

学位論文

骨組織におけるアモロブラスチンの役割と
骨再生療法への応用の可能性

学位申請者 飯塚 新二

広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻
先進医療開発科学講座口腔顎顔面病理病態学研究室

(主指導教員：高田 隆教授)

2009年

謝辞

本研究に際して、終始ご懇篤なる直接のご指導を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻先進医療開発科学講座口腔顎顔面病理病態学研究室 高田 隆教授に心から感謝の意を表します。また、本論文の作成にあたり、ご教示、ご校閲を賜りました探索医科学講座口腔細胞生物学研究室 内田 隆教授ならびに先進医療開発科学講座歯周病態学研究室 栗原英見教授に深甚なる謝意を表します。

さらに本研究の遂行および論文作成にあたり、多くのご指導、ご助言を賜りました先進医療開発科学講座口腔顎顔面病理病態学研究室宮内睦美准教授、工藤保誠学内講師を始めとする同研究室の皆様方、本学病院口腔検査センター小川郁子診療准教授に深謝いたします。

最後に、勉学、研究の機会を与えるとともに、常に私を支えてくれた両親と家族に心から感謝致します。

目次

I . 緒言 6

II . 材料および方法 8

実験 I : 骨組織および骨芽細胞におけるアメロブラスチンの発現に関する検討

1. マウス骨芽細胞の分離と培養
2. マウス骨組織および骨芽細胞からの mRNA の抽出
3. マウス骨組織におけるアメロブラスチンの発現 (RT-PCR 法)
4. ヒト骨肉腫症例におけるアメロブラスチンの発現 (免疫組織化学染色酵素抗体法)
5. ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株におけるアメロブラスチンの発現 (免疫組織化学蛍光抗体法)

実験 II : 骨芽細胞分化に対するアメロブラスチンの影響に関する検討

1. siRNA によるアメロブラスチン発現抑制の骨芽細胞に対する影響
 - a. siRNA によるアメロブラスチンの発現抑制
 - b. 石灰化関連因子 mRNA の発現 (real time RT-PCR 法)
 - c. 石灰化物形成能の測定 (Alizarin 染色法)

2. 遺伝子導入によるアメロブラスチン過剰発現の骨芽細胞に対する影響

- a. アメロブラスチン遺伝子のクローニングと遺伝子導入
- b. 石灰化関連因子 mRNA の発現 (real time RT-PCR 法)
- c. 石灰化物形成能の測定 (Alizarin 染色法)

3. アメロブラスチンによる石灰化促進作用の機序に関する検討

実験Ⅲ：骨組織再生に対するアメロブラスチン合成ペプチドの影響に関する検討

1. アメロブラスチン合成ペプチドの作製部位の決定

2. *In vitro* における石灰化に対するアメロブラスチン合成ペプチドの影響

- a. アメロブラスチン合成ペプチド相当塩基配列の遺伝子導入
- b. 石灰化関連因子 mRNA の発現 (RT-PCR 法)
- c. アルカリホスファターゼ活性の測定
- d. 石灰化物形成能の測定 (Alizarin 染色法)

3. *In vivo* における人工的骨欠損治癒に対するアメロブラスチン合成ペプチドの影響

- a. ラット頭蓋骨骨欠損モデルの作成と合成ペプチドの移植
- b. 骨治癒の評価

実験 I : 骨組織および骨芽細胞におけるアメロブラスチンの発現に関する検討

1. マウス由来骨組織および骨芽細胞におけるアメロブラスチンの発現
2. ヒト骨肉腫症例および骨芽細胞様細胞株におけるアメロブラスチンの発現

実験 II : 骨芽細胞分化に対するアメロブラスチンの影響に関する検討

1. siRNAによるアメロブラスチン発現抑制の骨芽細胞に対する影響
 - a. 各種骨芽細胞様細胞株における石灰化関連因子 mRNA の発現
 - b. アメロブラスチン発現抑制の石灰化関連因子 mRNA の発現に対する影響
 - c. アメロブラスチン発現抑制の石灰化物形成能に対する影響
2. 遺伝子導入によるアメロブラスチン過剰発現の骨芽細胞に対する影響
 - a. アメロブラスチン過剰発現細胞におけるアメロブラスチンタンパクの発現

b. アメロブラスチン過剰発現の石灰化関連因子 mRNA の発現に対する影響

c. アメロブラスチン過剰発現の石灰化物形成能に対する影響

3. アメロブラスチンによる石灰化促進作用の機序に関する検討

a. 骨芽細胞におけるアメロブラスチン結合タンパクの検討

b. 細胞内シグナル伝達機構

実験Ⅲ：骨組織再生に対するアメロブラスチン合成ペプチドの影響に関する検討

1. アメロブラスチン合成ペプチド作製部位の決定

2. *In vitro* におけるアメロブラスチン合成ペプチドの骨芽細胞の石灰化に対する影響

a. 石灰化関連因子 mRNA の発現に対する影響

b. アルカリホスファターゼ活性に対する影響

c. 石灰化物形成能に対する影響

3. *In vivo* におけるアメロブラスチン合成ペプチドの骨組織再生に対する影響

IV. 考察..... 31

1. 骨組織におけるアメロブラスチンの発現と役割

2. 骨芽細胞分化におけるアメロブラスチンの役割

3. アメロブラスチンの骨芽細胞における石灰化促進の機序	
4. アメロブラスチン合成ペプチドの骨組織再生療法への応用の可能性	
V. 結論.....	41
VI. 文献.....	43
表・図	55

1. 緒言

近年、歯周組織再生治療におけるブタ幼若歯胚由来エナメルタンパク粗抽出物である EMDOGAIN® (EMD: 生化学工業株式会社, Tokyo, Japan) の臨床的有用性が数多く報告され¹⁻⁴⁾、EMD の歯周組織再生メカニズムに関する詳細な研究により、その効果は cementogenesis に留まらず osteogenesis の促進にも関与していることが明らかとなってきた^{5,6)}。すなわち、EMD は、bone morphogenetic protein (BMP) や transforming growth factor- β (TGF- β) の活性と良く似た作用を有し⁷⁾、*in vitro* において、骨芽細胞の増殖や分化を促進させる⁸⁾。しかし、EMD には、アメロゲニンを初め、アメロブラスチンやエナメルリン、タフテリンなどの多くのエナメルタンパクに加え、エナメルタンパク分解酵素であるカリクレイン 4 やエナメライシン (MMP-20) も含まれており⁹⁻¹⁶⁾、どの成分に EMD の有する歯周組織再生効果があるのか未だ不明な点が多い。

我々の研究室では、歯周組織再生におけるアメロブラスチンの有用性に着目し、その合成ペプチドが歯周靭帯細胞に与える影響について検討した結果、アメロブラスチン N 末端部の構造が歯周靭帯細胞の増殖や石灰化誘導に促進的に働いている可能性を示してきた。エナメルタンパクのひとつであるアメロブラスチンは、歯の発生段

階に空間・時間特異的に発現する遺伝子としてクローニングされ¹⁷⁻¹⁹⁾、歯牙形成期において上皮-間葉相互誘導の signal molecule として関わる可能性が示唆されている。また、アメロブラスチンの遺伝子座は硬組織に深い関係をもつタンパク群 (dentin sialophosphoprotein, dentin matrix protein1, bone sialoprotein, matrix extracellular phosphoglycoprotein, osteopontin など) の遺伝子とともに4番染色体長腕に位置しており²⁰⁾、最近の報告では、ラット発生段階における骨組織でのアメロブラスチン発現が mRNA/タンパク質レベルで確認されている²¹⁾。さらに、骨芽細胞様細胞を特定の条件で培養することでアメロブラスチンの発現が上昇すること²²⁾からも、アメロブラスチンの骨形成との関係が示唆されている。

そこで、本研究では、まずアメロブラスチンの骨組織における役割について検討し、さらに骨再生療法への応用の可能性について検討した。

II. 材料および方法

本研究における実験については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「広島大学自然科学研究支援開発センター生命科学研究支援分野・ライフサイエンス教育研究支援部・動物実験施設における動物実験の倫理指針」などの関連法規・指針に従い、広島大学当該倫理審査委員会等において承認されている。

実験 I : 骨組織および骨芽細胞におけるアメロブラスチンの発現に関する検討

1. マウス骨芽細胞の分離と培養

初代培養骨芽細胞の採取は、出生直後のマウス (C57BL/6J, 日本チャールズリバー株式会社, Kanagawa, Japan) を安楽死後、頭蓋骨を取り出し、35mm 径 dish (Beckton, Dickinson and company, New Jersey, USA) に静置し、FUNGIZONE (250 μ g/mL, AMPHOTERICIN B, Invitrogen Corporation, New York, USA) および抗生剤 (Penicillin-Streptomycin, 100U/mL (Invitrogen)) を加えた 10% fetal bovine serum (FBS (invitrogen)) 含有 Minimum Essential

Medium Alpha medium (α -MEM) (Invitrogen)にて 0.5%CO₂、37℃環境下で培養し、細胞のコロニーが確認できた時点で dish に接着した細胞のみを残し、浮遊細胞および頭蓋骨組織片を除去した。その後、Penicillin-streptomycin, 100U/mL を添加した 10% FBS 含有 α -MEM にて培養した。

2. マウス骨組織および骨芽細胞からの mRNA の抽出

骨組織においては、マウス椎骨組織を剖出し、液体窒素(株式会社 中村酸素, Hiroshima, Japan)内にて粉碎し mRNA 抽出に用いた。また、初代培養骨芽細胞においては、実験 I -1 で示した方法により培養した細胞を用い、以降の mRNA 抽出に用いた。

mRNA 抽出には、RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, Ca., Hilden, Germany) を用い、total RNA を抽出し、吸光度計 (NANODROP1000, Thermo Fisher Scientific K.K., Kanagawa, Japan) により RNA 濃度を測定した。

3. マウス骨組織におけるアメリロラスチンの発現 (RT-PCR 法)

実験 I -2 で抽出した mRNA 1 μ g の total RNA から ReverTra Ace- α -TM (TOYOBO CO., LTD., Osaka, Japan) を用い、cDNA 合成を行った。

PCR は、rTaq-DNA polymerase (Qiagen) を使用し、DNA サーマルサイクラー (MyCycler™, Bio-Rad Laboratories, California, USA) を用いて DNA を増幅した。PCR 条件は、変性反応 (94°C、30 秒)、アニーリング反応 (30 秒)、伸長反応 (72°C) を 1 サイクルとして 30 サイクル増幅した。72°C、10 分で DNA 鎖を完全に伸長させた後、反応液を 1.5% Agarose-Me gel (ナカライテスク株式会社, Kyoto, Japan) で電気泳動し、ethidium bromide solution (片山化学工業株式会社, Osaka, Japan) にて可視化した。用いた primer は、表 1 に示す。

