

ヒト培養歯根膜 (HPDL) 細胞におけるブタエナメルタンパク 分画画分の石灰化誘導能に関する影響

長野 孝 俊

鶴見大学歯学部第二歯科保存学教室
(2003年10月4日受理)

Effects of Fractionated Porcine Enamel Proteins on Osteogenesis in Human Periodontal Ligament (HPDL) Cells *in vitro*

Takatoshi Nagano

Department of Periodontics and Endodontics,
School of Dental Medicine, Tsurumi University

Accepted for publication 4 October 2003

It is well accepted that immature enamel extracts have bioactivity such as induction of osteogenesis and cementogenesis. We studied osteogenic factors in fractionated porcine enamel proteins.

Porcine enamel proteins separated into 4 fractions (fr.1-fr.4) by Sephadex G-100 gel filtration chromatography. These four fractions were tested for osteogenic activity on cell culture using human periodontal ligament (HPDL) cells assessing of alkaline phosphatase (ALP) activity, mitogenic assay, arizarin red staining, calcium content assay, and RT-PCR for osteogenic marker proteins. Exogenous growth factors BMP-2 and TGF- β 1 were also compared for osteogenic activity. The fr. 3 showed increased osteoinductive activity in HPDL cells. ALP activity enhanced by both TGF- β 1 and fr. 3 was blocked by adding anti-TGF- β antibody to HPDL cells, so fr. 3 contains TGF- β 1. Using RT-PCR for specific primer sets based upon mouse and human mRNA sequences, we detected mRNAs of TGF- β 1 and ALK-5 in ameloblast and odontoblast cell layers in porcine tooth germs.

These results show that osteoinductive activity in enamel extracts (fr.3) on HPDL cells is mediated by TGF- β 1, which may control periodontal mesenchymal cell differentiation. J Jpn Soc Periodontol 45 : 384~393, 2003.

Key words : fractionated porcine enamel protein, human periodontal ligament (HPDL) cell, alkaline phosphatase (ALP) activity, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)

要旨 : ブタ幼若エナメル質からの抽出物は骨形成能やセメント質形成能などの硬組織形成を誘導する生理活性があることが知られている。そこで本研究では、その有効成分を明らかにするために、幼若ブタ歯胚エナメル質より抽出したタンパク質を、ゲル濾過クロマトグラフィーで分画 (fr.1~4) し、ヒト培養歯根膜 (HPDL) 細胞を用いて、骨誘導能を有する画分 (fr.3) を分離した。HPDL 細胞において fr.3 はアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を上昇させ、石灰化を誘導ならびに促進した。さらに、骨芽細胞のマーカであるオステオポンチン、オステオカルシン、骨シアロタンパク質 (BSP) の遺伝子発現を増強させた。トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β) 抗体にて fr.3 を前処理すると、HPDL 細胞の ALP 活性の上昇は抑制される結果が得られたため、この fr.3 の HPDL 細胞に対する生理活性作用は TGF- β 1 によるものと考えられた。また、ブタ歯胚より調製したエナメル芽細胞層や象牙芽細胞層において TGF- β 1 の強い遺伝子発現が認められた。これらの結果からブタエナメルタンパク中には TGF- β 1 様活性物質が存在しており、歯周組織再生において未分化間葉系細胞の分化をコントロールしている可能性がある事が示唆された。

索引用語：ブタエナメルタンパク分画画分，ヒト培養歯根膜由来細胞，アルカリホスファターゼ活性，トランスフォーミング増殖因子- β 1

緒言

歯周疾患は歯周病原性細菌によって惹起される炎症性疾患であり，その病態は歯の支持組織を徐々に破壊し，歯を喪失する原因の一つとなっている。歯周疾患に対する治療法は，従来の原因因子の除去のみを主体とした方法から，原因因子を除去したうえで，さらに歯周組織の再生が期待される方法に変化してきている。これからの歯周治療の目標は破壊された歯周組織の完全な再生であり，効率良くなおかつ安全な処置法の開発が期待されている。現在行われている再生療法の一つに，発生学的に歯周組織を誘導するといわれているエナメルマトリックスデリバティブ (EMD) を利用した方法がある。

ブタ幼若エナメル質から抽出されたエナメル抽出物は骨形成^{1,2)}およびセメント質形成^{3~5)}を誘導するなどの生理活性を持つことが報告されている。さらに，*in vivo*，*in vitro* の研究から歯周組織再生を促す^{6~10)}ということで臨床応用されている。しかしながら，EMD は複数のタンパク質の混合体であるため，その有効成分や作用機序に関してはまだ十分に明らかにされていない。

ブタエナメル質からは構造タンパク質としてアメロゲン¹¹⁾，エナメル¹²⁾，シースリン^{13,14)} (アメロプラスチン¹⁵⁾，アメリン¹⁶⁾ の3種のマトリックスタンパク質とエナメリシン (MMP-20)¹⁷⁾，kallikrein-4 (EMSP-1)¹⁸⁾ の2種のエナメルタンパク分解酵素が現在同定されている。アメロゲンには細胞接着作用があり，歯周組織再生に関連する細胞の増殖，遊走を促進している可能性がある¹⁹⁾という報告や，アメロゲン遺伝子のスプライシング産物は軟骨形成能を有し，皮下に移植すると硬組織形成を誘導する²⁰⁾という報告があるが，アメロゲンノックアウトマウスの組織像では歯の萌出と歯根膜の形成が観察されることから²¹⁾，アメロゲンの歯周組織再生能に関しては否定的である。また，アメロゲン以外のエナメル¹²⁾，シースリンが骨形成および歯周組織再生に関与しているかどうかは，今のところ不明である。

ブタエナメル質中には上記の成分以外に，骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein : BMP) 様活性物質が存在していることが最近の報告で明らかとなった²⁾。さらに，EMD には口腔上皮細胞の増殖抑制作用があり，トランスフォーミング増殖因子- β

(TGF- β) とほぼ同様な作用を有しているとの報告がある²²⁾。これらのことから EMD の効果は単一の物質の作用によるというよりは，複数の物質の相互作用による可能性が高いと現在では考えられている。

