

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462982

研究課題名(和文)象牙質シアロリントタンパク質を用いた歯周組織再生型インプラント開発への基礎研究

研究課題名(英文) Basic research toward the development of periodontal tissue regeneration implant using dentin sialophosphoprotein.

研究代表者

山越 康雄 (Yamakoshi, Yasuo)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：20182470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：象牙質中の非コラーゲン性タンパク質のうち、最も多く見出される象牙質シアロリントタンパク質(DSP)を構成する象牙質シアロタンパク質(DSP)と象牙質リントタンパク質(DPP)の生理活性作用について調べたところ、両者自身には生理活性作用はなく、象牙質に含まれるトランスフォーミング成長因子ベータ(TGF- β 1)と結合することでその活性を維持することが判明した。また歯髄組織にはDPPが存在しておらず、その理由として歯髄組織にはDSPのみを、象牙芽細胞にはDSP全長体をコードするスプライスバリエーションの違いで生じていた。以上より、DSP全長体が象牙芽細胞分化マーカーとして有用であることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We purified TGF- β 1-unbound or -bound DPP and DSP. The TGF- β 1 isoform bound to DPP and DSP was identified as being TGF- β 1 by both ELISA and LC-MS/MS analysis. DPP and DSP rescued the loss of TGF- β 1 activity suggesting that they help retain TGF- β 1 activity in porcine dentin.

We further fractionated DSP-derived proteins from the dental pulp of developing porcine incisors. DSP was identified, but little DPP could be detected. Expression of the full-length Dsp mRNA by quantitative real-time polymerase chain reaction analysis was significantly higher in odontoblasts than in pulp, while expression of the DSP-only mRNA was almost equal in odontoblasts and in the pulp. Expression of the full-length Dsp mRNA was also significantly higher than the expression of DSP-only mRNA in odontoblasts. We conclude that the alternative polyadenylation of specific mRNAs of DSP is regulated differently in pulp and differentiated odontoblasts.

研究分野：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯 タンパク質 生理活性物質 再生 遺伝子 歯髄 象牙芽細胞 象牙質

1. 研究開始当初の背景

昨今の iPS 細胞作製技術により今後さらに歯の再生技術の進歩が予想される中、歯の形成に関わるタンパク質の構造機能解析が重要な研究課題となっている。

研究代表者らは、骨とインプラント体の間に歯根膜細胞を共存させることにより、歯根膜組織を構築再生出来るかどうか取り組んできた結果、これまでにラットの臼歯を抜歯後、歯根膜の残存している抜歯窩にヒドロキシアパタイト・コーティングしたラットの歯型インプラントを移植し、一部歯根膜様の組織を再生させることに成功した (図1)。この実験では通常のインプラント手術と違い、抜歯窩に歯根膜細胞が残存した状態でインプラントを移植しており、繊維状の組織(歯根膜:PDL?)がチタン (Ti) と骨の間に再生されているのが観察できる。この結果は歯根膜細胞が存在している状態で、何らかの条件を満たせば歯根膜組織中の幹細胞より石灰化細胞へ分化誘導することが可能であり、さらに石灰化組織の間に軟組織を残すことも可能であるということを示唆している。

研究代表者らは、歯牙象牙質中の主要非コラーゲン性タンパク質である象牙質シアロリントタンパク質 (DSPP) を構成する3種類のドメインタンパク質; 象牙質シアロタンパク質 (DSP)、象牙質糖タンパク質 (DGP)、象牙質リントタンパク質 (DPP) のうち、DPP にヒト歯根膜由来培養細胞 (hPDL 細胞) を骨芽細胞に分化する誘導能があることを見出した。

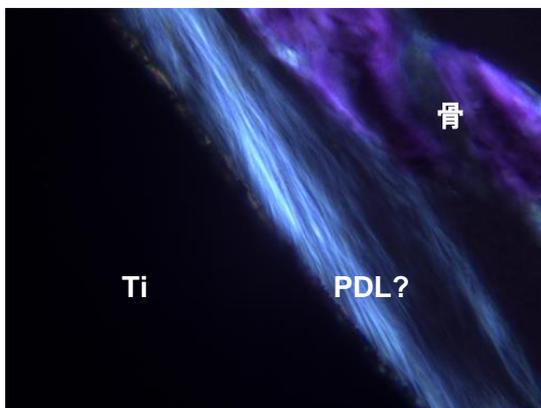


図1 ヒドロキシアパタイト・コーティングしたラットの歯型インプラント

2. 研究の目的

上記の背景を基に、本研究は象牙質中の DSP および DPP のまだ明らかにされていない機能的な研究を遂行し、チタンインプラント表面上の歯根膜細胞の性質や分化能に及ぼす影響を解析しながらまだ解明されていない基礎研究を完成し、歯周組織再生型インプラントの開発に向けた応用研究を展開することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ブタ象牙質中の DSP および DPP の生理活性作用の検出

