

エナメルタンパクの炎症抑制効果

山口貴央

鶴見大学歯学部第二歯科保存学教室(指導:新井 高 教授)(受付日:2008年11月4日 受理日:2009年1月7日)

Enamel Proteins Suppress Inflammatory Reaction

Takao Yamaguchi

Department of Periodontics and Endodontics, School of Dental Medicine, Tsurumi University (Director : Prof. Takashi Arai) (Received : November 4, 2008 Accepted : January 7, 2009)

Abstract: It has been accepted that the periodontal regeneration method using the Emdogain® gel (EMD-gel) results in only a slight postoperative inflammation reaction with good healing progress. It is suspected that the enamel proteins, the main component of the EMD-gel, suppress the inflammation, which may occur during the healing process.

The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory property of enamel proteins and the enamel protein component which can suppress inflammation during periodontal disease therapy.

The enamel proteins were extracted from porcine secretary stage enamel and their inhibitory activities on the inflammatory model system were examined using cultured human gingival fibroblasts (hGFs) following stimulation with a lipopolysaccharide (LPS). In the inflammatory model system, it was confirmed that the expression levels of interleukin (IL)-6, IL-8 and the COX2 gene were enhanced by stimulation of LPS in the cultured hGFs, as was the phosphorylation of NF- κ B. The levels of enhancement of these inflammatory factors in the cultured hGFs were dose-dependently suppressed by adding the porcine enamel proteins.

To determine the component demonstrating the anti-inflammatory effect among the enamel proteins, they were separated into 7 fractions by gel filtration high performance power pressure liquid chromatography (HPLC) using a column of TSK gel G-3000PW equilibrated in a 50mM carbonate buffer (pH 10.8). The fraction showing the effective activity in the cultured hGFs system was further fractionated by gel filtration HPLC using the same column system equilibrated under the denatured condition with a 4M guanidine solution (pH 7.4). When these fractions were examined for their activities in the cultured system, their anti-inflammatory activities were based on the elution profiles of the enamel sheath protein, although the fractions contained many amelogenin derivatives. is Our findings therefore suggested that the effective anti-inflammatory component among enamel proteins was the enamel sheath proteins.

2-1-3 Tsurumi, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa, 230-8501, Japan

連絡先:山口貴央

^{〒230-8501} 神奈川県横浜市鶴見区鶴見 2-1-3

鶴見大学歯学部 第二歯科保存学教室

Takao Yamaguchi

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

E-Mail yamaguchi-takao @tsurumi-u.ac.jp

Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (J Jpn Soc Periodontol) 51(1): 38-50, 2009.

Key words : enamel proteins, sheath protein, anti-inflammatory property, human gingival fibroblast (hGF), lipopolysaccharide (LPS)

要旨:歯周組織再生療法で臨床応用されているエムドゲン[®]ゲルには術後の炎症反応が少なく,良好な治癒機転をたどることが知られていることから,主成分であるエナメルタンパクに炎症を抑制する成分が含まれると考えられる。本研究は歯周治療におけるエナメルタンパクの炎症抑制効果とそれに関与する成分を明らかとすることを目的とした。

ヒト歯肉線維芽細胞の細胞培養系でLipopolysaccharide (LPS)刺激により、IL-6、IL-8、COX2 遺伝子発現の 増強とNF-κBのリン酸化が亢進することを確認した系において、ブタ幼若エナメル質から抽出したエナメルタ ンパク粗抽出物の添加で濃度依存的に起炎状態の抑制を認めた。

そこでこのエナメルタンパク粗抽出物を 50mM 炭酸バッファー (pH 10.8) 中の TSK gel G-3000PW のカラム のゲル濾過 HPLC で7つのタンパク画分に分け,それらについて炎症抑制効果を調べたところ,特定の画分で起 炎状態の抑制を認めた。抑制効果を示した画分を 4M グアニジン溶液 (pH 7.4) による会合を抑制する条件の同 じカラムのゲル濾過 HPLC でさらに分画したところ,主要画分の特定の部位で起炎状態の抑制を認めた。各画分 の電気泳動後の解析結果から,これらの画分にはアメロゲニンの分解産物が多く含まれていたが,特にシースプ ロテインが含まれる画分において抑制効果が高かった。したがって,シースプロテインに炎症抑制効果がある可 能性が示唆された。

日本歯周病学会会誌(日歯周誌)51(1):38-50,2009

キーワード:エナメルタンパク,シースプロテイン,炎症抑制,ヒト歯肉線維芽細胞(hGF), Lipopolysaccharide (LPS)

緒 言

歯周疾患は細菌性プラークによる炎症性の疾患で、 歯肉・歯根膜・歯槽骨に炎症性変化が生じ、歯周組織 の破壊が生じる疾患である。従来より、病的歯周ポ ケットの除去と病変部のデブライドメントを目的とし てフラップ手術等の切除療法や歯周組織再生療法が適 応される。現在、再生療法としては Guided Tissue Regeneration (GTR)法とエナメルマトリックスタン パク質を応用した方法が広く用いられている^{1~4)}。