歯周組織の再生に関わる歯根膜組織は不均一な細胞集団から成り立ち^{23,24)}，歯根膜中の未分化間葉系細胞は多分化能を有し，セメント芽細胞，骨芽細胞，線維芽細胞に分化し得ると考えられている。しかしながら，セメント芽細胞，骨芽細胞，線維芽細胞が共通の前駆細胞から分化するのか，それともそれぞれに特異的な前駆細胞が存在するのかどうかは，今後の検討課題として残されている。

現在，臨床で広く応用されている EMD はブタエナメルタンパクの粗抽出物であるため，どの成分に活性があるかはまだ十分に明らかにされていない。また，EMD の抗原性は非常に低いことが報告されているものの²⁵⁾，ブタの歯胚由来の抽出物をヒトに臨床応用することに対する懸念や安全性に関する問題が残っている。また，EMD による歯周組織の再生は常に起こる現象ではないという報告もあり²⁶⁾，適応症も限られていることから，臨床成績を含め，現状では完全に満足できる結果が得られていない。

そこで本研究では，より安全で効果的な歯周組織再生療法を開発するために，ブタ幼若エナメル質からエナメルタンパクを抽出し，分画して得た各分画画分のヒト歯根膜 (HPDL) 細胞への影響を検討し，生理活性物質を明らかにした。

材料と方法

1. ブタ永久歯歯胚からの幼若エナメル質と細胞群の調製

全ての操作は 4°C あるいは氷冷下で行った。

屠殺直後の約 6 カ月齢の新鮮なブタ下顎骨を持ち帰り，永久歯歯胚を摘出した。摘出した歯胚から周囲軟組織および歯髄を除去後，生理食塩水で洗浄，歯の表面に残る水分をキムワイプで拭い採集用試料とした。幼若エナメル質のチーズ様硬さの基質形成期表層ならびに深層をスパーテルで採取した。

摘出した永久歯歯胚から，歯嚢を剥いた際，エナメル器内側に存在する基質形成期エナメル芽細胞層 (SA) と，歯の表面に付着して残る成熟期エナメル芽細胞層 (MA) をサンプリングした。象牙芽細胞の調製は，歯胚から歯嚢を剥いた後に，まず最初にエナメ

ル芽細胞の混入を避けるために歯の表面をキムワイプで拭いた。歯髄組織を引き抜いた後に、デンタルエンジンとカッティングディスクを用いてエナメル質の移行期に相当する部位にて歯を横断分割し、象牙質表面に残る象牙芽細胞を、基質形成期エナメル芽細胞の位置に相当する幼若期象牙芽細胞層 (YO), 成熟期エナメル芽細胞の位置に相当する成熟期象牙芽細胞層 (MO) に分けてサンプリングした。また、引き抜いた歯髄組織の最外層を前駆象牙芽細胞層 (PO) として、中央部分を歯髄細胞 (DP) としてサンプリングした^{27,28)}。

2. エナメルタンパクの抽出と分画

採取して集めた幼若エナメル質は 0.05 M Sørensen バッファー (pH 7.4) に懸濁し、ポリトロンホモジナイザー (Kinematica, Littau, Switzerland) を用いて 6,000 rpm で 30 秒間ホモジナイズを行い、その懸濁液を 10,000×g で 10 分間遠心して可溶性画分を得た。この操作を 3 回繰り返して抽出された画分を中性可溶性画分とした。その不溶性画分を、さらに 0.05 M 炭酸バッファー (pH 10.8) に懸濁し、ホモジナイズして遠心する操作を繰り返して抽出し、アルカリ可溶性画分を得た。

抽出したアルカリ可溶性画分を限外濾過膜である YM-1 (Millipore Corporation, MA, USA) のメンブレンで濃縮後、0.05 M 炭酸バッファー (pH 10.8) で平衡化してある Sephadex® G-100 カラムにてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。波長 280 nm のモニター下で、得られた四つのピークをそれぞれ fr.1~fr.4 の画分として分離した。各画分は、0.5 M 酢酸で平衡化してある PD-10 カラム (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) にて脱塩し、凍結乾燥を行い、マイナス 30°C で保存した^{13,29)}。

3. 細胞培養

鶴見大学歯学部倫理委員会の規定に基づき、鶴見大学歯学部附属病院保存科、矯正科を受診し、実験への付与に同意の得られた健全な歯周組織を有する患者の抜去歯より Somerman らの方法に従い^{30,31)}、ヒト歯根膜 (HPDL) 由来の細胞を得た。HPDL 細胞は 10% 牛胎児血清 (FBS; Asahi Technoglass, Chiba, Japan) および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Pn-St; 50 U/ml ペニシリン G, 50 µg/ml ストレプトマイシン; GIBCO-BRL Life Technologies, Grand Island, USA) 含有 α -Modification of Eagle's Medium (α -MEM; GIBCO-BRL) にて 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。継代培養にはトリプシン-EDTA (0.05% トリプシン, 0.53 mM

EDTA; GIBCO-BRL) を用い継代数 6 回以下の細胞を実験に使用した。

4. アルカリホスファターゼ (ALP) 活性の測定

HPDL 細胞を 96 穴プレートに 5×10^5 /ml の細胞数で均一に播種後、10% FBS および 1% Pn-St 含有 α -MEM にて 37°C, 5% CO₂ 存在下の条件で培養した。24 時間後に各ウェルの培養液を 10 nM 活性型ビタミン D₃ (CALBIOCHEM Bioscience inc, La Jolla, CA, USA) を加えた培養液に交換し、1 mg/ml の各エナメルタンパク分画画分 (fr.1~4) を 50 µg/ml の濃度となるように添加した。エナメルタンパク分画画分添加 72 時間後、各ウェルは PBS で洗浄し、10 mM パラニトロフェニルリン酸, 5 mM MgCl₂, 100 mM 2-アミノ 2-メチル 1,3 プロパンジオール塩酸緩衝液 (pH 10.0) からなる反応液 100 µl を加えて 10 分間室温でインキュベーションし、反応停止に 0.2 M NaOH 50 µl を加えた。生成されたパラニトロフェノールはマイクロプレートリーダー (Bio-Rad Model 450, Hercules, CA, USA) を用い、波長 405 nm にて吸光度を測定、ALP 活性を有する画分を特定した。またこの際、HPDL 細胞の培養系にリコンビナント BMP-2 (Osteogenetics GmbH, Germany) とリコンビナント TGF- β 1 (R & D Systems Inc, MN, USA) を添加し、比較対照とした。