研究代表者の方法を基にして、生後約5ヶ月のブタ永久第二大臼歯より採取した象牙質から DSP および DPP を抽出し、イオン交換またはヘパリンカラムを用いたアフィニティー高速液体クロマトグラフィーによって DSP および DPP 分離精製した。精製度および純度の検定を各ステップにおいて電気泳動およびウェスタンブロットを行って評価した。

(2) DSP および DPP を用いた細胞分化誘導実験

マウス筋芽細胞 (C2C12 細胞) および歯根膜由来培養細胞 (PDL 細胞) を継代培養した後、DSP および DPP をそれぞれ添加して細胞分化誘導を行い、骨芽細胞分化の指標であるアルカリホスファターゼ (ALP) 活性について調べた。また、ALP 活性を上昇させた画分中に含まれる生理活性物質を LC/MS 分析および ELISA によって同定した。

(3) DSP および DPP の *in vitro* TGF- β 結合実験

精製した DSP および DPP にリコンビナント TGF- β を作用させ、その結合能をイオン交換クロマトグラフィーにて測定した。

(4) 歯髓組織中の DSP および DPP の同定

生後約5か月のブタ永久歯歯胚から歯髓組織を採取後、DSP および DPP タンパク質画分を抽出し、ヘパリンクロマトグラフィー (HC) で分離後、溶出画分に対して SDS-PAGE および Western Blot を行った。さらに各画分に対して BMP1 消化を行い、消化物に対して SDS-PAGE を行った。

(5) DSPP 遺伝子のスプライスバリエーションの特定

生後約5か月のブタ永久歯歯胚から歯髓組織と象牙芽細胞の RNA を抽出し cDNA を作成した。これを鋳型に、DSPP 遺伝子の DSP から DPP 領域に架かるように設計したプライマーと DSP バリエーションのみを増幅するように設計したプライマーを用いて PCR を行い、それぞれの遺伝子発現を確認した。

4. 研究成果

象牙質中から DSP および DPP を含む画分を抽出し、イオン交換クロマトを行うと図2Aの Q3 画分に DSP および DPP が、また Q4 画分に高分子量の DSP が溶出した (図2B、2C)。また両画分には hPDL 細胞に対して ALP 活性を上昇させる TGF- β 様活性が認められた (図2D)。それら Q3 および Q4 画分に対して逆相カラムを用いた HPLC を行うと、DPP および DSP の主ピーク (画分10-11) とは異なる位置 (画分17-20) に hPDL 細胞に対して ALP 活性を上昇させる TGF- β 様活性が認められた (図3A、3B)。活性が認められた画分には微量の DPP (図3C) および DSP (図3D) が含まれていた。ま

た、ELISAによってTGF- β のアイソフォームはTGF- β 1であることが同定された(図3E)。これらの結果より、DSPおよびDPP自体には生理活性作用は無く、それらタンパク質に結合しているTGF- β 1に生理活性作用があることが判明した。

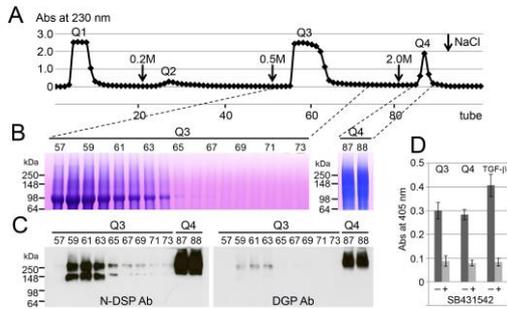


図2 ブタ象牙質中のDSPおよびDPPの分離

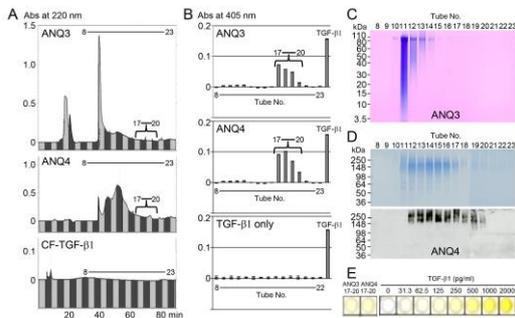


図3 TGF- β 1結合型DSPおよびDPPの分離

さらにDSPおよびDPPに結合するTGF- β 1の存在意義を明らかにするため、リコンビナントTGF- β 1を用いて、TGF- β 1が結合していないDSPおよびDPPに対する結合実験を行った。