このうち、エナメルマトリックスタンパク質は、ブ タ永久歯歯胚の幼若エナメル質から得られるタンパク 粗抽出物を、エナメルマトリックスデリバティブ (EMD)として調整し、現在エムドゲン[®]ゲル (Biora, Sweden)として提供されている。当初、エナメルタン パクが主成分の EMD には、成長因子やサイトカイン 等が検出されなかったと報告⁵⁾されたが、その後の研 究によって transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), bone morphogenetic pretein-2 (BMP-2)が存在す ることが luciferase reporter gene assay で明らかとさ れ^{6,7)}, これらの増殖因子が歯周組織再生における EMD の作用機序の一つであると考えられている⁸⁾。 現在はブタ由来のウイルス感染を除外するために加熱 処理がなされているが,加熱製剤においても非加熱製 剤と同様の生物学的活性を有し⁹⁾,臨床的にも有効で あることが示されている¹⁰⁾。

歯周外科処置に EMD が臨床応用されて以来,術後 の炎症反応が少なく、治癒機転が良好であり、また非外 科処置に応用した研究においても歯周組織の再生は十 分に図れないものの、処置後の治癒機転が良好である との報告¹¹⁾がある。これについて近年、分子生物学的 にも EMD による炎症性反応の抑制を示唆する研究が なされている¹²⁻¹⁴⁾。ヒト血液に Lipopolysaccharide (LPS)またはペプチドグリカンを作用させると, tumor necrosis factor- α (TNF- α)や Interleukin 8(IL-8)が産 生されるが、EMD はそれらを抑制することが示され¹²⁾、 ラット単球の場合では LPS または prostaglandin E₂ (PGE₂)による TNF-αの産生が抑制されること¹³⁾が 報告されている。また、EMD をヒト歯肉線維芽細胞 (hGF)に作用させると、TNF-αにより誘導されるアポ トーシスが抑制されることが報告¹⁴⁾されている。こ れらから EMD が歯周支持組織である歯肉の線維芽細 胞の炎症性変化及びアポトーシスを抑制して、引き続 いて生じる炎症反応の修飾を抑制すると考えられる が、詳細な作用機序について明らかになっていない。

さらに, EMD はエナメル質形成期の複数のタンパク 質とその分解産物から構成される¹⁵⁾ため,炎症反応を 抑制する成分,およびメカニズムについては不明であ る。

歯周外科処置後の炎症反応並びに結合組織の再構築 に関わる歯肉結合組織で,hGF は最も高い割合を占 め,細胞外基質の産生や分解を行い,外来異物などに 反応して抗原の提示やサイトカイン等を産生すること で免疫応答に重要な役割を担っていると考えられてい る^{16,17)}。

そこで本研究は、EMDの主要成分であるエナメル タンパクの炎症抑制効果およびその成分を調べること を目的として、hGFを培養し、LPSで刺激した起炎状 態の実験系を確立した上で、エナメルタンパクによる 炎症反応の抑制作用について炎症性サイトカインであ る Interleukin 6 (IL-6)、IL-8^{18,19)}とアラキドン酸カ スケードに関与する酵素である Cyclooxygenase 2 (COX2)²⁰⁾遺伝子の発現、および nuclear factor- κ B (NF- κ B)シグナル伝達²¹⁾への影響について検討した。 また、これらをもとにして炎症性の反応を抑制するタ ンパク成分についても検討した。

材料および方法

1. エナメルタンパクの抽出と精製

屠殺直後の約6ヶ月齢のブタ下顎骨から摘出した永 久切歯歯胚の唇側基質形成期エナメル質を採取してエ ナメルタンパク質の試料とした。試料1gに対して 50mM 炭酸バッファー(pH 10.8) 20mlの割合で懸濁 してホモジナイズし、ほぼ全タンパク質を抽出した。 抽出物を限外濾過膜(YM-1: Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)を用いて濃縮・脱塩して凍結乾 燥し、これをエナメルタンパク粗抽出物とした^{15.22)}。

得られたエナメルタンパク粗抽出物は,50mM 炭酸 バッファー (pH 10.8) で平衡化した TSK gel G-3000PW ゲル濾過カラムを用いて,波長230nm のモ ニター下でゲル濾過 HPLC を行い,得られたピークか ら7つの画分に分画した。各画分は YM-1 の限外濾 過膜を用い,0.1M 酢酸で濃縮・脱塩して凍結乾燥し た。さらに,これらの画分のうち炎症性マーカーの発 現を抑制した画分は 4M 塩酸グアニジン溶液(0.05M Tris-HCl 緩衝液 pH7.4) で平衡化した同じカラムシス テムで HPLC を行い,得られた各画分をアンモニア水 溶液 (pH 9.0) で平衡化した PD-10 カラム (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) で脱塩して凍 結乾燥した。

2. 細胞培養

鶴見大学歯学部倫理委員会の規定に基づき,本学歯 学部附属病院を受診し,矯正治療上抜歯処置が必要と 判断された患者のうち,本実験の趣旨に同意した患者 より歯の抜去時に歯肉組織を採取した。歯肉組織を細 切して培養し,out growthした細胞をヒト歯肉線維芽 細胞(hGF)として使用した。

hGF は 10% 牛胎仔血清 (FBS; ICN Biomedicals. Inc., Solon, OH, USA), 2% ペニシリン-ストレプトマ イシン (Pn-St; 100units/ml ペニシリン G, 100 μ g/ml ストレプトマイシン; SIGMA, St.Louis, MO, USA)含 有 MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM EAGLE Alpha Modification (α -MEM; SIGMA)で 37°C, 5%CO₂存在 下で培養した。継代培養は 0.1% トリプシン-0.04% EDTA (SIGMA)を含む DULBECO'S PBS (Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan)を用いて行い, 6~8 継代の hGF を実験に使用した。