4. ヒト骨肉腫症例におけるアメロブラスチンタンパクの発現 (免疫組織化学染色酵素抗体法)

ヒト骨組織におけるアメロブラスチンの発現を検討するため、ヒト骨肉腫症例のパラフィン包埋切片を用いて免疫組織化学染色によりアメロブラスチンの発現を検討した。

免疫組織化学染色には、DAKO-ENVISION system (DAKO : DAKO Denmark A/S., Produktionsvej, Denmark) を用いた。0.3% 過酸化水素水 (SIGMA: シグマアルドリッチジャパン株式会社, Tokyo, Japan) 添加メタノール (純正化学株式会社, Tokyo, Japan) にて内因性パーオキシダーゼ処理を 30 分間行った後、Protein Block

(DAKO)を用いて 4℃で 30 分間ブロッキング処理を行った。その後、抗アメロブラスチンポリクローナル抗体 (W59:広島大学探索医科学講座口腔細胞生物学研究室内田 隆教授より供与)を用いて 4℃、24 時間インキュベートした。抗アメロブラスチン抗体は、原液を 100 分の 1 に希釈して用いた。PBS で洗浄後、HRP 標識ポリマー結合二次抗体 (DAKO) を 30 分間作用させた。発色には、過酸化水素含有 Tris-HCl に 0.025% 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride を添加したもの (DAKO) を用い、その後ヘマトキシリン (サクラファインテックジャパン, Tokyo, Japan) で核染色し、光学顕微鏡にて観察した。また、陽性コントロールとして、形成期歯胚を含む生後 3 日齢マウスの顎骨の脱灰・パラフィン標本についても同様の染色を行った。

5. ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞におけるアメロブラスチンタンパクの発現 (免疫組織化学蛍光抗体法)

ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 (NOS-1:RIKEN Bioresource Center Cell Bank, Ibaraki, Japan) をタンパク分泌阻害薬である monensin sodium salt (SIGMA) を 5 μ M 濃度で添加した培地にて 4 時間培養し、アメロブラスチンタンパクの発現を蛍光抗体法により検討した。

蛍光抗体法には、カバーガラス (MATSUNAMI GLASS IND., LTD., Tokyo, Japan) 上で培養した NOS-1 細胞を用いた。細胞の付着したカバーガラスを PBS でよく洗い、4%ホルムアルデヒド溶液 (和光純薬工業株式会社, Osaka, Japan) で 15 分間固定した後、0.1% Triton X-100 (Roche: F. Hoffman-La Roche, Ltd., Basel, Switzerland) を含む PBS にて膜透過性亢進処理を行った。3% BSA (SIGMA) 含有 PBS にてブロッキングを 10 分間行い、アメリロブラスチンポリクローナル抗体 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC., California, USA) を用い、室温にて 30 分間インキュベートした。PBS で洗浄後、蛍光標識 Alexa Fluor-488 ポリクローナル 2 次抗体 (Invitrogen) を 30 分間作用させ、洗浄の後、蛍光顕微鏡 (Axio Observer. Z1. Carl Zeiss MicroImaging Co., Ltd., Jena, Germany) にて観察した。

実験 II : 骨芽細胞分化に対するアメリロブラスチンの影響に関する検討

1. siRNA によるアメリロブラスチン発現抑制の骨芽細胞に対する影響

a. siRNA によるアメリロブラスチンの発現抑制

NOS-1 細胞におけるアメロブラスチンの発現を抑制するため、siRNA 用にデザインされたアメロブラスチン特異的な配列のオリゴヌクレオチド (GGCCAAGAGAACAUGAAACTT および UGACCACAUCCGUGGAUUU : siRNA-Ambn) を Oligofectamine (Invitrogen) を用いて導入した。

siRNA-Ambn 導入 24 時間後に石灰化誘導培地 (50 μ g/ml ascorbic acid (SIGMA) と 3mM sodium β -glycerophosphate (SIGMA) を添加した α -MEM 培地) に培地を交換し、培地交換後 4 日目の細胞を回収し、real time RT-PCR 法にてアメロブラスチンの発現抑制を確認した。

b. 石灰化関連因子 mRNA の発現 (real time RT-PCR 法)

実験 II.1-a と同様に培養、回収した RNA より合成した cDNA を用い、表 1 に示す石灰化関連因子に特異的なプライマーを作成し、Mx3000P Real-Time QPCR System (Agilent Technologies Company, Inc., California, USA) を用いて定量 PCR を行った。反応産物は、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を指標とし、MxPro™ Software version 4.00 (Agilent Technologies) を用いて定量化した。

c. 石灰化物形成能の測定

6 well 培養プレート (Beckton, Dickinson and company) に実験

II.1-aと同様に培養した NOS-1 細胞を PBS で洗浄後、10%中性緩衝ホルマリン (SIGMA)にて固定し、0.01% alizarin red S (片山化学工業株式会社)にて染色した (ALZ 染色法)。

染色後の各細胞群の写真を撮影した後、Gregory CA らの方法⁵⁶⁾に従い、10% w/v cetylpyridinium chloride (CPC: 東京化成工業株式会社, Tokyo, Japan) および 0.2M monobasic sodium phosphate (SIGMA), 0.2M dibasic sodium phosphate (SIGMA) により染色された色素を脱色し、その脱色液を用いて 562nm にて分光光度計により濃度を測定したものを石灰化量として定量した。

2. 遺伝子導入によるアメロブラスチン過剰発現の骨芽細胞に対する影響

a. アメロブラスチン遺伝子のクローニングと遺伝子導入

NOS-1 cDNA より PCR 法でアメロブラスチン遺伝子をクローニングし(用いた primer は表 1 参照)、pcDNA3.1 ベクター (Invitrogen) に組込んだ。その後、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用い、アメロブラスチン N 末端部に FLAG タグを付与した。

作成したベクター (pcDNA3.1.FLAG-Ambn) の遺伝子導入には、Oligofectamine-plus-(Invitrogen) と FuGENE HD (Roche) を用いた。導入は、2.5 μ g のベクターを、あらかじめ 10 μ L の遺伝子導

入試薬を加えた 200 μ L の Opti-MEM (Invitrogen) によく混和し、20 分間室温でインキュベート後、直径 6cm-dish で培養下 sub-confluent の骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 (SaOS-2 および HOS : RIKEN Bioresource Center Cell Bank, Ibaraki, Japan) に加え、37°C で 48 時間した。その後、G418 (Invivogen, California, USA) 500 μ g/mL 濃度で含む選択培地にて、2 週間培養後、安定的にアメリロブラスチンを発現する細胞株 (アメリロブラスチン過剰発現細胞) を樹立し、実験に用いた。

作製したアメリロブラスチン過剰発現細胞でのアメリロブラスチンの発現を、Western Blot 法にて FLAG-tag 抗体 (CST : Cell Signaling Technology, Inc., Boston, USA) を用い確認した。

タンパクの抽出 および Western Blot 法は、以下に示す方法で行った。

タンパクの抽出は、Triton lysis buffer [50mM Tris-HCl (pH7.4), 125mM NaCl, 2% Triton X-100 (Roche), 5mM EDTA, 0.1M NaF, 10 μ g/mL leupeptin (SIGMA), 0.1 μ g/mL trypsin inhibitor, 0.1 μ g/mL aprotinin (SIGMA), 50 μ g/mL phenylmethylsulfonyl fluoride (和光純薬)] を用いて行い、Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories) によりタンパク濃度を測定した。20 μ g

のタンパクを Laemmli' s sample buffer に混和し、100°C で 3 分間 denature した後、8-10% sodium dodecyl sulfate (SDS : GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社, Tokyo, Japan)-polyacrylamide gel で電気泳動 (SDS-PAGE) し、ニトロセルロースメンブレン (PROTRAN, WHATMAN, GmbH., Dassel Germany) に転写した。転写後のメンブレンを、5%スキムミルク (森永製菓株式会社, Tokyo, Japan) 含有 PBS buffer [137mM NaCl (SIGMA), 8.1mM Na₂HPO₄-12H₂O (SIGMA), 2.68mM KCl (和光), 1.47mM KH₂PO₄ (和光)] に浸し、室温で 1 時間インキュベートした後、一次抗体を 5%スキムミルク含有 PBS buffer にて希釈し、室温で 2 時間インキュベートした。二次抗体は、抗 mouse または抗 rabbit biotinylated secondary antibody (GE) を用い、室温で 1 時間インキュベートした。目的抗原の化学発光検出には、ECL western blotting detection system (GE) を用いた。

b. 石灰化関連因子 mRNA の発現 (real time RT-PCR 法)

アメロブラスチン過剰発現 SaOS-2 細胞 (FLAG-Ambn) と SaOS-2 細胞を抗生剤 (Penicillin-streptomycin, 100U/mL) および 10%FBS 含有 RPMI-1640 (WAKO) に 50 μg/ml ascorbic acid と 3mM sodium β-glycerophosphate を加えた培地にて 4 日間培養し、実験 II.1-b と

同様の方法で real time RT-PCR 法にて石灰化関連因子 mRNA 発現の検討を行った。

c. 石灰化物形成能の測定

HOS 細胞およびアメロブラスチン過剰発現 HOS 細胞を石灰化誘導培地にて培養した。培養 10 日および 15 日目の細胞を用い、実験 II-1-c と同様の方法で ALZ 染色法にて石灰化物形成能の検討を行った。

3. アメロブラスチンによる石灰化促進作用の機序に関する検討

SaOS-2 および FLAG-SaOS 細胞を用い、アメロブラスチンによる骨芽細胞の石灰化促進作用の機序について、実験 II-2-a と同様の方法で Western blot 法にて検討した。検討にあたり以下の抗体を用いた。過剰発現したアメロブラスチンの検出に抗 FLAG-tag 抗体 (CST)、アメロブラスチンとの結合が考えられているタンパク質である CD63 (santa cruz biotechnology, inc) に対する抗体、細胞内シグナル伝達系の解析に抗 phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2 : CST) 抗体、転写因子の活性化の検討に抗 phospho-Elk1 (Ser383 : CST) 抗体を用いた。

また、アメロブラスチンと結合するタンパク質の検討には、免疫沈降法を用いた。Total 1mg のタンパクに、Triton lysis buffer を加え 1mL に調整した後、FLAG-tag 抗体を 4 μ l 加え、4 $^{\circ}$ C で 3 時間