その結果、 $1\mu\text{g}$ のリコンビナントTGF- β 1のみを 37°C でインキュベーションすると約3.6%まで活性が失活したが(CF-hTGF- β 1 only-Unbound)、DSP (DSP-Bound)およびDPP (DPP-Bound)に結合することでその活性が約10%および19%まで維持された。またTGF- β 1はコラーゲンにはほとんど結合しなかった(ColI-Bound)(表1)。このことよりDSPおよびDPPは象牙質中のTGF- β 1の活性維持に必要であることが判明した。

表1 DSPおよびDPPに対するTGF- β 1の結合量

Binding Protein	(ng)	
	Unbound	Bound
CF-hTGF- β 1 only	36.4 ± 3.01	not detected
DSP	not detected	101.8 ± 2.90
DPP	not detected	190.5 ± 7.34
Col I	24.7 ± 2.87	23.8 ± 2.04

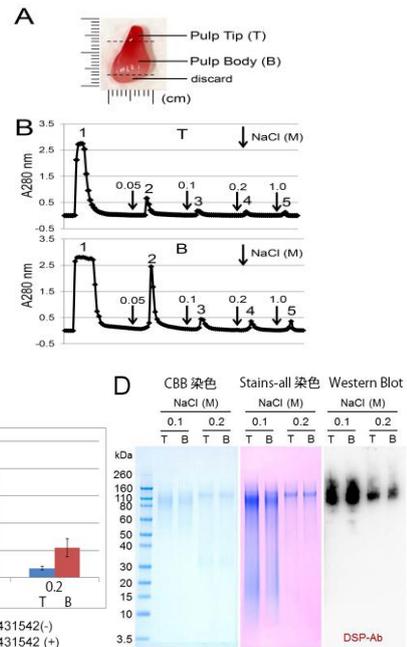


図4 ブタ歯髓組織中のTGF- β の分離

次に歯髓組織を先端部(T)および本体部(B)に分けて調製し(図4A)、NP40界面活性剤を含む細胞抽出液に混和後、超音波破碎によって得られた抽出液をヘパリン・アフィニティークロマトグラフィーで分離した。ヘパリンカラム非結合画分を溶出後、0.05, 0.1, 0.2, 1M NaClを用いてヘパリンカラム結合タンパク質をそれぞれ溶出すると(図4B)、0.1Mおよび0.2M NaCl画分に溶出される画分中にhPDL細胞に対してALP活性を上昇させる物質が含まれていることが判明した(図4C)。さらにALP活性はTGF- β 1受容体阻害物質であるSB431542で阻害された(図4C)。

また、この画分中にはDSP抗体に反応するDSPP由来タンパク質が含まれていた(図4D)。興味深いことに歯髓組織中には象牙質で見られるDPPの二重バンドがSDS-PAGE上で検出されなかったため、DSP抗体に反応したタンパク質がDSPP全長体である可能性もあったため、DSPPの初期プロセッシングに関与するBMP1を作用させてDPPが生じるかどうかを検討した結果、いずれの抽出画分にもDPPが生じないことより、歯髓組織中にはDPPが存在

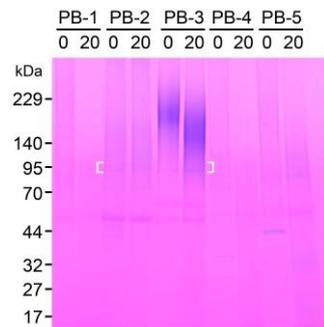


図5 ヘパリンクロマト画分に対するBMP1消化

しないことが判明した (図5)。

この理由を解明するためにリアルタイムPCRでDSPPの2つのスプライスバリエーションのmRNAの発現量を調べた結果、DSPのみのバリエーションをコードするDSP-only mRNA (DSPP-v2) の遺伝子発現量は歯髄本体部、象牙芽細胞でほぼ同じであったが、DSPP全長体をコードするバリエーションDSPP mRNA (図6 DSPP-v1AおよびDSPP-v1B) は象牙芽細胞で優位に高かった。また象牙芽細胞における2つのmRNAの発現量はDSPP mRNAがDSP-only mRNAよりも優位に高かった (図6)。この結果より、2つのDSPPバリエーションの発現を調べることで歯髄細胞から象牙芽細胞への分化を知ることが可能となった。