培養は hGF を 6 穴プレートに 1 × 10^5 cells/well の 細胞数で播種し、10%FBS、2%Pn-St 含有 α -MEM を 用い 37℃、5% CO₂の環境下で 2 日おきに新鮮な培地 に交換して行った。コンフルエントになったところで 血清無添加の α -MEM に交換して 24 時間経過の後に、 各試料を添加した培地に交換し、hGF の示す反応を調 べた。

刺激培地は、Lipopolysaccharide (LPS; *Escherichia coli* 0111: B4; SIGMA),エナメルタンパク画分の試料を α -MEM に加えてそれぞれ終濃度 10 μ g/ml と 100 μ g/ml に調製し、37℃、5% CO₂の環境下でプレインキュベートした後に培地として用いた。

LPS による炎症マーカーの発現は、LPS 添加培地 (10µg/ml)で培養後1,2,3,4,5,6時間後に炎症性 サイトカインである IL-6, IL-8とアラキドン酸カス ケードに関与する COX1, COX2 の遺伝子発現および NF-κBのリン酸化の状態を調べた。エナメルタンパ ク粗抽出物による炎症マーカーの抑制効果は、エナメ ルタンパク粗抽出物(50,100µg/ml)に LPS(10µg/ml) を添加した培地で2時間培養して炎症マーカーの発現 状態を調べた。また、ゲル濾過 HPLC で分画したエナ メルタンパク画分の炎症マーカーの抑制効果について も同様に行った。

3. 炎症に関する遺伝子の RT-PCR

hGF を培養し、刺激開始後一定時間経過の後に RNABee (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX, USA)を 用いて hGF からトータル RNA を抽出し, Ready to go You-primed First-Strand Beads (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA)を用いて PCR テ ンプレートを調整した。グリセロアルデヒド-3 リン

_					
	GAPDH	Sense	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'	450hm	
_		Antisense	5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'	4520p	
	IL-6	Sense	5'-ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC-3'	680bp	
_		Antisense	5'-GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT G-3'		
	IL-8	Sense	5'-CTG CGC CAA CAC AGA AAT TAT-3'	238bp	
_		Antisense	5'-ATT GCA TCT GGC AAC CCT ACA-3'		
-	COX1	Sense	5'-TGC CCA GCT CCT GGC CCG CCG CTT-3'	2026	
		Antisense	5'-GTG CAT CAA CAC AGG CGC CTC TTC-3'	quere	
	COX2	Sense	5'-TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT-3'	200hn	
		Antisense	5'-AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3'	Snaph	

表1 PCR プライマー

酸-デヒドロゲナーゼ(GAPDH) (Clontech, Palo Alto, CA, USA)を内部標準とし,炎症性サイトカインであ る IL-6, IL-8 とアラキドン酸カスケードに関与する 酵素である COX1, COX2 の遺伝子に特異的なプライ マー(表1)を用いて,94℃5分間/94℃30秒間,56℃ 30秒間,72℃30秒間を1サイクル/72℃10分間の条 件で PCR 反応 (Applied Biosystem/Gene Amp PCR System 9700)を行い,各遺伝子を増幅した。

4. ウエスタンブロット

細胞内の NF- κ B シグナル伝達について検討するため, RT-PCR の項と同条件で刺激した hGF から, 2% SDS, 0.1M DTT を含む抽出バッファーを用い, 超音 波処理後さらに 100℃ 5 分間加熱処理して細胞抽出物 を採取した。一次抗体として 1000 倍希釈したウサギ 抗 NF- κ B 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) またはウサギ抗リン酸化 NF- κ B 抗体 (Cell Signaling Technology)を用いた。

エナメルタンパク分画画分に含まれるシースプロテ インの検出には 2000 倍希釈したウサギ抗シースプロ テイン抗体²³⁾を用いた。

ウエスタンブロットは SDS 電気泳動終了後,分離 したタンパクを PVDF メンブレン (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) に 50mA の定電流で 90 分間転写した。転写後, PVDF メンブレンを 1% ウシ 血清アルブミン (BSA; SIGMA) と 0.05%Tween20 を 含むトリス緩衝液 (TBS-Tween) にてブロッキング処 理し,一次抗体を反応させた。二次抗体として,2000 倍希釈した HRP 標識されたヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technology)を反応させた。免疫反応 は ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Life Sciences) で発光させてルミノ・ イメージアナライザー LAS-1000plus (Fujifilm, Tokyo, Japan)で検出した。

5. 各種分析方法

エナメルタンパクの抽出画分又は各分画画分は Laemmli²⁴⁾の方法に従い,1%SDS を含むポリアクリ ルアミドゲルで 20mA の定電流で 80 分間泳動した。 タンパクバンドは 0.125% Coomassie brilliant blue R250(CBB)に 7% 酢酸, 50% メタノールを添加した染 色液で染色し, 7.5% 酢酸, 5% メタノールの脱色液で 脱色して検出した。

PCR 反応終了後の反応物は,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で染 色し,紫外線下で確認した。

RT-PCR の電気泳動像またはウエスタンブロット で得られた結果は, Densitograph Lane & Spot Analyzer(ATTO, Tokyo, Japan)で標準化し, 内部標準との 比を求め, 半定量化した。

炎症性反応の抑制に有効なエナメルタンパク分画画 分に含まれるタンパクバンドのアミノ酸配列解析は, SDS 電気泳動後, PVDF メンブレンに転写し, ポン ソーSで染色して得られたタンパクバンドを切り出 して解析用試料とした。アミノ酸配列解析は PPSQ-23A (Shimadzu, Kyoto, Japan)で行い, 既知のエナメル タンパクのアミノ酸配列と比較・検討した。