また、TGF- β 抗体による ALP 活性の阻害実験として、同様な条件下で培養し、24 時間後にあらかじめエナメルタンパク分画画分の fr.3 (30 µg/ml) に各々 0.1, 1, 10 µg/ml の TGF- β 抗体 (R & D Systems Inc, MN, USA) を加えて室温にて 1 時間インキュベーションして添加し、4 日後に ALP 活性を測定した。ちなみに、本方法で ALP 活性を測定すると 1 吸光度 (O.D.) あたり 0.0027 U の ALP が存在する。

5. 細胞増殖 (生細胞数) の測定

HPDL 細胞を 96 穴プレートに 3×10^4 /ml の細胞数で均一に播種後、10% FBS および 1% Pn-St 含有 α -MEM にて 37°C, 5% CO₂ 存在下の条件で培養し、ALP 活性の測定時と同様に 24 時間後から各エナメルタンパク分画画分 (50 µg/ml) を作用させた。分画画分添加 72 時間後、10 mg/ml に調製したテトラゾリウム塩 (MTT; Sigma, St. Louis, MO, USA) 10 µl を各ウェルに直接加え、さらに 4 時間培養した。培養後 PBS で洗浄し、ジメチルスルホキシド (DMSO) 100 µl を加えて 10 分間振動させ、生成されたホルマザンはマイクロプレートリーダー (Bio-Rad Model 450, Hercules, CA, USA) を用

表 1 PCR プライマー

ALP	Sense : 5'AGAGGGCCACGAAGGGGA ACT 3' Antisense : 5'GGACGGACCCTCGCCAGTGCT 3'(425 bp)
Osteopontin	Sense : 5'TGACCTCTGTGAAAACAGCGT 3' Antisense : 5'TGTACATTGTGAAGCTGTGAA 3'(301 bp)
Osteocalcin	Sense : 5'TTGTGTCCAAGCAGGAGGGCA 3' Antisense : 5'ACATCCATAGGGCTGGGAGGT 3'(304 bp)
BSP	Sense : 5'GCAGAAGTGGATGAAAACGA 3' Antisense : 5'TGGTGGTAGTATTCTGACCA 3'(448 bp)
TGF- β 1	Sense : 5'GACATGGAGCTGGTGAA 3' Antisense : 5'TCAGCTGCACTTGCAGG 3'(1067 bp)
ALK-5	Sense : 5'GGTCCTTTCTGTGCACTATG 3' Antisense : 5'GACACAGAAGTGGCACTTAC 3'(479 bp)

い、波長 570 nm にて吸光度を測定し検出した。ちなみに、本方法で細胞増殖能を測定すると、生成されるホルマザンの量は細胞数と直線的な比例関係にある。

6. 石灰化能の測定

HPDL 細胞を 24 穴プレートに 3×10^4 /ml の細胞数で均一に播種後、10% FBS および 1% Pn-St 含有 α -MEM にて 37°C, 5% CO₂ 存在下の条件で培養し、24 時間後にエナメルタンパク分画画分 (25 μ g/ml), 50 μ M アスコルビン酸, 10 mM β -グリセロリン酸, 10 nM 活性型ビタミン D₃ を添加した骨芽細胞への分化誘導細胞培養液に交換して培養した。上記の培養液を 72 時間毎に交換し 15 日間の培養後、PBS で洗浄しメタノールで 10 分間固定し、さらにミリポア水で再度洗浄した。生成された石灰化結節は 1% アリザリンレッド S (Sodium alizarin sulfonate; Sigma, St. Louis, MO, USA), 1% アンモニア水を含む染色液にて 15 分間染色した。また同様に、15 日間の培養後、HPDL 細胞に沈着したカルシウムをカルシウム C テストキット (Wako, Japan) を用いて定量した。

7. RT-PCR

HPDL 細胞を直径 6 cm シャーレに 1×10^5 /ml の細胞数で播種後、石灰化能の測定の項で記した条件で培養した。骨芽細胞への分化誘導細胞培養液は 72 時間毎に交換し、石灰化誘導開始から 1, 4, 7, 10 日目の HPDL 細胞より RNA-zol B (TEL-TEST INC, TX, USA) を用いてトータル RNA を分離し、分離した RNA を元に Ready to go You-primed First-Strand Beads kit (Amersham-Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) を用いて PCR テンプレートを調製した。グリセロアルデヒド-3 リン酸-デヒドロゲナーゼ (GAPDH) (Clontech, Palo Alto, CA,

USA) をコントロールとし、骨芽細胞への分化マーカーとして選択した各種プライマー (表 1) を用いて PCR を行い特定の遺伝子を増幅した (Perkin-Elmer/GeneAmp PCR system 9600)。PCR 反応 (94°C 5 分間/94°C 30 秒間, 55°C 30 秒間, 72°C 30 秒間) を 1 サイクルとして、計 30 サイクル/72°C 10 分間) 終了後、電気泳動で検定した。

また、ブタ歯胚よりサンプリングした組織から Strataprep Total RNA Miniprep Kit (STRATAGENE, La Jolla, CA, USA) を用いてトータル RNA を分離し、分離した RNA を元に Ready to go You-primed First Kit を用いて PCR テンプレートを調製した。GAPDH をコントロールとし、エナメルタンパクを産生しているエナメル芽細胞における TGF- β 1 の遺伝子発現状態を確認するために、TGF- β 1 とその受容体である ALK-5 プライマーを用いて (表 1) PCR を行い特定の遺伝子を増幅し、電気泳動で検定した。