回転混和した。次に、 $20\mu\text{l}$ の protein G agarose (Roche) を加え、さらに 4°C で 3 時間回転混和した。その後、遠心して上清を除いたペレットに、sample buffer を $15\mu\text{l}$ 加え、 100°C で 3 分間 denature し、遠心後、この上清を Western blot 法を用いて解析した。

実験 III：骨組織再生に対するアメロブラスチン合成ペプチドの影響に関する検討

1. アメロブラスチン合成ペプチド作製部位の決定

予備実験により石灰化と関連しない細胞におけるアメロブラスチンのバリエーションの存在が示唆されたため、アメロブラスチン mRNA に対する各種 primer (表 2) を作製し、RT-PCR 法にてアメロブラスチン mRNA の発現状況についての検討を行った。なお、本実験には、石灰化非関連細胞として口腔扁平上皮癌細胞株 HSC2 (Japanese Cancer Research Resources Bank (Osaka, Japan) より供与) より抽出した mRNA を用いた。

2. *In vitro* における石灰化に対するアメロブラスチン合成ペプチドの影響

実験 III-1 による検討で、骨芽細胞の石灰化を促進する部位として同定されたアメロブラスチンの活性部位に対するペプチド (AMB-N:

H-VPFFPQQSGTPGMASLY-OH)の合成を、solid phase peptide synthesis 法にて行った。合成は、倉敷紡績株式会社 (Osaka, Japan) に委託した。

a. アメロプラスチン合成ペプチド相当塩基配列の遺伝子導入

マウス頭蓋骨由来前骨芽細胞 MC3T3-E1 を用い、実験 II-2-a と同様の方法にてアメロプラスチン合成ペプチド相当塩基配列 (AMB-N) に相同する塩基配列を遺伝子導入した AMB-N 過剰発現細胞を作製した。遺伝子導入には、分泌ドメイン (PPT-LS ; preprotrypsin leader sequence) を有するベクター (pFLAG-CMV3) とそうでないベクター (pFLAG-CMV4) を用い、合成した AMB-N を細胞外へ分泌する骨芽細胞株 (M3a 細胞) とそうでない骨芽細胞株 (M4a 細胞) を樹立し、実験に用いた。

b. 石灰化関連因子 mRNA の発現 (RT-PCR 法)

MC3T3-E1 細胞を用い、AMB-N 添加による影響と AMB-N に相同する塩基配列を実験 II-2-a と同様の方法で遺伝子導入し、その石灰化に対する影響を実験 1-3 と同様の方法で RT-PCR 法にて石灰化関連因子 mRNA の発現について検討した。

c. アルカリホスファターゼ活性の測定

24well培養プレートに 5×10^3 cells/well の割合で M3a および M4a 細胞を播種し、2%FBS 含有 α -MEM にて培養した。2 週後に細胞を回収し、以下に述べる酵素化学的なアルカリホスファターゼ活性の測定を行った。

培養細胞を PBS にて洗浄後、超音波ホモジナイザー (Handy Sonic model UR-20P, 株式会社トミー精工, Tokyo, Japan) により、10mM Tris-HCl buffer (pH7.4, 500 μ l) 中で 1 分間破碎撹拌した。次いで、25 μ l の細胞破碎液に 125 μ l ALP buffer (0.1M carbonate buffer, pH9.8, 6.7mM p-nitrophenyl phosphate, 2mM MgCl₂) を加え、30 分間、37°C でインキュベートした。0.2N NaOH 125 μ l を加えて反応を終了させた後、マイクロプレートリーダーを用いて 405nm における吸光度を測定した。また、これと並行し、細胞破碎液を用いて DNA 量を NANODROP にて測定し、DNA 1 μ g 当たりの ALP 活性を測定した。

d. 石灰化物形成能の測定

6well 培養 plate にサブコンフルエントの状態 で M3a および M4a 細胞を播種し、石灰化誘導培地にて培養し、実験 II-1-c と同様の方法で石灰化物形成能の検討を行った。

3. *In vivo*における人工的骨欠損治癒に対するアメリロブラスチン合成ペプチドの影響

実験には、7週齢雄性 Wistar 系ラット (Cr1j:WI, 日本チャールズリバー株式会社) を用いた。

a. ラット頭蓋骨骨欠損モデルの作成と合成ペプチドの移植

Wistar 系ラット (各群 5 匹、計 15 匹) を 10% ペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル®, 共立製薬株式会社, Tokyo, Japan) にて全身麻酔を行い、頭部皮膚を切開剥離の後、頭蓋骨にトレフィンドリル (外径 3mm 径、STOMA, インプラテックス株式会社, Tokyo, Japan) を用いて、直径 3mm 径の骨欠損を作製した。続いて同部に AMB-N を 1mg/mL の割合で混和したプロピレングリコールアルギネート (PGA) 溶液 (生化学工業株式会社) を移植した。なお、コントロール群として欠損のみ作製した群と PGA のみを移植した群を作製した。全ての群において、作製した欠損部への皮膚軟組織由来細胞の侵入を遮断するために PVC メンブレン (MILLIPORE Co., Massachusetts, USA) で欠損部を被覆し、骨膜および皮膚を縫合した。

b. 骨治癒の評価

移植 4 週後にジエチルエーテル (純正化学株式会社) にてラットを安楽死させた後、移植部組織を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリンで

24 時間固定した。固定後の試料を X 線撮影装置 (マイクロフォーカス X 線撮影装置, inspeXio SMX-90CT, 画像解析ソフト-VGStudioMax, 島津製作所, Kyoto, Japan)にて X 線学的解析を行った。

X 線撮影終了後、移植部組織を 24 時間脱灰 (K-CX, 株式会社ファルマ, Tokyo, Japan)した後、通法に従ってパラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色後、光学顕微鏡にて組織学的解析を行った。また、形成された新生骨量を画像解析ソフト (Scion Image, Scion Co., Mayland, USA)にて定量化した。

III. 結果

実験 I : 骨組織および骨芽細胞におけるアメロブラスチンの発現に関する検討

1. マウス由来骨組織および骨芽細胞におけるアメロブラスチンの発現

生後 0、3、7 日齢マウス椎骨組織および 0 日齢マウス頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞より抽出した mRNA を用い、RT-PCR 法にてアメロブラスチン mRNA の発現を検討した結果、陽性コントロールとして用いた歯胚(顎骨)のみならず、0、3、7 日齢マウス椎骨にもアメロブラスチンが発現されていることが明らかとなった(図 1A)。

一方、7 週齢マウス椎骨より抽出した mRNA を用い、同様に RT-PCR 法にてアメロブラスチン mRNA の発現を検討したところ、アメロブラスチンの発現は認められなかった(図 1B)。

2. ヒト骨肉腫症例および骨芽細胞様細胞株におけるアメロブラスチンの発現

ヒトおよびマウスのアメロブラスチンに相同的な配列をエピトープとする抗体(W59)を用い、マウス発生期歯胚を対照としてヒト骨肉腫症例および骨芽細胞様細胞株におけるアメロブラスチンの発現を免疫組織化学的に観察した。その結果、対照として観察した

マウス歯胚では、エナメル芽細胞およびエナメル質基質が陽性を呈し、同抗体がアメロブラスチンに特異的に反応することが確認された(図 2A)。そこで、同抗体を用いて、ヒト骨肉腫症例におけるアメロブラスチンタンパクの発現を免疫組織化学的染色法により検討した結果、骨芽細胞様分化を示す肉腫細胞がアメロブラスチンを強発現していた(図 2B)。

さらに、各種ヒト骨芽細胞様細胞株(SaOS-2、MG63、HOS、NOS-1)におけるアメロブラスチンの発現を RT-PCR 法にて検討した結果、NOS-1 細胞がアメロブラスチンを高発現していること明らかとなった(図 3A)。そこで、NOS-1 細胞を用い、蛍光抗体法によりアメロブラスチンタンパクの発現を検討した結果、タンパク分泌を阻害する薬剤である monensin 投与により、細胞内に蓄積されたアメロブラスチンタンパクが確認できた(図 3B)。

実験 II : 骨芽細胞の分化に対するアメロブラスチンの影響に関する 検討

1. siRNA によるアメロブラスチン発現抑制の骨芽細胞に対する影響

a. 各種骨芽細胞様細胞株における石灰化関連因子 mRNA の発現

各種骨芽細胞様細胞株における石灰化関連因子の mRNA 発現を RT-PCR 法にて検討した結果、アメロブラスチンを発現している NOS-1 細胞は、他の骨芽細胞様細胞株に比較して石灰化関連因子 (BMP-2, ALP, COL I, BSP)mRNA を高いレベルで発現していることがわかった(図 4)。

b. アメロブラスチン発現抑制の石灰化関連因子 mRNA の発現に対する影響

siRNA によりアメロブラスチンの発現を抑制した細胞 (Ambn-siRNA) における石灰化関連因子の mRNA 発現を real time RT-PCR 法にて検討した結果、Ambn-siRNA 細胞では、Ambn に加えて、BMP-2 や ALP、COL I、BSP の mRNA の有意な発現低下が認められた(図 5)。

c. アメロブラスチン発現抑制の石灰化物形成能に対する影響

10%FBS 含有 RPMI 培地にて培養した NOS-1 細胞では、石灰化物の形成は認められなかったが、50 μ g/ml ascorbic acid および 3mM sodium β -glycerophosphate を加えた石灰化誘導培地による培養では、培養 4 日目に ALZ 染色強陽性となり、高い石灰化物形成能が認められた。一方、siRNA によりアメロブラスチン発現を抑制した NOS-1 細胞では、石灰化誘導培地による培養 4 日目において、siRNA

未処理群の細胞と比較して、石灰化物形成能の明らかな低下が認められた(図 6)。

2. 遺伝子導入によるアメロブラスチン過剰発現の骨芽細胞に対する影響

a. アメロブラスチン過剰発現細胞におけるアメロブラスチンタンパクの発現

アメロブラスチン遺伝子を SaOS-2 細胞へ遺伝子導入し、Western blot 法および蛍光抗体法により、アメロブラスチンタンパクの発現をアメロブラスチン N 末端に付与した FLAG-tag にて検出した。その結果、Western blot 法により 68kDa 付近に、また、蛍光抗体法により細胞内および細胞膜付近に存在するアメロブラスチンタンパクを確認することができた(図 7A, B)。

b. アメロブラスチン過剰発現の石灰化関連因子 mRNA の発現に対する影響

アメロブラスチンを過剰発現させた SaOS-2 (FLAG-SaOS) 細胞を用い、石灰化関連因子の mRNA 発現を real time RT-PCR 法にて検討した結果、通常の培地による培養で BMP-2 および BSP の mRNA 発現が、また、石灰化誘導培地による培養で BMP-2 および ALP、OCN の mRNA 発現が有意に上昇していることが明らかとなった(図 8)。

c. アメロブラスチン過剰発現の石灰化物形成能に対する影響

アメロブラスチンを過剰発現させた HOS 細胞を用い、石灰化物形成能に対する影響を ALZ 染色にて検討した結果、アメロブラスチン過剰発現細胞における石灰化物形成能の上昇が認められた(図 9A)。また、培養 10 および 15 日目に形成された石灰化物の定量を行った結果、アメロブラスチン過剰発現細胞において石灰化物形成量の有意な増加を認めた(図 9B)。