また, nanoLC-MS/MS による質量分析とタンパク の同定は SDS 電気泳動後, ゲルを Sil-Best Stain One (Nacalai tesque, Kyoto, Japan)による銀染色を行いタ ンパクバンドを切り出し, JBioS (Saitama, Japan)に より解析を行った。

結 果

1. エナメルタンパクの抽出

ブタ永久切歯歯胚から湿重量約1.05gの形成期エ ナメル質を採取し,約200mgの粗抽出物を得た。粗 抽出物およびEMDを同重量に調整して電気泳動を行 いCBB染色したところ,ほぼ同じ泳動像を示した(図 1)。

2. LPS 刺激よる hGF の炎症性マーカーの発現

hGF の培養系に LPS を添加して各種炎症性マー カーの発現を RT-PCR 法とウエスタンブロット法で 調べたところ, IL-6, IL-8 は刺激開始2時間後から, COX2 は1時間後から遺伝子発現が増強し,また



図1 エナメルタンパク抽出物およびエムドゲイン[®]の電気泳動像

ブタ幼若永久切歯歯胚の基質形成期エナメル質から抽出し たタンパク質とエムドゲイン[®]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。 1:エムドゲイン[®] 2:エナメルタンパク粗抽出物 共に同一のタンパクバンドを認める。



hGF を培養し,血清無添加培地に交換して24時間経過後のプレインキュベートした LPS 添加培地(10μg/ml)を加える 刺激開始時と LPS 刺激を与えてから1時間ごとに6時間,LPS 刺激を与えずに6時間で,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 を行い,半定量化した結果(a)と細胞抽出物を採取し,前処 理して SDS-PAGE の後に PVDF メンブレンに転写してウエスタンブロットを行った結果(b)を示す。LPS 刺激後2時間 からの IL-6, IL-8 と刺激から1時間後からの COX2 遺伝子発現の増強および2・3時間をピークとする NF-κB のリン酸 化が認められる。この反応は6時間経過後においても続くことが確認できる。一方,刺激前と LPS 刺激を与えないものは IL-6, IL-8, COX2 遺伝子発現の増強を認めず NF-κB のリン酸化を認めない。

NF-κBのリン酸化の程度も1時間後から強くなり、 2・3時間で最も強くなることが観察された。これらの 反応は6時間後においても継続した。ハウスキーピン グ遺伝子である COX1 遺伝子²⁵⁾の発現は LPS の影響 を受けなかった(図2)。

3. エナメルタンパク粗抽出物の各種炎症性マー カーの抑制

LPS による hGF の反応が刺激開始2時間後から生

じること、NF- κ Bのリン酸化が2・3時間で最も強く 起こることから、エナメルタンパク粗抽出物の効果は エナメルタンパク粗抽出物の添加後2時間経過時に RT-PCR 法とウエスタンブロット法で調べた。LPS の添加により、IL-6、IL-8、COX2遺伝子発現の増強 とNF- κ Bのリン酸化が観察された。エナメルタンパ ク粗抽出物の添加により、濃度依存的にIL-6、IL-8、 COX2遺伝子発現とNF- κ Bのリン酸化が抑制され た。COX1遺伝子の発現はLPS、エナメルタンパク粗 抽出物の影響を大きく受けなかった(図3)。

エナメルタンパク粗抽出物の分画と炎症性マー カー発現の抑制

エナメルタンパク粗抽出物の添加により,NF-κB のリン酸化の抑制とその標的遺伝子であるIL-6, IL-8,COX2遺伝子の発現の抑制を認めた。そのため、 多成分系であるエナメルタンパク粗抽出物から炎症性 マーカーの抑制に有効な成分を特定するために、 50mM 炭酸バッファー(pH 10.8)で平衡化した TSK gel G-3000PW ゲル濾過カラムを用いてゲル濾過 HPLC を行い分画した(図 4)。分画したエナメルタン パク画分を hGF の培養系に添加したところ,Fr.4, Fr.5と弱いながらも Fr.2でIL-6,IL-8,COX2遺伝 子の発現の抑制を認めた(図 5)。

炎症性反応の抑制を示したエナメルタンパク画 分の精製と炎症性マーカー発現の抑制

炎症性マーカーの抑制が認められた画分は 25, 23, 20, 13, 6kDa アメロゲニンと思われるタンパクバン ドと 13kDa 付近に複数のタンパクバンドを認めるた め,エナメルタンパクの会合を抑制する 4M グアニジ ン溶液中で TSK gel G-3000PW ゲル濾過カラムを用 いてさらに分画した(図 6)。これらの画分の炎症性反 応抑制作用を調べたところ,フラクションナンバー 77 (fr77)から 79(fr79)にかけて IL-6, IL-8, COX2 遺伝 子の発現の抑制と NF-κB のリン酸化の減弱を認めた (図 7)。