8. 電気泳動

Laemmli の方法に従い³²⁾, 1% SDS を含む 15% ポリアクリルアミドゲルで各エナメルタンパク分画画分の電気泳動を行った。タンパクバンドは 0.125% Coomassie brilliant blue R 250 (CBB) に 7% 酢酸, 50% メタノール溶液を加えて調製した染色液で検出した。脱色は 7.5% 酢酸, 5% メタノール溶液にて行った。分子量測定のための標準タンパク質として、分子量マーカー (Bio-Rad Low Range standards, Hercules, CA, USA) を用いた。

PCR 反応終了後、4.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドにて染色、紫外線下で PCR プロダクトを確認した。

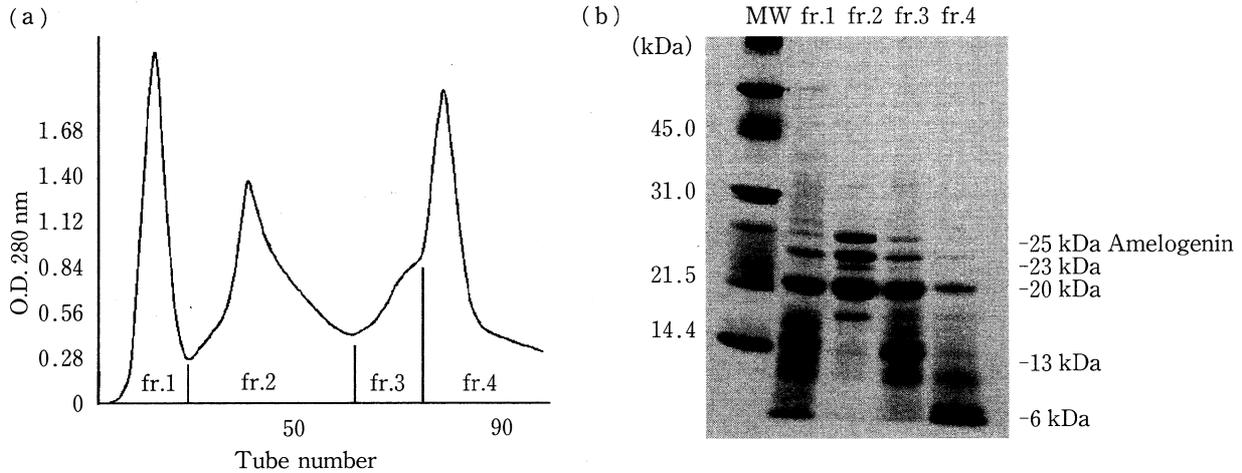


図1 エナメルタンパク抽出物のゲル濾過クロマトグラフィー (a) および電気泳動像 (b)
 幼若ブタ歯胚エナメル質より抽出したタンパク質を、流速 15 mL/hr でゲル濾過クロマトグラフィーにて分画し、得られた4つのピークをそれぞれ fr.1~fr.4 の画分として分離した。分離した各エナメルタンパク分画画分の1% SDSを含む15% ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動像を示す。MW: 分子量マーカー。

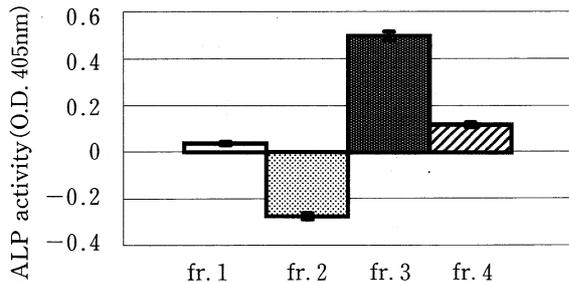


図2 ALP 活性に及ぼすエナメルタンパク分画画分の影響

分離したエナメルタンパク分画画分のうち、第3番目のピークとして回収した画分である fr.3 の影響により HPDL 細胞の ALP 活性の上昇が認められる。エナメルタンパク分画無添加群をコントロールとする。平均値±標準誤差 (n=3)。

9. 統計学的分析

データの分析には Student-t 検定を用い、有意水準を $p < 0.01$ とした。

結 果

1. エナメルタンパク抽出および分画

ブタ幼若エナメル質から中性可溶性画分は約 30% 回収され、残りはアルカリ可溶性画分として回収された。エナメルマトリックスの結晶に結合しているものは僅かであった。そこで、アルカリ可溶性画分に注目し、ゲル濾過クロマトグラフィーで分画した (図1

a)。

分画した各画分の電気泳動像 (図1 b) から、主に fr.1 は 17, 15 kDa シースリンやアメロゲニンを含み、会合体を形成している画分であることが分かった。fr.2 は 25, 23, 20 kDa アメロゲニンを、fr.3 は 13 kDa アメロゲニンを、fr.4 は 6 kDa アメロゲニンを主に含む画分であることが確認された²⁹⁾。

2. HPDL 細胞に対するエナメルタンパク画分による ALP 活性、細胞増殖への影響

エナメルタンパク画分のうち、fr.3 を HPDL 細胞の培養系に添加すると、HPDL 細胞の ALP 活性は上昇した。他の画分では ALP 活性の上昇は認められず、fr.2 を添加すると、むしろ ALP 活性が抑制された (図2)。また、リコンビナント BMP-2 を添加した場合は fr.2 と同様に ALP 活性が抑制され、リコンビナント TGF- β 1 が添加された場合では fr.3 と同様に ALP 活性が上昇した。

細胞増殖効果はどのエナメルタンパク画分による刺激においても顕著な差は認められなかった (図3)。

TGF- β 抗体で fr.3 を前処理し、その後 HPDL 細胞の培養系に添加したところ、HPDL 細胞の ALP 活性は $1 \mu\text{g/ml}$ までは濃度依存的に抑制したが、それ以上の濃度では抑制効果に変化は認められなかった (図4)。