3. アメロブラスチンによる石灰化促進作用の機序に関する検討

a. 骨芽細胞におけるアメロブラスチン結合タンパクの同定

酵母を用いた実験によりアメロブラスチンとの結合が示唆されているタンパク質として、膜 4 回貫通型タンパク CD63 が報告されている⁴²⁾。そこで、まず骨芽細胞様細胞株における CD63 の発現を Western blot 法にて検討した結果、NOS-1、SaOS-2 ならびに HOS において CD63 が発現していることが明らかとなった(図 10A)。また、アメロブラスチンを過剰発現させた SaOS-2 細胞を用い、免疫沈降法にてアメロブラスチンと CD63 の結合を検討した結果、両者が結合していることがわかった(図 10B)。

b. 細胞内シグナル伝達機構

アメロブラスチンを過剰発現させた SaOS-2 細胞を用い、細胞内シグナル伝達機構の検討を Western blot 法にて検討した結果、MAPK(mitogen-activated protein kinase)として知られる ERK(extracellular signal-regulated kinase)のリン酸化が認められた(図 11A)。また、ERK の上流に位置する MEK(MAP kinase/ERK kinase)の阻害剤である U0126 の投与によりアメロブラスチン過剰発現細胞にみられた ERK のリン酸化が抑えられた(図 11B)。さらに、MAPK の基質として知られる転写因子 Elk の活性化を検討したところ、アメロブラスチン過剰発現細胞に Elk のリン酸化が生じていることが明らかとなった(図 11C)。

実験Ⅲ：骨組織再生に対するアメロブラスチン合成ペプチドの影響に関する検討

1. アメロブラスチン合成ペプチド作製部位の決定

予備実験により石灰化と関連しない細胞におけるアメロブラスチンのバリエーションの存在が示唆されたため、アメロブラスチン mRNA の様々な領域に対する primer(図 12A, 表 2)を用い、RT-PCR 法にてアメロブラスチンの発現を検討した結果、石灰化非関連細胞である

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC2 にアメロブラスチンの一部の領域が発現していることが明らかとなった(図 12B)。そこで、HSC2 細胞に認められるアメロブラスチン発現の領域以外の部分が石灰化関連組織に特異的に発現している領域であり、石灰化と深く関連している可能性があると考えた(図 13)。さらに、その領域の中でも、種を超えてよく保存されているアメロブラスチン N 末端部^{13,55)}に相当する合成ペプチド(AMB-N)を作製し、以後の実験を行った。

2. *In vitro* におけるアメロブラスチン合成ペプチドの骨芽細胞の石灰化に対する影響

a. 石灰化関連因子の mRNA 発現に対する影響

AMB-N の添加により、マウス頭蓋骨由来前骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞における石灰化関連因子の mRNA 発現を検討した結果、培養 2 週目において ALP および BSP の mRNA 発現が上昇した(図 14)。また、AMB-N に相当する配列を MC3T3-E1 細胞へ遺伝子導入し、同様に検討した結果、細胞外への分泌シグナルを付与し、合成された AMB-N を細胞外へ分泌する M3a 細胞においては、培養 2 週目における ALP および BSP の mRNA 発現の上昇が認められた(図 15A)。

b. アルカリホスファターゼ活性に対する影響

AMB-N を細胞外へ分泌する M3a 細胞のみにおいて、アルカリホス

ファクターゼ活性の上昇が認められた(図 15B)。

c. 石灰化物形成能に対する影響

ALZ 染色にて石灰化物形成能の検討を行った結果、M3a 細胞では培養 4 週目において石灰化物形成能の亢進が認められた(図 15C)。

3. *In vivo*におけるアミノプロラスチン合成ペプチドの骨組織再生に対する影響

ラット頭蓋骨骨欠損部へ AMB-N(1mg/mL)を PGA と混和し移植した結果、移植 4 週目で、欠損のみを作製した群および PGA のみを移植した群と比較して、AMB-N 移植群における有意な新生骨の形成が認められた。X 線学的解析では、AMB-N 移植群における欠損部の早期閉鎖がみられ(図 16A)、scion image による形成された新生骨の定量的評価では、AMB-N 移植群に有意な新生骨量の増加が認められた(図 16B)。組織学的解析では、ヘマトキシリン-エオジン染色により AMB-N 移植群における新生骨形成が観察される(図 17A)とともに、Scion Image による定量的評価においてもコントロールおよび PGA 移植群と比較して、有意に多くの新生骨形成が確認できた(図 17B)。

IV. 考察

1. 骨組織におけるアメロブラスチンの発現と役割

エナメルタンパクのひとつであるアメロブラスチンは、歯の発生過程に時期ならびに部位特異的に発現する^{23,24)}と言われていたが、その後の研究によりエナメル芽細胞だけでなくマラッセ残存上皮細胞や前駆象牙芽細胞、歯髓組織由来の幹細胞などにも発現することが明らかとなってきた²⁵⁻²⁹⁾。さらに、最近の報告では、*in vitro*において、リン酸を添加した培地による培養でヒト骨芽細胞様細胞がアメロブラスチンの発現を示す²²⁾ことや、マウス発生初期において、その発現が骨組織で認められることなどが明らかにされた³⁰⁾。また、興味深いことに、アメロブラスチン遺伝子は、4番染色体長腕に位置し、骨組織形成に深く関わるBSPやOPN、BMP-3などの遺伝子と近接して存在していることから、アメロブラスチンが骨組織形成に関連する可能性が示唆される。しかしながら、これまでアメロブラスチンの骨組織における役割に関して、詳細な検討は行われておらず、アメロブラスチンと骨組織形成との関係については、ほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では、アメロブラスチンの骨組織形成との関連について *in vitro*ならびに *in vivo*で検討した。その結果、まず、骨組織や骨

芽細胞株におけるアメロブラスチンの発現の詳細を検討したところ、マウスの形成初期の骨組織だけでなく、ヒト骨肉腫症例における骨芽細胞様腫瘍細胞やヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株(NOS-1)にもアメロブラスチンが発現されていることを見いだした。一方、マウス骨組織におけるアメロブラスチンの発現は、7週齢では認められなかったことから、アメロブラスチンは歯牙形成と同様に、骨組織でも発生期に時期特異的に発現していることが明らかとなった。さらに、骨肉腫において類骨を形成する骨芽細胞様腫瘍細胞や骨肉腫より樹立された骨芽細胞様細胞株にもアメロブラスチンの発現が認められたことから、アメロブラスチンが骨組織の形成過程において何らかの役割を担っているが、骨の正常な成熟過程に伴ってその発現は消失していくと推測された。

以上のように、アメロブラスチンが形成初期の骨組織や骨肉腫においても発現していることが明らかとなったが、発生期骨組織の形成様式、すなわち、軟骨内骨化と膜内骨化や部位による発現の違いや骨再生過程におけるアメロブラスチンの発現状況などについては未だ不明である。今後、これらの点も含め、骨組織におけるアメロブラスチンの発現ならびにその役割を検討する必要がある。また、エナメル芽細胞を用いた *in vitro* の実験では、アメ

ロブラスチンの発現が、外胚葉組織形成に関わる因子である epiprofin や、神経栄養因子である nerve growth factor (NGF)、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、neurotrophin-3, -4, -5 (NT-3, -4, -5) によって誘導されることが報告されている³¹⁾。生体内の骨組織においてもアメロブラスチンの発現がどのように制御されているのかについての検討も今後の課題として重要である。

2. 骨芽細胞分化におけるアメロブラスチンの役割

アメロブラスチンの骨芽細胞分化に対する役割やその機能については、これまで検討されていない。そこで、本研究では、ヒト骨肉腫より樹立された骨芽細胞様細胞を用い、アメロブラスチンの骨芽細胞分化に対する影響について検討した。

まず初めに、ヒト骨肉腫より樹立された骨芽細胞様細胞株 4 株 (NOS-1, SaOS-2, MG63, HOS) を用い、各細胞株の石灰化関連因子の発現を比較検討した結果、アメロブラスチンを恒常的に発現している NOS-1 細胞は、他の細胞株に比べ、高い骨形成誘導能を示す BMP2 や BSP の mRNA 発現が高い一方で、骨芽細胞の最終分化マーカーであり、骨増加の抑制に関与することが知られている OCN³⁵⁾

の発現は低かった。この結果から、NOS-1 細胞は骨芽細胞の最終分化状態には至らずに、高い石灰化能を維持していることが示唆される。

そこで、NOS-1 細胞におけるアメロブラスチンの恒常的な発現が、石灰化に何らかの影響を及ぼしている可能性を考え、NOS-1 細胞におけるアメロブラスチンの発現を siRNA により抑制し、石灰化関連因子の発現を検討した。その結果、アメロブラスチンの knock down により、コントロール群と比較して、BMP-2、ALP、COL I ならびに BSP の mRNA 発現が有意に減少するとともに、石灰化物形成能の明らかな低下が認められた。一方、アメロブラスチンの骨芽細胞の石灰化能に及ぼす影響を検討するために、アメロブラスチンを発現していない細胞株である SaOS-2 および HOS 細胞に NOS-1 細胞の cDNA よりクローニングしたアメロブラスチン遺伝子を導入し、石灰化に及ぼす影響を検討した結果、アメロブラスチンを過剰発現させた細胞では、BMP-2、ALP、BSP ならびに OCN の mRNA 発現が有意に上昇するとともに、石灰化物形成能の亢進が確認できた。

以上のように、アメロブラスチンの発現抑制実験および過剰発現実験の結果から、アメロブラスチンの発現が石灰化能の亢進に重要な役割を果たすだけでなく、骨芽細胞を高い石灰化能を有す