炎症性反応の抑制を認める画分のエナメルタン パク成分の解析

fr77 から fr79 にかけての画分で炎症性マーカーの 抑制を認めたため、これらの画分の主要タンパクバン ドについて電気泳動で分離後のアミノ酸解析の結果、 25kDa アメロゲニンとその分解産物であることが確 かめられた。さらにこれらの画分を質量分析し、タン パク質データベースに照会した結果では、各画分にア メロゲニンのフラグメントが認められ、アミノ酸配列 解析の結果を支持する結果が得られた。さらに分子量 が 13kDa のタンパクバンドでスコアが低いものの シースプロテインの複数の断片が含まれることが確か められた(図 8)。そこで、これらの画分についてウエ スタンブロット法によりシースプロテインを検出した ところ、fr77とfr79の17kDaから13kDaの分子量の 位置にシースプロテインが存在することが確認された (図 9)。これらの画分のタンパクバンドの消長と炎症 性反応の抑制の挙動から、シースプロテインが存在す る画分において特に炎症性マーカーの抑制が大きいた め、アメロゲニンとその分解産物ではなくシースプロ テインに炎症性反応の抑制作用があると考えられた。

考 察

一般に、歯周外科処置後に生じる治癒過程は術後、 組織損傷の数十分後から種々のケミカルメディエー ターが遊離されて血管透過性が亢進し、さらにアラキ ドン酸カスケードが賦活されることにより数時間後に も血管透過性が亢進する。次いで、ケミカルメディ エーターの作用によって浸潤してくる顆粒球・マクロ ファージ・リンパ球等の白血球が主役になり、さらな るケミカルメディエーターの分泌が誘導され、炎症の 病態が修飾される。その後2・3日目から組織の修復・ 上皮による再付着が始まり、結合組織による再付着は 2週目から始まり治癒に向かう²⁶⁾。この過程で生成さ れるアミン類、キニン類、アラキドン酸カスケード生 成物, サイトカインは発痛作用, 発熱作用, 血管拡張・ 透過性亢進作用を有し、それらの影響により発熱・発 赤・腫脹・疼痛といった炎症の徴候が生じて術後の臨 床所見として観察される。

EMD を用いた歯周外科処置では肉眼的に術後の発 赤・腫脹の程度が弱く、良好な治癒過程が観察されて おり、このような炎症反応の抑制は歯周組織の再生が 生じる上で重要な事象の一つであると考えられる¹¹⁾。

本研究は生物学的に起炎作用を有する LPS でヒト 歯肉組織由来線維芽細胞(hGF)を刺激して起炎状態の 系を作製し,ブタ幼若永久切歯歯胚の基質形成期エナ メル質から抽出・精製したエナメルタンパクをこの系 に添加することで,エナメルタンパクによる炎症性反 応抑制効果,さらに分画したエナメルタンパクのうち 炎症性反応を抑制する画分を構成するタンパク質につ いて検討した。

LPS はグラム陰性菌の細胞壁外膜を構成するリポ 多糖で、種々の細胞の細胞膜に存在する TLR4 に結合 し、IL-1 によるシグナル伝達と同様の経路を介して NF-κB を活性化し、炎症性サイトカインを誘導する。 産生されたサイトカインは直接的に周囲の細胞や血球 細胞に作用して連鎖的に炎症性反応を引き起こすこと が知られている²¹⁾。歯肉線維芽細胞においても TLR4





hGF を培養し、血清無添加培地に交換して 24 時間経過後、プレインキュベートした LPS(10µg/ml)およびエナメルタンパク粗抽出物 (EMP)添加培地(100µg/ml)を50µg/ml)を加えて 2 時間後にトータル 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 を行い、半定量化した結果(a)と細胞抽出物を採取し、前処理して SDS-PAGE の後に PVDF メンブレンに転写してウエスタンブロットを行い、半定量化した結果(b)を示す。

LPS 刺激による IL-6, IL-8, COX2 遺伝子発現の増強と NF-κB のリン酸化が認められる。エナメルタンパク粗抽出物 (100µg/ml と 50µg/ml)の添加により LPS 刺激による IL-6, IL-8, COX2 遺伝子発現の増強と NF-κB のリン酸化がエナ メルタンパク濃度に依存して減弱していることが確認できる。

一方で, LPS 非添加およびエナメルタンパク粗抽出物 (100μg/ml) の添加では IL-6, IL-8, COX2 遺伝子発現の増強を認め ず, NF-κB のリン酸化を認めない。



図4 エナメルタンパク粗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)

ブタ幼若永久切歯歯胚の基質形成期エナメル質から抽出したタンパク質を TSK gel G-3000PW ゲル濾過カラムで分画して 得た7つのピークを Fr.1~Fr.7の画分として分離した(a)。分離した各画分の 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(b)。34kDa エナメリン, 25, 23, 20, 13, 6kDa アメロゲニンと考えられるタンパクバンド が確認できる。



hGF を培養し,血清無添加培地に交換して 24 時間経過後, プレインキュベートした LPS(10μg/ml)およびエナメルタ ンパク分画画分(Fr.1~Fr.7)(100μg/ml)添加培地を加え て 2 時間後にトータル 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 を行い,半定 量化した結果を示す。

LPS 刺激による IL-6, IL-8, COX2 遺伝子発現の増強が認 められる。一方で, LPS 非添加(C)では IL-6, IL-8, COX2 遺伝子発現の増強を認めない。Fr.4 および Fr.5 の添加 で LPS 刺激による IL-6, IL-8, COX2 遺伝子発現の増強 が減弱していることが確認できる。

の発現が確認され、LPS により IL-6、IL-8 のサイト カイン遺伝子発現の増強と産生量が増加する^{27,28)}。 IL-6 は B 細胞の活性化や形質細胞への分化および単 球、リンパ球を増殖させ、IL-8 は好中球やリンパ球の 走化性を高めて局所への遊走を促進させるなど、共に 歯周炎等の炎症性組織に多く存在する^{19,29)}。また、炎 症に関わる酵素としての COX2 も LPS 刺激により誘 導され、発痛物質であり血管透過性の亢進や骨吸収を 促進させる PGE₂を生成するアラキドン酸カスケード に関与する²⁰⁾。