3. fr.3 による石灰化誘導

HPDL 細胞を骨芽細胞への分化誘導細胞培養液で 15 日間培養して、各エナメルタンパク分画画分の石灰化誘導能を調べたところ、fr.3 を添加した HPDL

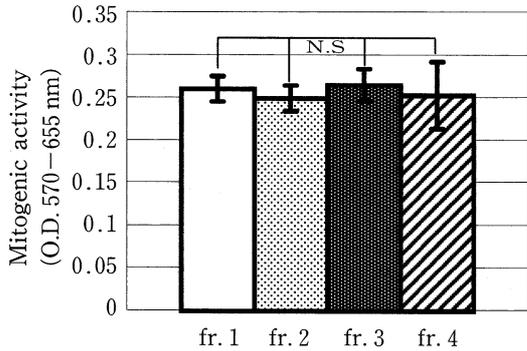


図 3 細胞増殖に及ぼすエナメルタンパク分画画分の影響

HPDL 細胞の細胞増殖効果はどのエナメルタンパク画分による刺激においても顕著な差は認められない。エナメルタンパク画分無添加群をコントロールとする。平均値±標準誤差 (n=3)。N.S.: 有意差なし。

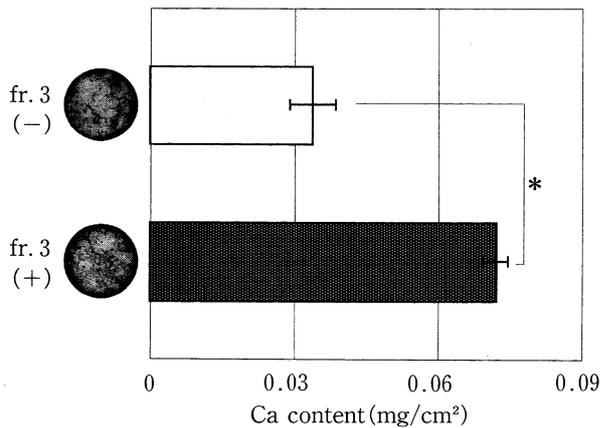


図 5 石灰化能に及ぼす fr.3 の影響

HPDL 細胞を骨芽細胞への分化誘導細胞培養液で培養して、石灰化能を調べたところ、fr.3 を添加した HPDL 細胞の方が非添加の場合よりも石灰化結節の形成を促進し、カルシウムの形成も有意に促進される。平均値±標準誤差 (n=3)。*: $p < 0.01$ 。

細胞の方が非添加の場合よりも石灰化結節の形成を促進し、カルシウムの沈着も有意に促進された (図 5)。他の画分については石灰化誘導能が確認されなかった。

また、石灰化誘導条件下での RT-PCR の結果、骨芽細胞への分化マーカーである ALP、オステオポンチン、成熟した骨芽細胞に特異的な遺伝子であるオステオカルシン、骨シアロタンパク質 (bone sialoprotein; BSP) 全てにおいて fr.3 を添加した場合の方に、より強い遺伝子発現が認められた (図 6)。ま

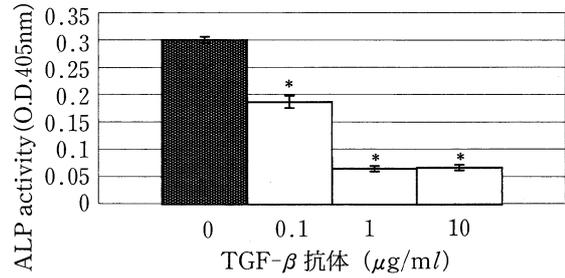


図 4 TGF-β 抗体の影響による ALP 活性の抑制効果

TGF-β 抗体で fr.3 を前処理し、その後 HPDL 細胞に添加したところ、HPDL 細胞の ALP 活性は TGF-β 抗体の影響により 1 μg/ml までは濃度依存的に「有意に」抑制するが、それ以上の濃度では抑制効果に変化は認められない。fr.3 無添加群をコントロールとする。平均値±標準誤差 (n=3)。*: $p < 0.01$ 。

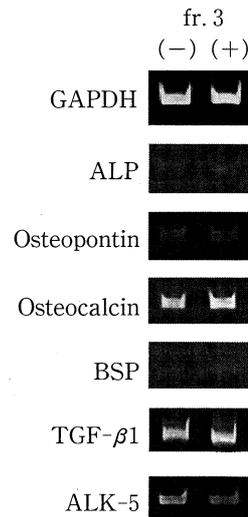


図 6 骨関連遺伝子の遺伝子発現に及ぼす fr.3 の影響

HPDL 細胞を骨芽細胞への分化誘導条件下で培養後、トータル RNA を抽出し、GAPDH 発現量で標準化した PCR テンプレートをを用いて PCR を行った結果を示す。ALP は培養開始 1 日後、オステオポンチンは 4 日後、オステオカルシン、BSP、TGF-β1、ALK-5 は 10 日後の泳動像を図示する。fr.3 を添加した場合の方に、骨関連遺伝子の発現の増強が認められる。また、TGF-β1、ALK-5 の遺伝子発現に関しては fr.3 添加による変化は認められない。

た、TGF-β1 とそのレセプターである ALK-5 の遺伝子発現に変化は認められなかった。このことから fr.3 は HPDL 細胞に作用して TGF-β1 の発現を増強さ