る分化状態に維持している可能性が示された。これらの特徴は、骨芽細胞への分化の方向を決定づけるとともに、骨芽細胞の骨細胞への分化を抑制する因子として知られる Runx2³²⁾の機能と類似している。しかし、real time RT-PCR 法による検討で、コントロール群とアメロブラスチン抑制群および過剰発現群で Runx2 mRNA 発現の差が認められなかったことから、アメロブラスチンの骨芽細胞に対する石灰化能亢進作用は、Runx2 経路によるものではないと考えられる。また、アメロブラスチンを過剰発現した細胞では、特に BMP-2 の mRNA 発現の著明な上昇が認められたが、この結果は、アメロブラスチンの発現抑制実験での定量的検討で認められた BMP-2 の有意な発現低下とも関連しており、アメロブラスチンの石灰化に対する影響が、BMP-2 の発現を誘導した結果による可能性を示唆している。現在までに BMP-2 の発現を強く誘導する因子として statin が知られているが³³⁾、今後、アメロブラスチンが、statin 同様に、BMP-2 の転写を誘導する因子であるかどうかについても詳細に検討していく必要がある。

以上のように、アメロブラスチンが *in vitro* で骨芽細胞の石灰化能を亢進させる機能を有することが明らかとなった。しかし、アメロブラスチンノックアウトマウスを用いた検討では、エナメ

ル質形成不全が生じることが報告されている³⁴⁾が、骨組織形成に対する影響は検討されていない。これは、骨芽細胞のマーカールとして知られている BSP や OCN 遺伝子のノックアウトマウスでは、生後 4~12 ヶ月で骨格異常を示してくる^{35,36)}ことから推測できるように、骨格異常を検討するには長期的な観察が必要であると考えられ、アメロブラスチンの骨組織での生理的な役割を証明するためには、アメロブラスチンノックアウトマウスを用いて、長期観察による骨組織への影響を検討する必要があると考える。

3. アメロブラスチンの骨芽細胞における石灰化促進の機序

アメロブラスチンは N 末端部にシグナルペプチドを有しており、合成後に細胞外に分泌されることが知られている^{11,13,39-43)}。また、本実験の結果から、アメロブラスチンが骨芽細胞の分化に対しても促進的な影響を与えていることを考えると、細胞外に分泌されたアメロブラスチンが、オートクラインまたはパラクライン的に細胞膜受容体と結合し、骨芽細胞の分化を促していることが推測される。そこで、この可能性を検証するために、まず、アメロブラスチンに結合するタンパク質に着目して検討した。最近、酵母を用いた two hybrid 法により、アメロブラスチンと結合するタン

パクとして膜 4 回貫通型タンパク質スーパーファミリー (TM4SF:tetraspanin superfamily)に属する CD63 が同定された⁴⁴⁾が、その生理的な結合や役割については検討されていなかった。そこで、本研究では、骨芽細胞におけるアメロブラスチンと CD63 の結合を免疫沈降法により検討した結果、骨芽細胞においても CD63 が発現しており、アメロブラスチンと CD63 が結合していることが明らかとなった。また、細胞膜受容体である CD63 は、その下流に MAPK である ERK が存在することが報告されている^{45,46)}ことから、アメロブラスチンを過剰発現させた細胞における ERK のリン酸化を検討したところ、ERK の活性化を示す 204 番目のチロシンの著明なリン酸化が認められた。さらに、ERK の上流にある MEK の阻害剤である U0126 を投与したところ、ERK のリン酸化が抑制された。また、ERK の基質として知られる Elk の活性化を検討した結果、Elk がリン酸化されており、活性化していることが明らかとなった。以上の結果より、アメロブラスチンの骨芽細胞に対する影響は、細胞外に分泌されたアメロブラスチンが細胞膜受容体である CD63 との結合を介して、その下流の古典的 MAPK である MEK や ERK を活性化し、転写因子である Elk が活性化された結果、石灰化関連因子の転写が促進されたと推測される。

アメロブラスチンと同様に、エナメルタンパクのひとつであるアメロゲニンもエナメル芽細胞において CD63 と結合し、細胞内にエンドサイトーシスによって取り込まれ、細胞内でアメロゲニン mRNA と結合することにより、アメロゲニンタンパクの発現を安定化する可能性があるという報告^{53, 54)}から、骨芽細胞におけるアメロブラスチンの機能にも同様のメカニズムの存在が推測される。

最近、乳腺上皮細胞において、CD63 は integrin β 1 と細胞膜上で結合することによりマイクロドメインを形成し、CD63 にリガンドが結合することで integrin β 1 が活性化され、細胞内シグナル伝達系を活性化させるという報告⁴⁵⁻⁴⁶⁾や CD63 を含む tetraspanin family に属するタンパク質が細胞膜上で integrin に結合することでその機能を発現するという報告⁴⁷⁻⁵²⁾もある。CD63 と integrin の関連性を含め、骨芽細胞における CD63 の役割についても詳細に検討する必要がある。

4. アメロブラスチン合成ペプチドの骨組織再生療法への応用の可能性

AMB-N による *in vitro* での骨芽細胞分化および *in vivo* での人工的骨欠損の治癒に与える影響を検討した結果、AMB-N が骨芽細胞

の分化を促進させ、石灰化物形成能の亢進を示すことが明らかとなった。また、AMB-N に相当する 16 アミノ酸を発現するベクターを用いた検討では、分泌シグナルを付与した発現ベクターを導入した細胞 (M3a 細胞) のみに、AMB-N を添加した時と同様の効果が認められたことから、AMB-N による骨芽細胞の石灰化促進作用が、やはり細胞膜受容体を介したものである可能性を支持している。したがって、全長アメリロブラスチンの遺伝子導入により認められた骨芽細胞様細胞株での石灰化促進作用や CD63 との結合には、アメリロブラスチン N 末端部が重要である可能性が考えられる。

本研究では、N 末端部の 16 アミノ酸に着目したが、図 13 に示すように、アメリロブラスチンの mRNA 中央部にも石灰化組織に特異的に発現する領域があり、今後、その領域に相当するペプチドを複製し、同様の検討をする必要があると考える。また、今回用いた AMB-N は、人工的に合成したペプチドであるため、通常生体内で生じる糖鎖修飾などの翻訳後修飾を受けていないことから、合成・修飾・分泌後にプロセッシングを受け、断片化されたアメリロブラスチンの AMB-N 相当部を精製して用いることにより、本研究で得られた AMB-N の石灰化促進作用より高い効果が得られる可能性もあり、アメリロブラスチンを発現する NOS-1 細胞の培養上清などを

用いたさらなる検討が必要と考えられる。

また、*in vivo*におけるAMB-Nの骨組織再生効果について検討した結果においても、AMB-Nは、ラット頭蓋骨人工的骨欠損部の早期閉鎖を有意に促すことが明らかとなった。AMB-N投与群の組織学的検討において、新生骨が既存骨と離れて形成されている像が観察されたことから、AMB-Nに骨誘導能がある可能性を考え、ラット皮下組織へのAMB-N移植実験を行ったが、骨誘導能は観察されなかった(データ未掲載)。したがって、人工的骨欠損部で認められた治癒形態は、周囲骨組織由来の骨芽細胞の骨伝導によるものであり、AMB-Nはこれを促進したと考えられる。

V. 結論

骨組織におけるアメロブラスチンの役割と骨再生療法への応用の可能性について検討した結果、以下の結論を得た。

1. アメロブラスチンは、歯牙形成部位に特異的な遺伝子ではなく、骨組織にも発現している。
2. アメロブラスチンは、骨芽細胞の石灰化能を亢進する作用を有する。
3. アメロブラスチンの骨芽細胞の石灰化促進作用は、細胞膜受容体 CD63 との結合により、その下流の MAPK (MEK-ERK) 経路、転写因子 Elk の活性化を介している。
4. アメロブラスチンの骨芽細胞の石灰化促進作用には、アメロブラスチン N 末端領域が重要であり、同部の合成ペプチドは骨芽細胞の石灰化能を亢進させる作用を有する。
5. アメロブラスチン合成ペプチドは、*in vivo* において実験的骨欠損の治癒を促す。

以上の結果より、アメロブラスチンは、骨組織形成とも密接に関係しており、骨芽細胞の石灰化を促進することが明らかとなっ

た。また、AMB-N は、骨組織再生促進能を有することが明らかとなり、骨組織再生療法剤に応用できる可能性が示された。

IV. 文献

- 1) Zetterström O, Andersson C, Eriksson L, Frenndriksson A, Friskopp J, Heden G, Jansson B, Lundgren T, Nilveus R, Olsson A, Revert S, Salaonen L, Sjöström L, Winell A, Ostgren A and Gestrelus S. Clinical safety of enamel matrix derivative (EMDOGAIN®) in the treatment of periodontal defects. J Clin Periodontol 24: 697-704, 1997.
- 2) Heijl L, Heden G, Svärdström G and Ostgren A. Enamel Matrix Derivative (EMDOGAIN®) in the treatment intrabony periodontal defects. J Clin Periodontol 24:705-714, 1997.
- 3) Sculean A, Reich E, Chiantella GC and Brex M. Treatment of intrabony periodontal defects with an enamel matrix protein derivative (EMDOGAIN®). A report of 32 cases. Int J Periodontics Restorative Dent 19: 157-163, 1999.
- 4) Heden G, Wennström J and Lindhe J. Periodotal tissue alteration following Emdogain treatment of periodontal sites with angular bone defects. A series of case reports. J Clin Periodontol 26: 855-860, 1999.
- 5) Hammarström L. Enamel matrix, cementum development and

- regeneration. J Clin Periodontol 24: 658-668, 1997.
- 6) Venezia E, Goldstein M, Boyan BD and Schwartz Z. The use of enamel matrix derivative in the treatment of periodontal defects: a literature review and meta-analysis. Crit Rev Oral Biol Med 15: 382-402, 2004.
- 7) Kawase T, Okuda D, Momose M, Kato Y, Yoshie H and Burns DM. Enamel matrix derivative (EMDOGAIN®) rapidly stimulates phosphorylation of the MAP kinase family and nuclear accumulation of smad2 in both oral epithelial and fibroblastic human cells. J Periodontal Res 36: 367-376, 2001.
- 8) Suzuki S, Nagano T, Yamakoshi Y, Gomi K, Arai T and Fukae M. Enamel matrix derivative gel stimulates signal transduction of BMP and TGF- β . J Dent Res 84: 510-514, 2005.
- 9) Simmer JP and Hu JC. Expression, structure, and function of enamel proteinases. Connect Tissue Res 43: 441-449, 2002.
- 10) Hu CC, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zhang CH, Ryu OH, Tanabe T, Yamakoshi Y, Murakami C, Dohi N, Shimizu M and Simmer JP. Cloning characterization of porcine enamel mRNAs. J Dent Res 76: 1720-1729, 1997.