本研究においても、培地へのLPSの添加により hGF が刺激され、IL-6、IL-8、COX2 遺伝子発現の増 強と、NF-κBのリン酸化の亢進がおおむね2時間後 から生じることが観察され、LPS により起炎状態とな ることを確認した。この LPS 刺激下にある hGF の系 にエナメルタンパク粗抽出物を添加することにより, 濃度依存的な IL-6, IL-8, COX2 遺伝子発現の抑制と NF- κ B のリン酸化の抑制が観察された。さらに,エ ナメルタンパク粗抽出物の分画画分のうち,他の画分 に比べて特に Fr.4 と Fr.5 で IL-6, IL-8, COX2 遺 伝子発現の抑制効果が強いことが観察された。Fr.4 と Fr.5を比べると Fr.5 で COX2 遺伝子発現の変化 が大きかったので Fr.5 についてさらに検討を加え た。エナメルタンパクは会合体を形成することが明ら かとなっている^{30,31)}ため,会合を抑制する条件の 4M グアニジン中で Fr.5 を分画して検討したところ, fr75 から fr81 にかけて IL-6, IL-8, COX2 遺伝子発 現の抑制と NF- κ B のリン酸化の抑制が観察された。

これらの結果から、炎症性反応を抑制するタンパク を特定するために電気泳動で調べたところ、これらの 画分には複数のタンパクバンドが認められたため、電 気泳動後の各タンパクバンドをアミノ酸配列解析およ び質量分析で調べた。しなしながら、調べた限りの各 タンパクバンドはアメロゲニン又はその分解産物であ ると同定された。さらに、これらの画分のアメロゲニ ンの各分子量の消長と炎症マーカーの消長は一致して いないことがわかった。ブタ幼若エナメル質から調製 したタンパク成分の大部分はアメロゲニンとその分解 産物であるが、非アメロゲニン成分としてエナメリ ン³²⁾やシースプロテインが明らかとされている。特 にシースプロテインは17kDaから13kDaにかけての 分子量を有する^{15,21,23)}ことがわかっている。そこで 17kDa から 13kDa のタンパクバンドの質量分析の結 果を詳細に検討したところ、シースプロテインと考え られる複数の断片を確認した。

これにより, 電気泳動像で明確なタンパクバンドを 銀染色によるタンパク染色法では確認できないが, こ れらの画分で 20kDa アメロゲニンが減少し, 13kDa アメロゲニンが増加してくる fr77 から fr81 にかけて シースプロテインが溶出していると考えられた。

実際にシースプロテインを特異的に検出する抗体²³⁾を用いたウエスタンブロットで確認したところ, fr77とfr79で特に強くシースプロテインを検出した。 この17kDaから13kDaの分子量にかけてのシースプ ロテインの消長が炎症性マーカーの抑制の消長と一致 し、シースプロテインが存在した画分において特に炎 症性マーカーの抑制が大きいという結果を得た。

これらのことから、歯周外科処置時における EMD の適用による術後の炎症反応の軽減は、外来刺激によ る細胞の活性化を、エナメルタンパクのうちのシース プロテインが NF-κB のリン酸化を抑制することによ



図6 Fr.5のゲル濾過クロマトグラフィー(a)および電気泳動像(b)

Fr.5を4Mグアニジン水溶液で平衡化したTSK gel G-3000PWゲル濾過カラムで分画した(a)。分離した各画分の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(b)。25,23,20,13,6kDaアメロゲニンと思われるタンパクバンドが確認できる。





hGF を培養し、血清無添加培地に交換して 24 時間経過後、プレインキュベートした LPS(10 μ g/ml)および Fr.5の分画画 分(fr75~fr85)(100 μ g/ml)添加培地を加えて 2 時間後にトータル 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 を行い、半定量化した結果(a)と 2 時間後に細胞抽出物を採取し、前処理して SDS-PAGE の後に PVDF メンブレンに転写してウエスタンブロットを行い、半定量化した結果(b)を示す。LPS 非添加(C)では IL-6, IL-8, COX2 遺伝子発現を認めない。LPS 刺激による IL-6, IL-8, COX2 遺伝子発現の増強と NF- κ B のリン酸化が減弱しているこ とが確認できる。



(b)

MW (kDa)	Sequence
25	MPLPPHPGHPGYI-F
23	MPLPPHPGHPGYI-F
20	MPLPPHPGHPGYINF
13	LHHQII-VVQQQTQ-
	MW (kDa) 25 23 20 13

(c)

(e)

Band No	Protein name	Accession	MW	Score	Sequence
1	amelogenin	NP_998965	21256	38	WYQNMIR
2	amelogenin			12	WYQNMIR
3	amelogenin	NP_998965	21256	30	WYQNMIR
4	amelogenin			26	WYQNMIR
5	amelogenin			26	WYQNMIR
6	amelogenin	NP_998965	15022	31	WYQNMIR

(d)

MPLPPHPGHPGYINFSYEVLTPLKWYQNMIRH PYTSYGYEPMGGWLHHQIIPVVSQQTPQSHAL QPHHHIPMVPAQQPGIPQQPMMPLPGQHS MTPTQHHQPNLPLPAQQPFQPQPVQPQPHQ PLQPQSPMHPIQPLLPQPPLPPMFSMQSLLPD LPLEAWPATDKTKREEVD