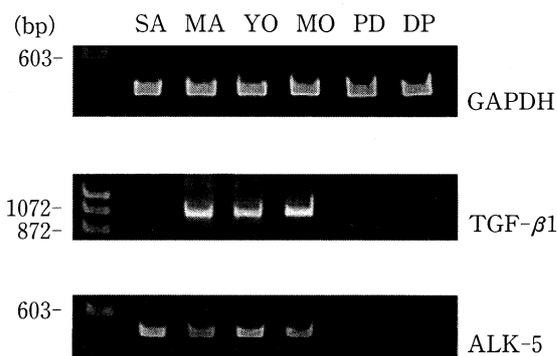


図7 プタ歯胚における TGF- β 1 および ALK-5 遺伝子の発現

ブタ歯胚からサンプリングした組織からトータル RNA を抽出し、GAPDH 発現量で標準化した PCR テンプレートを用いて PCR を行った結果を示す。図中 SA は基質形成期エナメル芽細胞層の、MA は成熟期エナメル芽細胞層の、YO は幼若期象牙芽細胞層の、MO は成熟期象牙芽細胞層の、PD は前駆象牙芽細胞層の、DP は歯髄細胞の泳動像を示す。TGF- β 1 は基質形成期エナメル芽細胞層においてはその発現は弱く、成熟期エナメル芽細胞層、幼若期および成熟期象牙芽細胞層で強い発現が認められる。また、ALK-5 はエナメル芽細胞および象牙芽細胞層において成熟度に関係なく強い発現が認められる。MW : 分子量マーカー (Molecular-size standard, PhiX 174 DNA-Hae III Digest, New England Biolabs, MA, USA)。

せることで2次的に作用するのではなく、HPDL 細胞に直接作用している可能性があることが確認された。また、他の画分については骨芽細胞のマーカー遺伝子の発現増強効果は認められなかった。

4. プタ歯胚における TGF- β 1 と ALK-5 の発現

歯の発生期における TGF- β 1 と ALK-5 の遺伝子発現を RT-PCR 法で確認したところ、TGF- β 1 は基質形成期エナメル芽細胞層においてその発現は弱く、成熟期エナメル芽細胞層、幼若期および成熟期象牙芽細胞層で強い発現が認められた。また、ALK-5 はエナメル芽細胞および象牙芽細胞層において成熟度に関係なく強い発現が認められた。それに対して、前駆象牙芽細胞層、歯髄細胞においては TGF- β 1、ALK-5 の遺伝子発現は認められなかった (図7)。

考 察

有効な歯周組織再生を実現させるために、エナメル抽出物の生理活性を、多分化能を有する HPDL 細胞

の培養系を用いて調べた。ブタ幼若エナメル質から抽出したエナメルタンパクをゲル濾過クロマトグラフィーで分画して得られた画分について調べたところ、三番目に溶出した画分 (fr.3) が HPDL 細胞の ALP 活性を上昇させ、石灰化誘導能を亢進させることが確認された。さらに、骨芽細胞への分化マーカーである ALP、オステオポンチン、オステオカルシン、BSP の遺伝子発現を調べた結果、これら全ての遺伝子に発現の増強が観察され、培養 HPDL 細胞は骨芽細胞の分化と同様の特徴を示した。歯根膜中に含まれる未分化間葉系細胞は骨芽細胞やセメント芽細胞に分化すると考えられているが、セメント質のマーカータンパクが発見されていないことから、HPDL 細胞が誘導した石灰化物が骨かセメント質かを明らかにすることは困難であったが、fr.3 による ALP 活性の上昇と石灰化誘導能の亢進は HPDL 細胞が骨芽細胞あるいはセメント芽細胞へ分化したことによるものと考えられた。

HPDL 細胞は EMD 刺激によって TGF- β 1 を産生するとの報告がある^{33,34)}が、今回の研究ではエナメルタンパク分画画分による刺激を与えても、HPDL 細胞における TGF- β 1 の遺伝子発現に変化は認められなかった。この結果は、今回実験で用いたエナメルタンパク分画画分が市販の EMD とは異なる回収、精製法で得たものであるためと考えられる。今回用いたエナメルタンパク分画画分は、幼若エナメル質から中性可溶性画分を抽出した後の不溶物に、0.05 M 炭酸バッファーを加えて可溶化したアルカリ可溶性画分から得ており、幼若エナメル質から 0.5 M 酢酸溶液で抽出した全ての可溶性画分を含んでいる⁴⁾EMD とは成分が異なると思われる。これらのことから、fr.3 は EMD のように TGF- β 1 の発現を増強させることで2次的に作用したのではなく、未分化間葉系細胞である HPDL 細胞を骨芽細胞、あるいはセメント芽細胞へ分化させるように直接的に働いたと考えられる。

この fr.3 に含まれる生理活性物質をリコンビナント BMP-2、TGF- β 1 と比較して検討した。その結果、fr.3 が HPDL 細胞を石灰化能を有する細胞に分化させる挙動はリコンビナント TGF- β 1 による挙動と同じであることが判明した。また、TGF- β 1 と似たような構造を持つ TGF- β 2 についても同様に実験を行ったところ、その作用は TGF- β 1 と比較して弱かった (データ未発表)。そこで、fr.3 画分中から TGF- β 1 の検出を試みたが、TGF- β 抗体を使用した免疫学的な方法で検出することはできなかった。したがって、その濃度は非常に低いと考えられた。しかしながら、HPDL 細胞の培養系を用いた生物学的

検出方法においては、あらかじめ TGF- β 抗体を加えて中和すると、fr.3 による ALP 活性の上昇は阻害されたことから、fr.3 画分中に含まれる生理活性物質は TGF- β 1 であることが示唆された。また、免疫学的な手法で TGF- β 1 を検出することが困難であったため、幼若ブタエナメル質に TGF- β 1 が存在している可能性があるか確認するため、歯の発生期のエナメル芽細胞および象牙芽細胞における TGF- β 1 と ALK-5 の遺伝子発現を RT-PCR 法で調べた。ブタ歯胚中のエナメル質、象牙質周囲の細胞から TGF- β 1 の強い遺伝子発現が認められ、TGF- β 1 の受容体である ALK-5 の遺伝子の発現も認められた。エナメル質、象牙質周囲の細胞から TGF- β 1 遺伝子の発現が認められたことと、TGF- β 抗体でその作用が抑制された阻害実験の結果とをあわせて考えると、幼若エナメル質中に TGF- β 1 様活性物質が存在する可能性があると結論できる。また、歯の周囲の細胞から TGF- β 1 遺伝子が発現していることから、TGF- β 1 が歯の発生過程において重要な働きをしていることが示唆された。しかしながら、幼若エナメル質中の TGF- β 1 のエナメル質形成への関与については今後の研究の課題であると考えられる。