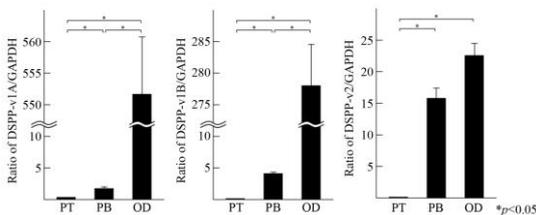


図6 DSPP スプライスバリエーションの発現

今後これらタンパク質が歯周組織再生への臨床応用に利用出来るかどうかさらに検討を行うつもりである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① E. Shimazaki, T. Karakida, R. Yamamoto, S. Kobayashi, M. Fukae, Y. Yamakoshi, Y. Asada, TGF- β and Physiological Root Resorption of Deciduous Teeth, *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), DOI:10.3390/ijms18010049, 査読有, (2017)
- ② S. Kobayashi-Kinoshita, Y. Yamakoshi, K. Onuma, R. Yamamoto, Y. Asada, TGF- β 1 autocrine signaling and enamel matrix components, *Scientific Reports*, 6:33644, DOI:10.1038/srep33644, 査読有, (2016)
- ③ R. Yamamoto, S. Oida, Y. Yamakoshi, Dentin Sialophospho- protein-derived Proteins in the Dental Pulp, *Journal of Dental Research*, 査読有, 94 巻, (2015), 1120-1127
- ④ Y. Yamakoshi, S. Kinoshita, L. Izuhara, T. Karakida, M. Fukae, S. Oida, DSP and TGF- β 1 Activity in Dentin, *Journal of Dental Research*, 査読有, 93 巻, (2014), 671-677

[学会発表] (計10件)

- ① 丹羽堯彦, 長野孝俊, 五味一博, 山越康雄, 象牙質中の DSPP 由来タンパク質の加齢に伴う変化について, 第58回歯科基礎医学会, 2016. 8. 26, 札幌コンベンションセンター (北海道, 札幌市)
- ② 大久保水羽, 小林冴子, 山本竜司, 齊藤まり, 長野孝俊, 五味一博, 大井田新一郎, 山越康雄, ブタ幼若および成熟エナメル質中の TGF- β アイソフォームについて, 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016. 8. 26, 札幌コンベンションセンター (北海道, 札幌市)
- ③ 小林冴子, 山本竜司, 大井田新一郎, 朝田芳信, 山越康雄, ブタ幼若エナメル質中の TGF- β 1 とエナメルタンパク質との相互作用について, 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016. 8. 26, 札幌コンベンションセンター (北海道, 札幌市)
- ④ 島崎絵美, 唐木田丈夫, 山本竜司, 朝田芳信, 山越康雄, 生理的乳歯歯根吸収組織の存在する TGF- β 1 の発現と破歯細胞の分化誘導調節について, 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016. 8. 26, 札幌コンベンションセンター (北海道, 札幌市)
- ⑤ 白井麻衣, 山本竜司, 小松浩一郎, 下田信治, 山越康雄, 大井田新一郎, 生理活性物質を有する脱灰骨シートを用いたインプラント周囲の骨増生, 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016. 8. 26, 札幌コンベンションセンター (北海道, 札幌市)
- ⑥ 野田千尋, 藤浪さをり, 山本竜司, 小林冴子, 大井田新一郎, 山越康雄, ブタ幼若エナメル質中のアメロゲニン・TGF- β 1 複合体と TGF- β 受容体との結合能について, 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016. 8. 26, 札幌コンベンションセンター (北海道, 札幌市)
- ⑦ 唐木田丈夫, 大井田新一郎, 山本竜司, 齊藤まり, 山越康雄, ブタ歯髄細胞の不死化と象牙芽細胞分化に及ぼす BMP2 と TGF β の影響, 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016. 8. 26, 札幌コンベンションセンター (北海道, 札幌市)
- ⑧ R. Yamamoto, S. Kinoshita and Y. Yamakoshi, DSPP-derived Proteins are Necessary for Maintaining TGF-beta Activity in Dentin, *IADR*, 2015. 3. 13, ボストン・コンベンションセンター (MA, USA)

⑨ 山越康雄, 木下冴子, 唐木田丈夫, 深江 允, 大井田新一郎, 象牙質シアロタンパク質(DSP)および象牙質リンタンパク質(DPP)と象牙質中の TGF- β 1 の相互作用について, 第 56 回歯科基礎医学会, 2014. 9. 26, 福岡コンベンションセンター (福岡県, 福岡市)

⑩ 山本竜司, 唐木田丈夫, 大井田新一郎, 山越康雄, ブタ象牙質シアロリンタンパク質(DSPP) 遺伝子のスプライスバリエーションについて, 第 56 回歯科基礎医学会, 2014. 9. 26, 福岡コンベンションセンター (福岡県, 福岡市)

[シンポジウム] (計 1 件)

① 山越康雄, オーバービュー: DSPP を形態と機能から考える, 第 57 回歯科基礎医学会・サテライトシンポジウム, 2015. 9. 11, 朱鷺メッセ (新潟県, 新潟市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山越 康雄 (YAMAKOSHI Yasuo)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号: 20182470

(2) 研究分担者

唐木田 丈夫 (KARAKIDA Takeo)
鶴見大学・歯学部・学内講師
研究者番号: 40367305

山本 竜司 (YAMAMOTO Ryuji)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号: 20410053