1	;	MPALKIPLFK ** * * KPAVKFG	MKDWVLILCL **** MKDW	LKMSSAVPAF ** * AVTRA	PROPGTPGVA # # FVR	SLSLETMROL	GSLOGLNMLS
61	;	QYSRFGFGKS	FNSLWMHQLL	PPHSSFORMR * **	PREHETOQVE	YSLPVHPPPL	PSOPSLOPOO
121	;	PGQKPFLOPT	VVTSIONPVO	KGYPOPPIYO	GHPPLOOVEG	PWV000VAPS	EKPPEAELPG
181	;	LOFADPOOPS	MFPIARLISO	GPYPODKPSP	LYPGMFYMSY	GANGLNSPAR	LGILSSEEMA
						R	GOILSK
241	:	GGRGGPLAYG *** NGGPR	AMEPGEGGMR	PNLGGWPPNS	AKGGDFTLEF	DSPAAGTKGP	EKGEGGAEGS
301	:	PVAEANTADP	ESPALFSEVA	SGVLGGLLAN	PKGKIPNLAR	GPAGRSRGPP	GVTPADADPL
		EAAP	ESPAPLA	SECLR	CODX TOX		
361	;	MTPGLADAYE	TYGADETTTL	GLOEEWTHDS	TATPYSEHTS	MPGNKA00P0	IKROAWRFOE

図8 Fr.5の画分の電気泳動像と解析対象タンパクバンド(a),タンパクのアミノ酸配列解析結果(b)と質量分析結果(c) 及びアメロゲニンのアミノ酸配列(d)とシースプロテインのアミノ酸配列(e)

421 : P

炎症の抑制に有効と考えられた Fr.5の画分について、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行 い銀染色した像と解析対象としたタンパクバンド(a)と1mM チオグリコール酸、1%SDS を含む 15% ポリアクリルアミド ゲルによる電気泳動を行い、PVDF メンブレンに転写後ポンソーS染色し、切り出してアミノ酸解析を行った結果(b)、タ ンパクバンドに対する質量分析の結果(c)及び既知アメロゲニンアミノ酸配列と解析の結果、一致した配列(下線部)(d)と シースプロテインのアミノ酸配列及びタンパクバンド試料 5 で検出したシースプロテインのフラグメント(e)を示す。 25、23、20 kDa に認められるタンパクバンドは既知のアメロゲニンのN 末から1 番目、13kDa に認められるタンパクバン ドは N 末から 46 番目からの配列と一致する。一方で質量分析の結果得たフラグメントは25 番目からの配列と一致する。 タンパクバンド試料 6 にはアミノ酸配列分析では46 番目から始まるアメロゲニンフラグメントが含まれるが、質量分析 の結果では25 番目のフラグメントが含まれるので、このタンパクバンドには両方のアメロゲニンが含まれると考えられ る。また、タンパクバンド試料 5 にはシースプロテインと考えられるフラグメントがみられる。

り,NF-κBの核内への移行が抑制され、その結果、標 的遺伝子である IL-6, IL-8 等の炎症性サイトカイン の産生が減少すること、また COX2 の産生抑制による アラキドン酸カスケード生成物の減少により効果を示 すことが示唆された。しかしながら、多成分系である 形成期エナメル質抽出物中の効果を有する成分を単離 したわけではなく、微量な生理活性物質の混入も否定 できないため,抑制効果を有するエナメルタンパクを 特定するには、さらなる分画を行い精製する必要があ る。また、エナメルタンパクの NF-κB のリン酸化を 抑制するメカニズムを含めて、その作用機序は不明で あるので、さらに検討する必要がある。

以上のことから, EMD 中のアメロゲニンを主体と し、シースプロテインを含むエナメルタンパクが,炎



図9 エナメルタンパク分画画分に含まれるシースプロテインの検出

Fr.5の分画画分について,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行い銀染色した像(a)と PVDF メンブレンに転写してウエスタンブロットを行った像(b)を示す。銀染色では染色されていないが,ウエスタンブ ロットにより fr77, fr79, fr81 にシースプロテインの存在が確認できる。fr77, fr79 で特に強く検出され,図7 で示した遺 伝子発現の消長と一致している。

症性反応に関与するシグナル伝達経路を制御し,炎症 性変化を誘導する因子の産生を抑制することにより, 術後の歯周組織に生じる炎症反応の抑制および炎症反 応修飾の抑制が生じると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり,終始懇切なる御指導,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 なる謝意を表すと共に,御指導,御校閲を賜りました本学 生化学教室深江 允教授ならびに大井田新一郎 准教授に 謹んで謝意の意を表します。また,本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 准教授に深く感謝いたします。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51回秋季日本歯周病学会学術大会 (2008年10月19日,三重)において発表した。

文 献

- Pontoriero R, Wennström J, Lindhe J.: The use of barrier membranes and enamel matrix proteins in the treatment of angular bone defects. J Clin Periodontol. 26: 833-840, 1999.
- Sculean A, Donos N, Blaes A, Lauermann M, Reich E, Brecx M. : Comparison of enamel matrix proteins and bioabsorbable membranes in the treatment of intrabony periodontal defects. A split-mouth study. J Periodontol, 70:255-262, 1999.
- 3) Sculean A, Donos N, Miliauskaite A, Arweiler N, Brecx M. : Treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins or bioabsorbable membranes. A 4-year follow-up split-mouth study. J Periodontol, 72 : 1695-1701, 2001.
- Kalpidis CD, Ruben MP. : Treatment of intrabony periodontal defects with enamel matrix derivative : a literature review. J Periodontol, 73 : 1360–1376, 2002.
- 5) Gestrelius S, Andersson C, Lidström D,

Hammarström L, Somerman M. : In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. J Clin Periodontol, 24 : 685-692, 1997.