- 11) Krebsbach PH, Lee SK, Matsuki Y, Kozack CA, Yamada KM and Yamada Y. Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin. A novel tooth specific gene. *J Biol Chem* 271: 4431-4435, 1996.
- 12) Fukae M and Tanabe T. Nonamelogenin components of porcine enamel in the protein fraction free from the enamel crystals. *Calcif Tissue Int* 40: 286-293, 1987.
- 13) Hu CC, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zhang CH, Ryu OH, Tanabe T, Yamakoshi Y, Murakami C, Dohi N, Shimizu M and Simmer JP. Sheathlin : Cloning, cDNA / polypeptide sequence, and immunolocalization of porcine enamel sheath proteins. *J Dent Res* 76: 648-657, 1997.
- 14) Cerny R, Slaby I, Hammarström L and Quitz T. A novel gene expressed in rat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains. *J Bone Miner Res* 11: 883-891, 1996.
- 15) Simmer JP, Fukae M, Tanabe T, Yamakoshi Y, Uchida T, Xue J, Margolis HC, Shimizu M, DeHart BC, Hu CC and Bartlett JD. Purification, characterization and cloning of enamel matrix serine proteinase1. *J Dent Res* 77: 377-386, 1998.

- 16) Fukae M, Tanabe T, Uchida T, Lee SK, Ryu OH, Murakami C, Wakida K, Simmer JP, Yamada Y and 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.
- 17) Fong CD, Cerny R, Hammarström L and Slaby I. Sequential expression of an amelin gene in mesenchymal and epithelial cells during odontogenesis in rats. Eur J Oral Sci 106: 324-330, 1998.
- 18) Fukae M, Tanabe T, Yamakoshi Y, Yamada M, Ujiie Y and Oida S. Immunoblot detection and expression of enamel proteins at the apical portion of the forming root in porcine permanent incisor tooth germs. J Bone Miner Metab 19: 236-243, 2001.
- 19) Ravindranath RM, Devarajan A and Uchida T. Spatiotemporal expression of ameloblastin isoforms during murine tooth development. J Biol Chem 50: 36370-36376, 2007
- 20) Fisher LW and Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of

- proteins. *Connect Tissue Res* 44: 33-40, 2003.
- 21) Spahr A, Lyngstadaas SP, Slaby I and Pezeshki G. Ameloblastin expression during craniofacial bone formation in rats. *Eur J Oral Sci* 114: 504-511, 2006.
- 22) Müller WE, Boreiko A, Wang X, Krasko A, Geurtsen W, Custodio MR, Winkler T, Lukic-Bilela L, Ling T and Schröder HC. Morphogenetic activity of silica and bio-silica on the expression of genes controlling biomineralization using SaOS-2 cells. *Calcif Tissue Int* 81: 382-393, 2007.
- 23) Lee SK, Krebsbach PH, Matsuki Y, Nanci A, Yamada KM and Yamada Y. Ameloblastin expression in rat incisors and human tooth germs. *Int J Dev Biol* 40: 1141-1150, 1996.
- 24) Murakami C, Dohi N, Fukae M, Tanabe T, Yamakoshi Y, Wakida K, Satoda T, Takahashi O, Shimizu M, Ryu OH, Simmer JP and Uchida T. Immunochemical and immuno histochemical study of the 27-and 29-kDa calcium-binding proteins and related proteins in the porcine tooth germ. *Histochem Cell Biol* 107: 485-494, 1997.
- 25) Hakki SS, Berry JE and Somerman MJ. The effect of enamel

- matrix protein derivative on follicle cells in vitro. J Periodontol 72: 679-687, 2001.
- 26) Bosshardt DD and Nanci A. Immunolocalization of epithelial and mesenchymal matrix constituents in association with inner enamel epithelial cells. J Histochem Cytochem 46: 135-142, 1998.
- 27) Fong CD and Hammarström L. Expression of amelin and amelogenin in epithelial root sheath remnants of fully formed rat molars. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 90: 218-223, 2000.
- 28) Begue-Kirn C, Krebsbach PH, Barlett JD and Butler WT. Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. Eur J Oral Sci 106: 963-970, 1998.
- 29) Yu J, Jin F, Deng Z, Tang L, Shi J and Jin Y. Epithelial-mesenchymal cell ratios can determine the crown morphogenesis of dental pulp stem cells. Stem Cells Dev 17: 475-482, 2008.

- 30) Spahr A, Lyngstadaas SP and Pezeshki G. Ameloblastin expression during craniofacial bone formation in rats. *Eur J Oral Sci* 114: 504-511, 2006.
- 31) Yoshizaki K, Yamamoto S and Fukumoto S. Neurotrophic factor Neurotrophin-4 regulates ameloblastin expression via full-length TrkB. *J Biol Chem* 283: 3385-3391. 2008.
- 32) Komori T. Mechanism of transcriptional regulation by Runx2 in osteoblasts. *Clin Calcium* 16: 801-807, 2006.
- 33) Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M and Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 286: 1946-1949. 1999.
- 34) Fukumoto S, Kiba T, Hall B, Iehara N, Nakamura T, Longenecker G, Krebsbach PH, Nanci A, Kulkarni AB and Yamada Y. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell Biol* 167: 973-983, 2005.
- 35) Ducy P, Desbois C, Bpyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadlo J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A and

- Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382: 448-452, 1996.
- 36) Malaval L, Wade-Gueye NM, Boudliffa M, Fei J, Zirngibl R, Chen F, Laroche N, Roux JP, Burt-Pichat B, Duboeuf F, Bolvin G, Jurdic P, Lafage-Proust MH, Amedee J, Vico L, Rossant J and Aubin JE. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med* 205: 1145-1153, 2008.
- 37) MacDougall M, Simmonds D, Gu TT, Forsman-Semb K, Yamada Y and Berdal A. Cloning, characterization and immunolocalization of human ameloblastin. *Eur J Oral Sci* 108: 303-310, 2000.
- 38) Kobayashi K, Yamada Y, Hu CC, Gomi K, Krebsvach PH and Simmer JP. Splicing determines the glycosylation state of ameloblastin. *J Dent Res* 86: 962-967, 2007.
- 39) Iwata T, Yamada Y, Hu CC, Ishikawa I, Bartlett JP, Krebsbach PH and Simmer JP. Processing of ameloblastin by MMP-20. *J Dent Res* 86: 153-157, 2007.
- 40) Murakami C, Dohi N, Fukae M, Tanabe T, Shimizu M, Simmer

JP and Uchida T. Immunochemical and immunohistochemical study of the 27- and 29-kDa calcium-binding proteins and related proteins in the porcine tooth germ. *Histochem Cell Biol* 107: 485-494, 1997.

41) Uchida T, Murakami C, Dohi N, Wakida K and Takahashi O. Synthesis, secretion, degradation, and fate of ameloblastin during the matrix formation stage of the rat incisor as shown by immunocytochemistry and immunochemistry using region-specific antibodies. *J Histochem Cytochem* 45: 1329-1340, 1997.

42) Wang H, Tannukit S, Zhu D, Snead ML and Paine ML. Enamel matrix protein interactions. *J Bone Miner Res* 20: 1032-1040, 2005.

43) Jung KK, Liu XW, Chirco R, Fridman R and Kim HR. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO* 25: 3934-3942, 2006.

44) William G and Stetler-Stevenson. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling:

- Metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* 27: 1-19, 2008.
- 45) Yang X, Kovalenko OV, Tang W, Claas C, Stipp CS and Hemier ME. Palmitoylation supports assembly and function of integrin-tetraspanin complexes. *J Cell Biol* 167: 1231-1240, 2004.
- 46) Levy S and Shoham T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nature* 5: 136-148, 2005.
- 47) Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 801-811, 2005.
- 48) Pols MS and Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res* 9: 2008.
- 49) Kazarov AR, Yang X, Stipp CS, Sehgal B and Hemier ME. An extracellular site on tetraspanin CD151 determines $\alpha 3$ and $\alpha 6$ integrin-dependent cellular morphology. *J Cell Biol* 158: 1299-1309, 2002.
- 50) Hakomori S. Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. *Curr Opin Hematol* 10: 16-24, 2003.

- 51) Xu L, Harada H and Taniguchi A. The effects of LAMP1 and LAMP3 on M180 amelogenin uptake, localization and amelogenin mRNA induction by amelogenin protein. *J Biochem* 144: 531-537, 2008.
- 52) Xu L, Harada H, Tamaki T, Matsumoto S, Tanaka J and Taniguchi A. Reuptake of extracellular amelogenin by dental epithelial cells results in increased levels of amelogenin mRNA through enhanced mRNA stabilization. *J Biol Chem* 27: 2257-2262, 2006.
- 53) Kitagawa S, Hiraoka M, Sato S, Saito A, Miyauchi M, Ogawa I and Takata T. A fragment of ameloblastin protein promotes regeneration of periodontal tissues. 89th annual meeting of American academy of Periodontology. San Francisco: September 20-24. 2003.
- 54) Gregory CA, Gunn WG, Peister A and Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridium chloride extraction. *Anal Biochem* 329: 77-84, 2004.
- 55) Toyosawa S, Fujiwara T, Ooshima T, Shintani S, Sato A, Ogawa

Y, Sobue S and Ijuhin N. Cloning and characterization of the human ameloblastin gene. Gene 256: 1-11, 2000.

