能性アメロゲニンペプチドとすることにした。

機能性アメロゲニンペプチドは、MAPK/ERK 経路を介して、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。

ラット歯根吸収モデルに機能性アメロゲニンペプチドの局所投与を行い、歯根吸収抑制効果についての検討を行ったところ、有意差は認められなかったが機能性アメロゲニンペプチドの投与により歯根吸収抑制される傾向が認められた。今後、投与濃度等の検討を行い、検証を続けていく必要があると考えられる。

以上の結果より、アメロゲニン C 末端側ペプチドである機能性アメロゲニンペプチドは、セメント芽細胞の細胞活性に有効であることが示唆された。歯根吸収は過度なセメント質の吸収により引き起こされる病態であり、セメント芽細胞の細胞活性を向上させる機能性アメロゲニンペプチドを用いた新規の歯根吸収予防法の開発の可能性が示唆された。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 7 件)

(1) Yuki Yoshimi, Ryo Kunimatsu, Naoto Hirose, Tetsuya Awada, Tomomi Mitsuyoshi, Hidemi Gunji, Takashi Takata, Kotaro Tanimoto, Amelogenin isoforms effect the proliferation in human periodontal cells, 8<sup>th</sup> International Orthodontic Congress 2015, 2015.9.27-30, London(UK)(発表確定)

(2) Ryo Kunimatsu, Yuki Yoshimi, Tetsuya Awada, Kotaro Tanimoto, Amelogenin enhance the proliferation of cementoblast lineage cells, the 115<sup>th</sup> annual session of American association of orthodontics, 2015.5.15-19, SanFrancisco(USA)(発表確定)

(3) 粟田哲也、國松亮、廣瀬尚人、吉見友希、鷺見圭輔、平田伊佐雄、加藤功一、丹根一夫、谷本幸太郎、アメロゲニンの骨芽細胞代謝調節機構への影響 エナメル蛋白由来ペプチドを用いた骨再生療法への展開、第 38 回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2014.5.29-30、札幌コンベンションセンター(北海道)

(4) Tetsuya Awada, Ryo Kunimatsu, Naoto Hirose, Yuki Yoshimi, Yuki Tanne, Isao Hirata, Koichi Kato, Kazuo Tanne, Kotaro Tanimoto, Effects of amelogenin C-terminal peptide on the metabolism of human osteoblast-like cells, 46th Korean Association of Orthodontists, 2013.10.31-11.2, Jeju(Korea)

(5) 吉見友希、國松亮、廣瀬尚人、粟田哲也、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、以呂免和子、高田隆、谷本幸太郎、アメロゲニンの生理活性部位の解明 - 新規アメロゲニンペプチドによるセメント質再生への応用、第 72 回日本矯正歯科学会、2013.10.7-9、キッセイ文化ホール・松本市総合体育館(長野県松本市)

(6) 粟田哲也、谷本幸太郎、國松亮、廣瀬尚人、吉見友希、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、以呂免和子、丹根一夫、C 末端側アメロゲニンの骨芽細胞代謝調節機構への影響、第 72 回日本矯正歯科学会、2013.10.7-9、キッセイ文化ホール・松本市総合体育館(長野県松本市)

(7) Yuki Yoshimi, kotaro tanimoto, Ryo Kunimatsu, Naoto Hirose, Tetsuya Awada, Tomomi Mitsuyoshi, Kazuo Tanne, Amelogenin variants promote the proliferation and differentiation of human cementoblasts, The 113th American Association of Orthodontists Annual

Session, 2013.5.3-7, Philadelphia ( USA )

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉見 友希 ( YOSHIMI YUKI )

広島大学病院 ( 歯 ) 歯科診療医

研究者番号 : 50707081