骨の抽出物に骨誘導能がある¹⁾ことは以前から知られ、その活性物質は TGF- β スーパーファミリーの一員である BMP として³⁵⁾精製およびクローニングされた^{36,37)}。BMP は *in vivo*, *in vitro* において骨誘導能を持ち合わせており³⁸⁾、最近、ブタエナメルタンパク抽出物がマウス骨髄間葉系細胞である ST 2 の ALP 活性を著しく上昇させ、それらの活性物質がノギンによる阻害実験で BMP-2 あるいは BMP-4 である事が報告されている²⁾。今回の研究では、HPDL 細胞の ALP 活性はその BMP 様活性物質が含まれている画分である fr.2 およびリコンビナント BMP-2 で抑制され、fr.3 および TGF- β 1 による影響とは相反する結果を示した。また、マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞である MC 3 T 3-E 1 (Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan) を用いて同様に実験を行ったところ、MC 3 T 3-E 1 の ALP 活性は fr.2 で上昇し、fr.3 で抑制された (データ未発表)。これらの結果は HPDL 細胞と骨芽細胞へ分化した細胞とでは成長因子に対する反応性が異なるという可能性を示している。

今回の研究結果から、幼若ブタエナメル質には以前報告のあった BMP 様活性物質が含まれている分画画分とは別の画分に TGF- β 1 様活性物質が含まれていることが明らかとなった。TGF- β 1 は軟骨細胞には促進的に、骨芽細胞では抑制的に働くことが知られ、細胞によって働きが異なる^{39,40)}ことが報告されている

が、歯根膜由来の未分化間葉系細胞に対して、その分化の初期段階において TGF- β 1 様活性物質が働いて骨芽細胞への分化を促進していることが考えられる。さらに、幼若ブタエナメル質には BMP 様活性物質も含まれていることから、その抽出物を歯周組織再生療法に応用した際、歯槽骨中の骨芽細胞や、歯根膜中の未分化間葉系細胞から TGF- β 1 様活性物質によって分化した骨芽細胞に対して、さらに BMP 様活性物質が働いて分化を促進させるように働いている可能性があると考えられる。

現在臨床の場で広く用いられている EMD の有用性を高めるために、今後 TGF- β と BMP の相互作用の研究を進めることにより、歯周組織の再生をさらに効果的にすることができると考えられる可能性があることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導、御校閲を賜りました本学第二歯科保存学教室新井高教授に謹んで深甚なる謝意を表するとともに、御指導、御校閲を賜りました本学生化学教室深江允教授に謹んで感謝の意を表します。また本研究に対し多くの御指導、御助言を賜りました本学生化学教室大井田新一郎助教授に心より感謝致します。さらに研究の遂行にあたり、御指導と御理解を頂きました本学第二歯科保存学教室五味一博助教授、本学生化学教室田辺孝子講師ならびに日本大学松戸歯学部歯周病学講座小方頼昌教授に深く感謝致します。最後に本研究に御理解と御支援を頂きました本学第二歯科保存学教室員各位ならびに本学生化学教室員各位に厚く御礼を申し上げます。

本論文の要旨は、第 44 回秋季日本歯周病学会学術大会 (2001 年 10 月 18 日、岡山) において発表した。

なお、本研究の一部はバイオベンチャープロジェクトの補助を受け、鶴見大学歯学部ハイテクリサーチセンターにおいて実施された。

文 献

- 1) Urist MR: Bone histogenesis and morphogenesis in implants of demineralized enamel and dentin. *J Oral Surg*, 29: 88-102, 1971.
- 2) Iwata T, Morotome Y, Tanabe T, Fukae M, Ishikawa I, Oida S: Noggin blocks osteoinductive activity of porcine enamel extracts. *J Dent Res*, 81: 387-391, 2002.
- 3) Hammarström L: Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*, 24: 658-668, 1997.
- 4) Hammarström L, Heiji L, Gestrelus S: Peri-

- odontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol*, 24 : 669-677, 1997.
- 5) Heijl L : Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodontol*, 24 : 693-696, 1997.
 - 6) Boyan BD, Weesner TC, Lohmann CH, Andreacchio D, Carnes DL, Dean DD, Cochran DL, Schwartz Z : Porcine fetal enamel matrix derivative enhances bone formation induced by demineralized freeze dried bone allograft in vivo. *J Periodontol*, 71 : 1278-1286, 2000.
 - 7) Gestrelus S, Andersson C, Lidström D, Hammarström L, Somerman MJ : In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol*, 24 : 685-692, 1997.
 - 8) Schwartz Z, Carnes DL, Pulliam R, Lohmann CH, Sylvia VL, Liu Y, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD : Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2 T 9 cells, inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoblast-like MG 63 cells, and increases proliferation and differentiation of normal human osteoblast NHOst cells. *J Periodontol*, 71 : 1287-1296, 2000.
 - 9) Tokiyasu Y, Takata T, Saygin E, Somerman MJ : Enamel factors regulate expression of genes associated with cementoblasts. *J Periodontol*, 71 : 1829-1839, 2000.
 - 10) Ohyama M, Suzuki N, Yamaguchi Y, Maeno M, Otsuka K, Ito K : Effect of enamel matrix derivative on the differentiation of C 2 C 12 cells. *J Periodontol*, 73 : 543-550, 2002.
 - 11) Hu C-C, Bartlett JD, Zhang CH, Qian Q, Ryu OH, Simmer JP : Cloning, cDNA sequence, and alternative splicing of porcine amelogenin mRNAs. *J Dent Res*, 75 : 1735-41, 1996.
 - 12) Hu C-C, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zhang CH, Ryu OH, Tanabe T, Yamakoshi Y, Murakami C, Dohi N, Shimizu M, Simmer JP : Cloning and characterization of porcine enamelin mRNAs. *J Dent Res*, 76 : 1720-1729, 1997.
 - 13) Fukae M, Tanabe T : Nonamelogenin components of porcine enamel in the protein fraction free from the enamel crystals. *Calcif Tissue Int*, 40 : 286-293, 1987.
 - 14) Hu C-C, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zhang CH, Ryu OH, Tanabe T, Yamakoshi Y, Murakami C, Dohi N, Shimizu M, Simmer JP : Sheathlin : Cloning, cDNA/polypeptide sequences, and immunolocalization of porcine enamel sheath proteins. *J Dent Res*, 76 : 648-657, 1997.
 - 15) Krebsbach PH, Lee SK, Matsuki Y, Kozack CA, Yamada K, Yamada Y : Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin. A novel tooth specific gene. *J Biol Chem*, 271 : 4431-4435, 1996.
 - 16) Cerny R, Slaby I, Hammarstrom L, Wultz T : A novel gene expressed in rat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains. *J Bone Miner Res*, 11 : 883-891, 1996.
 - 17) Fukae M, Tanabe T, Uchida T, Lee SK, Ryu OH, Murakami C, Wakida K, Simmer JP, Yamada Y, Bartlett JD : Enamelysin (Matrix Metalloproteinase-20) : Localization in the developing tooth and effects of pH and calcium on amelogenin hydrolysis. *J Dent Res*, 77 : 1580-1588, 1998.
 - 18) Simmer JP, Fukae M, Tanabe T, Yamakoshi Y, Uchida T, Xue J, Margolis HC, Shimizu M, DeHart BC, Hu CC, Bartlett JD : Purification, characterization, and cloning of enamel matrix serine proteinase 1. *J Dent Res*, 77 : 377-386, 1998.
 - 19) Hoang AM, Klebe RJ, Steffensen B, Ryu OH, Simmer JP, Cochran DL : Amelogenin is a cell adhesion protein. *J Dent Res*, 81 : 497-500, 2002.
 - 20) Nebgen DR, Inoue H, Sasaby B, Wei K, Ho CS, Veis A : Identification of the chondrogenic-inducing activity from bovine dentin (bCIA) as a low-molecular-mass amelogenin polypeptide. *J Dent Res*, 78 : 1484-1494, 1999.
 - 21) Gibson CW, Yuan ZA, Hall B, Longenecker G, Chen E, Thyagarajan T, Sreenath T, Wright TJ, Decker S, Piddington, R, Harrison G, Kulkarni AB : Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem*, 274 : 31871-31875, 2001.
 - 22) Kawase T, Okuda K, Momose M, Kato Y, Yoshie H, Burns DM : Enamel matrix derivative (EM-DOGAIN®) rapidly stimulates phosphorylation of the MAP kinase family and nuclear accumulation of smad 2 in both oral epithelial and fibroblastic human cells. *J Periodont Res*, 36 : 367-376, 2001.
 - 23) McCulloch CAG : Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *Anat Rec*, 211 : 258-262, 1985.
 - 24) Roberts WE, Morey ER : Proliferation and differentiation sequence of osteoblast histogenesis under physiological conditions in rat periodontal ligament. *Am J Anat*, 174 : 105-118, 1985.
 - 25) Zetterström O, Andersson C, Eriksson L, Frenndriksson A, Friskopp J, Heden G, Jansson B, Lund-

- gren T, Nilveus R, Olsson A, Revert S, Salonen L, Sjöström L, Winell A, Ötgren A, Gestrelus S : Clinical safety of enamel matrix derivative (EMDOGAIN®) in the treatment of periodontal defects. *J Clin Periodontol*, 24 : 697-704, 1997.
- 26) Yukna RA, Mellonig JT : Histologic evaluation of periodontal healing in humans following regenerative therapy with enamel matrix derivative. *J Periodontol*, 71 : 752-659, 2000.
- 27) Oida S, Nagano T, Yamakoshi Y, Ando H, Yamada M, Fukae M : Amelogenin gene expression in porcine odontoblasts. *J Dent Res*, 81 : 103-108, 2002.
- 28) Nagano T, Oida S, Ando H, Gomi K, Arai T, Fukae M : Relative levels of mRNA encoding enamel proteins in enamel organ epithelia and odontoblasts. *J Dent Res*, 82 : 982-986, 2003.
- 29) Yamakoshi Y, Tanabe T, Fukae M, Shimizu M : Porcine amelogenins. *Calcif Tissue Int*, 54 : 69-75, 1994.
- 30) Somerman MJ, Archer SY, IMM GR, Foster RA : A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res*, 67 : 66-70, 1988.
- 31) Ogata Y, Niisato N, Sakurai T, Furuyama S, Sugiya H : Comparison of the characteristics of human periodontal ligament cells. *J Periodontol*, 66 : 1025-1031, 1985.
- 32) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, 227 : 680-685, 1970.
- 33) Lyngstadaas SP, Lundberg E, Ekdahl H, Andersson C, Gestrelus S : Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol*, 28 : 181-188, 2001.
- 34) Okubo K, Kobayashi M, Takiguchi T, Takada T, Ohazama A, Okamatsu Y, Hasegawa K : Participation of endogenous IGF-1 and TGF- β 1 with enamel matrix derivative-stimulated cell growth in human periodontal ligament cells. *J Periodont Res*, 38 : 1-9, 2003.
- 35) Kingsley DM : The TGF-beta superfamily : new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*, 8 : 133-146, 1994.
- 36) Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BA, Wozney JM : Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85 : 9484-9488, 1988.
- 37) Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA : Novel regulators of bone formation : molecular clones and activities. *Science*, 242 : 1528-1534, 1988.
- 38) Urist MR : Bone : formation by autoinduction. *Science*, 150 : 893-899, 1965.
- 39) Bonewald LF, Dallas SL : Role of active and latent transforming growth factor β in bone formation. *J Cell Biochem*, 55 : 350-357, 1994.
- 40) Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarty TL : Transforming growth factor- β gene family members and bone. *Endocr Rev*, 15 : 27-39, 1994.

連絡先 :

鶴見大学歯学部第二歯科保存学教室
〒230-8501 横浜市鶴見区鶴見2-1-3