表1. PCRに用いたprimer

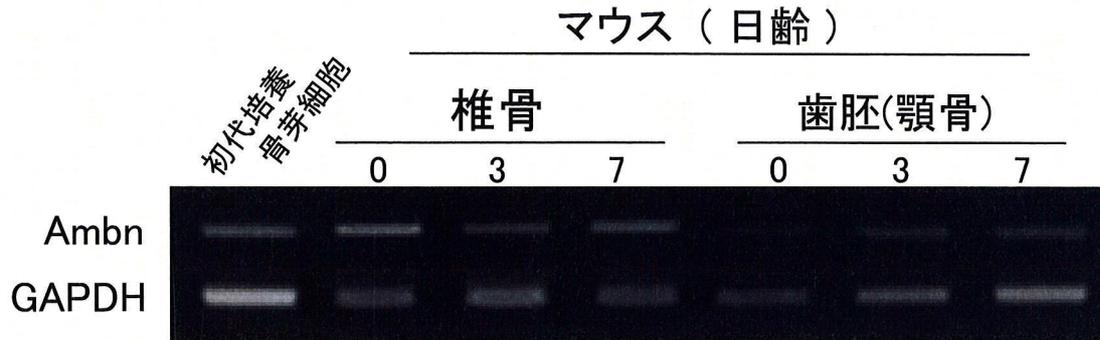
primer	Sequence	Products (bp)
Mouse Ambn F	GCGTTTCCAAGAGCCCTGATAAC	
Ambn R	AAGAAGCAGTGTACATTTCTGG	234
Mouse ALP F	TACCGACCCTGTTCTGAGGG	
ALP R	ACCCTGGGTAGACAGCCAA	213
Mouse COL I F	TCTCCACTCTTCTAGTTCT	
COL I R	TTGGGTCATTTCCACATGC	300
Mouse BSP F	ACCGGCCACGCTACTTTCTTT	
BSP R	GACCGCCAGCTCGTTTTCA	172
Mouse OCN F	AAGCAGGAGGGCAATAAGGT	
OCN R	AGCTGCTGTGACATCCATAC	297
Mouse GAPDH F	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	
GAPDH R	ACACATTGGGGGTAGGAACA	450
Human Ambn F	CCTTGCAGGAAGGAGAACTG	
Human Ambn R	CTGGGAGTGATGGACCTTGT	136
Human Runx2 F	TTACTTACACCCCGCCAGTC	
Human Runx2 R	TATGGAGTGCTGCTGGTCTG	139
Human BMP2 F	TCAAGCCAAACACAAACAGC	
Human BMP2 R	AGCCACAATCCAGTCATTCC	103
Human ALP F	CCTCCTCGGAAGACACTCTG	
Human ALP R	GCAGTGAAGGGGCTTCTTGTC	139
Human COL I F	GTGCTAAAGGTGCCAATGGT	
Human COL I R	ACCAGGTTACCGCTGTTAC	128
Human BSP F	AACCTACAACCCACACAA	
Human BSP R	AGGTTCCCGTTCTCACTTT	149
Human OCN F	GACTGTGACGAGTTGGCTGA	
Human OCN R	CTGGAGAGGAGCAGAACTGG	119
Human GAPDH F	GGCCTCCAAGGAGTAAGACC	
Human GAPDH R	AGGGGTCTACATGGCAACTG	147

Ambn : ameloblastin GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
 ALP : alkaline phosphatase Runx2 : runt-related transcription factor 2
 COL I : type I collagen BMP2 : bone morphogenetic protein 2
 BSP : bone sialoprotein
 OCN : osteocalcin

表2. アメロブラスチンのmRNAに対する各種primer

primer	Sequence
A	ATGTCAGCATCTAAGATTCCACTTT
B	GCAGTGCCGTTCTTTCTCA
C	CGGGTATGGCTAGTTTGAGC
D	TGAGACAGTTGGGAAGTCTGC
E	TGAGGCCAAGAGAACATGAA
F	GGATGCACAGGCAAAGAATA
G	GCAGCAGACTGGAGAAAAGG
H	ATCACAGCCATCCTTGAAGC
I	CCTTGCAGGAAGGAGAACTG
J	CTGGGAGTATGGACCTTGT
K	AGCCATGTTTCCAGGATTTG
L	TGCACCTCCTTCTTCGTTCT
M	TCAGGGCTCTTGGAAATGCC
N	TTAGAGCTGTCAGGGCTCTTG

A. 生後0、3、7日齢マウス



B. 7週齢マウス

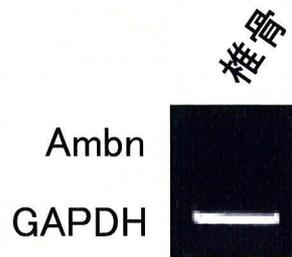
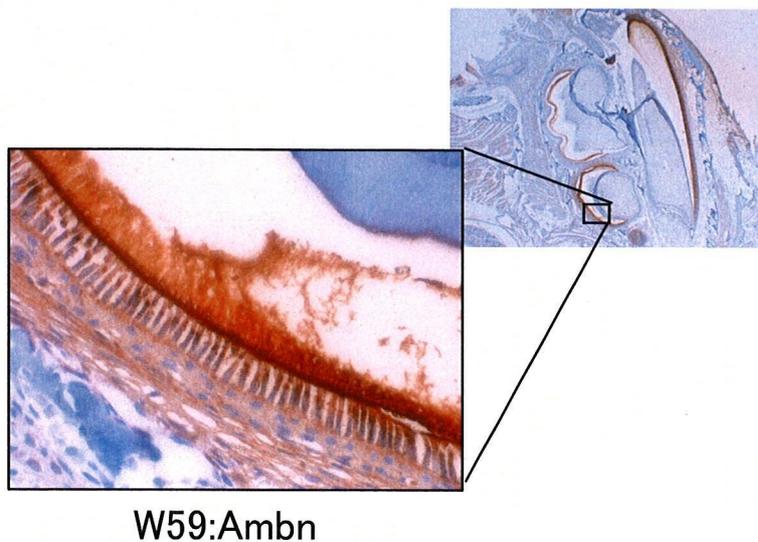


図1. マウス骨組織および骨芽細胞におけるアメロブラスチン(Ambn)の発現 (RT-PCR)

A. 生後0、3、7日齢マウスでは、歯胚組織だけでなく、骨組織および頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞にもアメロブラスチンmRNAが発現している。

B. 7週齢マウス椎骨組織には、アメロブラスチンmRNAは発現していない。

A. マウス歯胚



B. ヒト骨肉腫症例

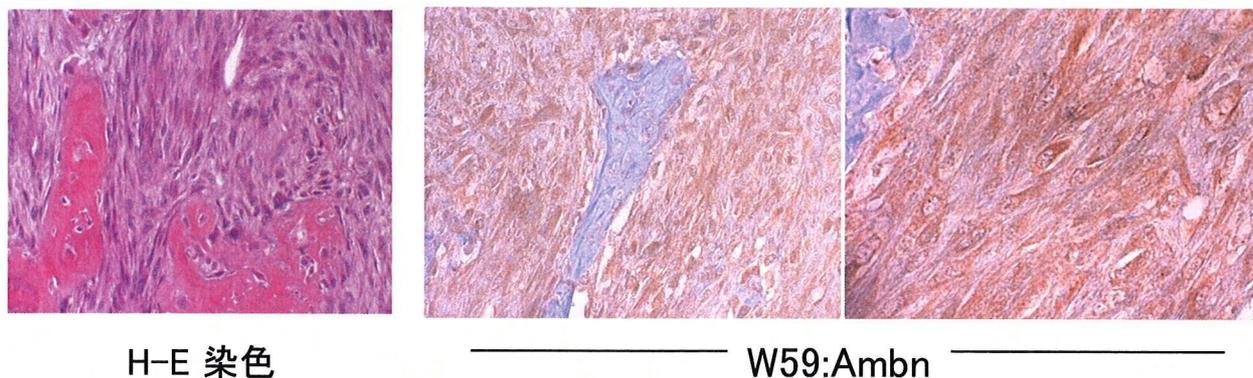


図2. マウス歯胚およびヒト骨肉腫症例におけるアメロブラスチンの発現
(免疫組織化学染色)