- Nagano T, Oida S, Suzuki S, Iwata T, Yamakoshi Y, Ogata Y, Gomi K, Arai T, Fukae M. : Porcine enamel protein fractions contain transforming growth factor-betal. J Periodontol, 77 : 1688–1694, 2006.
- 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.
- Suzuki S, Nagano T, Yamakoshi Y, Gomi K, Arai T, Fukae M, Katagiri T, Oida S. : Enamel matrix derivative gel stimulates signal transduction of BMP and TGF-β. J Dent Res, 84 : 510-514, 2005.
- 9) Nagano T, Iwata T, Ogata Y, Tanabe T, Gomi K, Fukae M, Arai T, Oida S. : Effect of heat treatment on bioactivities of enamel matrix derivatives in human periodontal ligament (HPDL) cells. J Periodontal Res, 39 : 249–256, 2004.
- 10) Bratthall G, Lindberg P, Havemose-Poulsen A, Holmstrup P, Bay L, Söderholm G, Norderyd O, Andersson B, Rickardsson B, Hallström H, Kullendorff B, Sköld Bell H. : Comparison of ready-to-use EMDOGAIN-gel and EMDOGAIN in patients with chronic adult periodontitis. J Clin Periodontol, 28 : 923-929, 2001.
- Wennström JL, Lindhe J. : Some effects of enamel matrix proteins on wound healing in the dento-gingival region. J Clin Periodontol, 29 : 9-14, 2002.
- 12) Myhre AE, Lyngstadaas SP, Dahle MK, Stuestøl JF, Foster SJ, Thiemermann C, Lilleaasen P, Wang JE, Aasen AO. : Anti-inflammatory properties of enamel matrix derivative in human blood. J Periodontal Res, 41 : 208–213, 2006.
- 13) Sato S, Kitagawa M, Sakamoto K, Iizuka S, Kudo Y, Ogawa I, Miyauchi M, Chu EY, Foster BL, Somerman MJ, Takata T. : Enamel matrix derivative exhibits anti-inflammatory properties in monocytes. J Periodontol, 79 : 535-540, 2008.
- 14) Zeldich E, Koren R, Dard M, Nemcovsky C, Weinreb M. Enamel matrix derivative protects human gingival fibroblasts from TNF-induced apoptosis by inhibiting caspase activation. J Cell Physiol, 213: 750-758, 2007.
- 15) 深江 允:エナメルタンパクの生化学,深江 允, 石川 烈,内田 隆,矢嶋俊彦,歯周組織再生とエ ナメルタンパク 第1版,永末書店,東京,2002, 111-142.
- 16) Nixon CS, Steffen MJ, Ebersole JL. : Cytokine responses to treponema pectinovorum and trepone-

ma denticola in human gingival fibroblasts. Infect Immun, 68:5284-5292, 2000.

- 17) Shimabukuro Y, Murakami S, Okada H.: Antigen-presenting-cell function of interferon gamma-treated human gingival fibroblasts. J Periodontal Res, 31: 217-228, 1996.
- 18) Bodet C, Chandad F, Grenier D.: Cranberry components inhibit interleukin-6, interleukin-8, and prostaglandin E production by lipopolysaccharide-activated gingival fibroblasts. Eur J Oral Sci, 115:64-70, 2007.
- 19) Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL. : Increased presence of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secreting fibroblast subpopulations in adult periodontitis. J Periodontol, 69 : 899-910, 1998.
- 20) 野口和行:歯周病の病因におけるプロスタグランジンの産生機構とその役割の解明について.日本歯周病学会会誌,44:322-328,2002.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol, 4: 499-511, 2004.
- 22) Fukae M, Tanabe T. : Nonamelogenin components of porcine enamel in the protein fraction free from the enamel crystals. Calcif Tissue Int, 40 : 286-93, 1987.
- 23) Fukae M, Tanabe T, Uchida T, Yamakoshi Y, Shimizu M. : Enamelins in the newly formed bovine enamel. Calcif Tissue Int, 53 : 257–261, 1993
- 24) Laemmli UK. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227 : 680-685, 1970.
- 25) 森田育男: COX-1 の生理的役割.炎症・再生, 19: 69-75, 1999.
- 26) 鴨井久一:歯周外科治療総論,鴨井久一,山田 了, 伊藤公一,標準歯周病学 第4版,医学書院,東京, 2005, 240-245.
- 27) Ren L, Leung WK, Loo TW, Jin L.: Lipopolysaccharide-binding protein down-regulates the expression of interleukin-6 by human gingival fibroblast. J Periodontal Res, 40: 407-416, 2005.
- 28) Uehara A, Takada H. : Functional TLRs and NODs in human gingival fibroblasts. J Dent Res, 86: 249-254, 2007.
- Bartold PM, Haynes DR. : Interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. J Periodontal Res, 26: 339-345, 1991.
- 30) Fukae M, Yamamoto R, Karakida T, Shimoda S, Tanabe T. : Micelle structure of amelogenin in porcine secretory enamel. J Dent Res, 86: 758-763, 2007.
- 深江 允:シースプロテインのセメント質再生能.
 鶴見歯学, 31:247-252, 2005.

32) Hu CC, 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: 1720-9, 1997.