A. 抗アメロブラスチン抗体W59を用いた免疫組織化学染色で、マウス歯胚形成期エナメル芽細胞とエナメル基質にアメロブラスチンの発現が確認される。

B. 同抗体を用い、ヒト骨肉腫を形成する骨芽細胞様細胞にもアメロブラスチン陽性反応が観察される。

A. ヒト骨芽細胞様細胞株におけるアメロラスチンの発現 (RT-PCR)



B. NOS-1細胞におけるアメロラスチンの発現(蛍光抗体法)

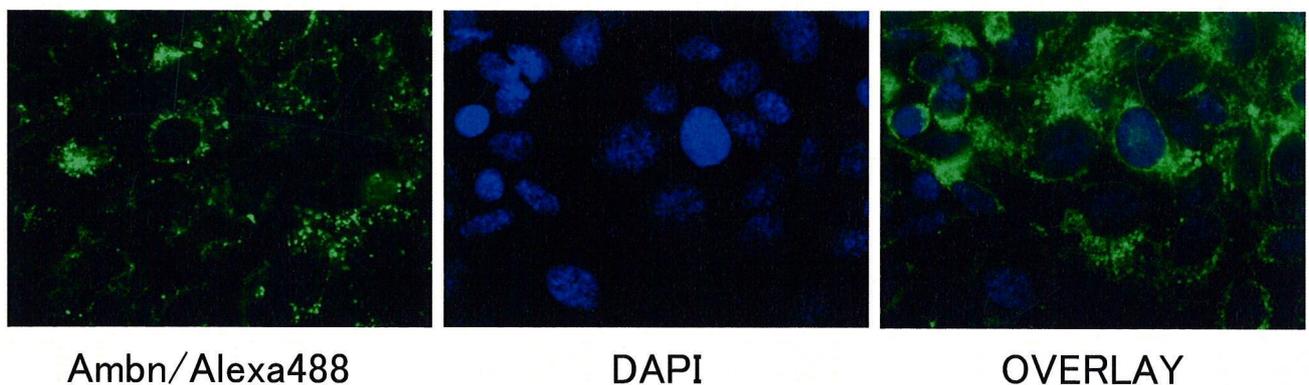


図3. ヒト骨芽細胞様細胞におけるアメロラスチン(Ambn)の発現

A. ヒト骨芽細胞様細胞NOS-1細胞はアメロラスチンmRNAを高発現している。

B. NOS-1細胞を用い、蛍光抗体法によりアメロラスチンタンパクの発現を検討した結果、monensin投与により細胞内に蓄積したアメロラスチンが確認できる。

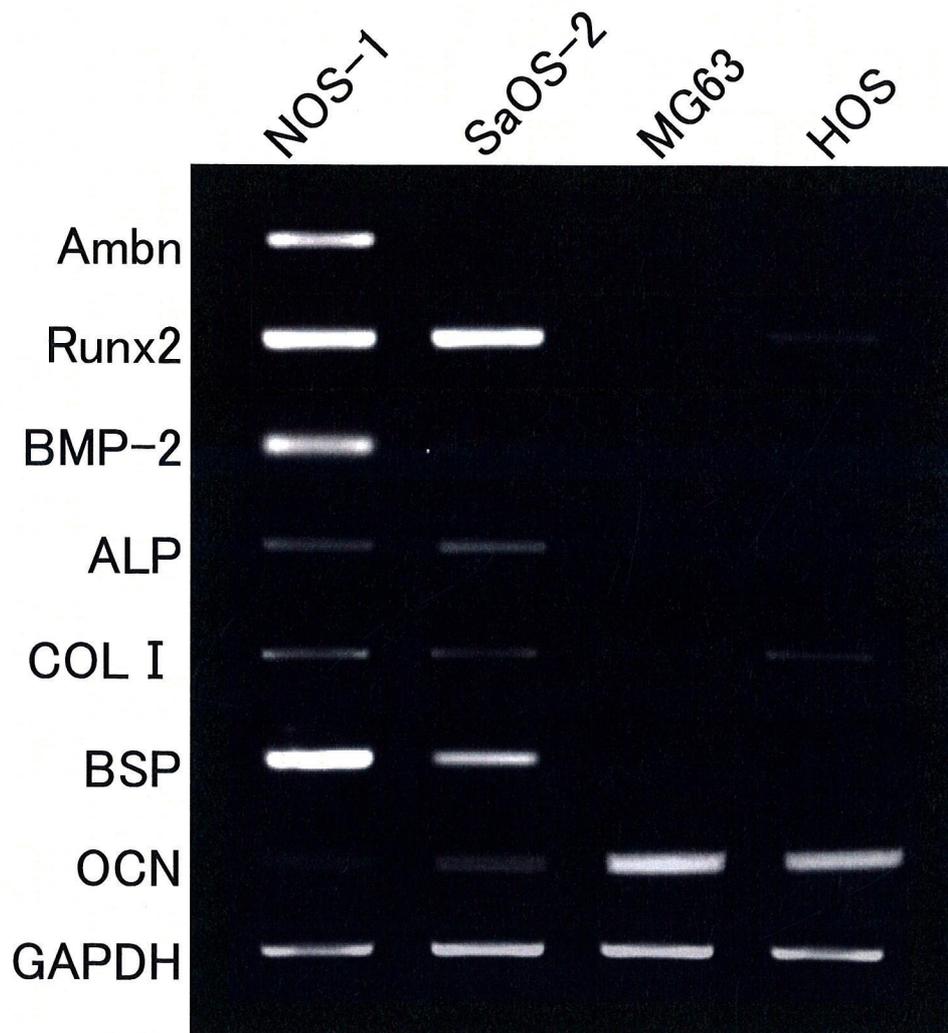


図4. ヒト骨芽細胞様細胞における石灰化関連因子のmRNA発現(RT-PCR)

アメロラスチン(Ambn)を恒常的に発現しているNOS-1細胞は、他の骨芽細胞様細胞と比較して高い石灰化関連因子(BMP-2, ALP, COL I, BSP)のmRNA発現を示す。

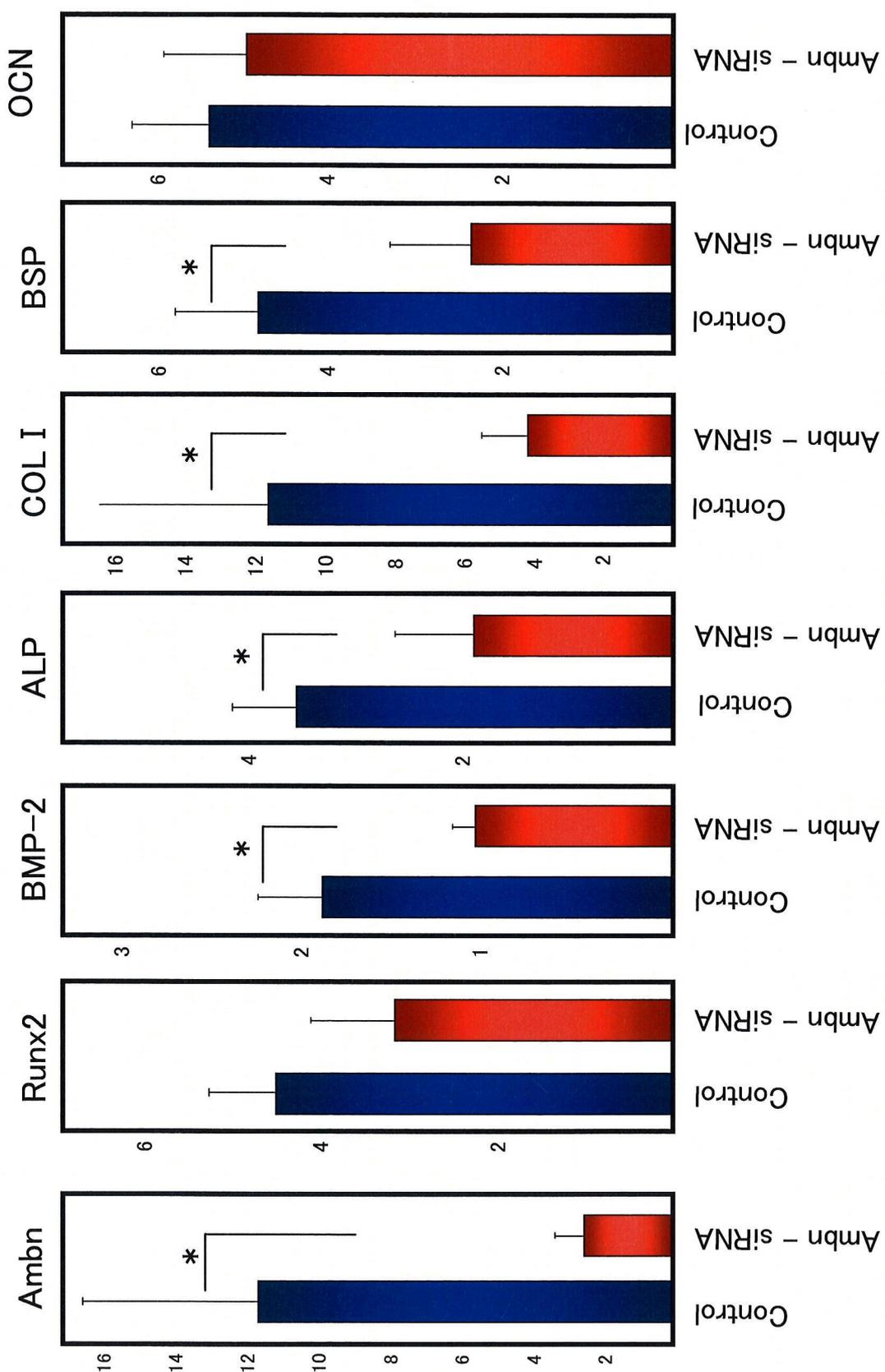


図5. アメロブラスチン(Ambn)発現抑制による各種石灰化関連因子mRNAの発現変化 (real time RT-PCR)

siRNAによるアメロブラスチンの発現抑制により、BMP-2、ALP、COL I およびBSP mRNAの有意な発現の低下を認める。(* p < 0.05)

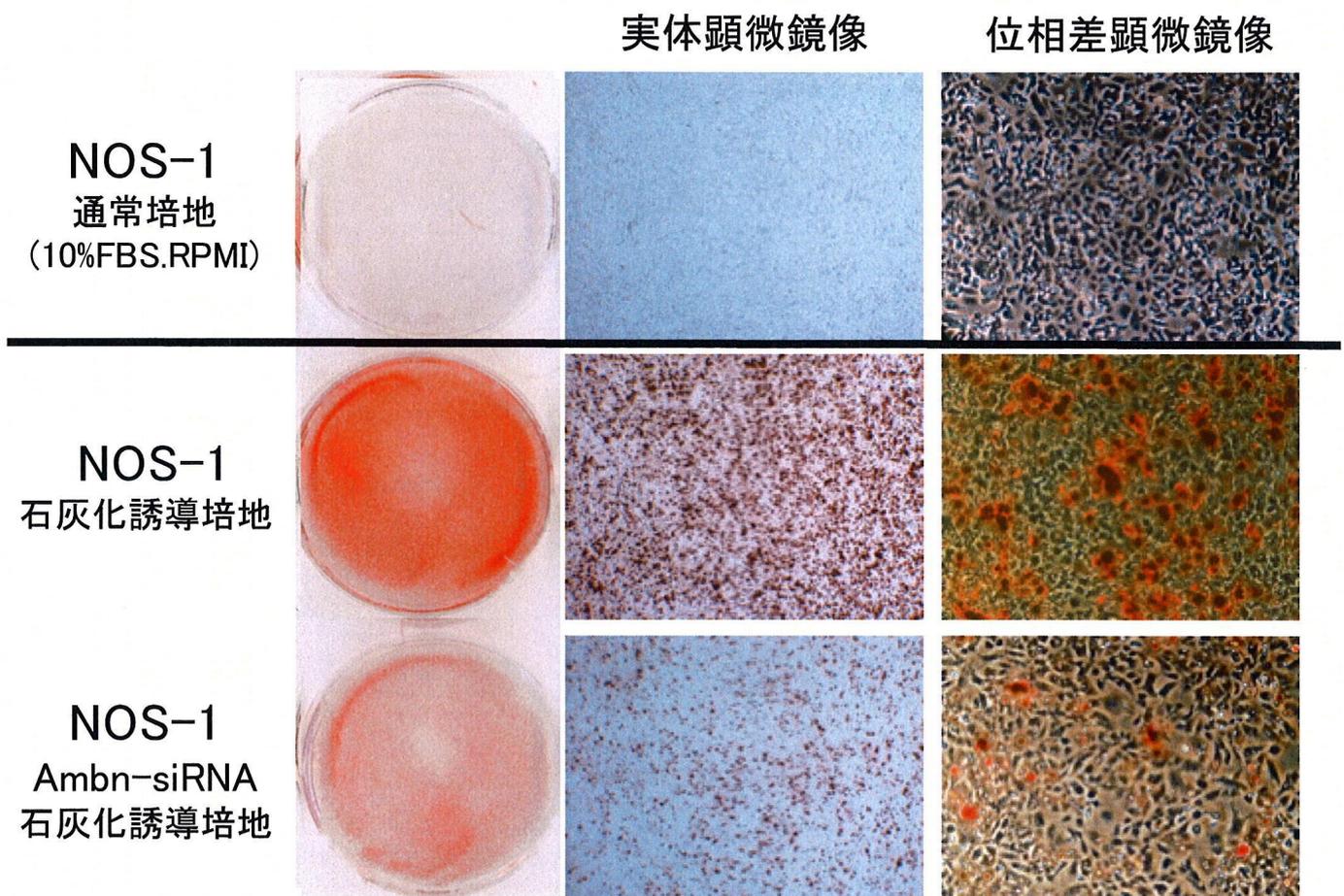
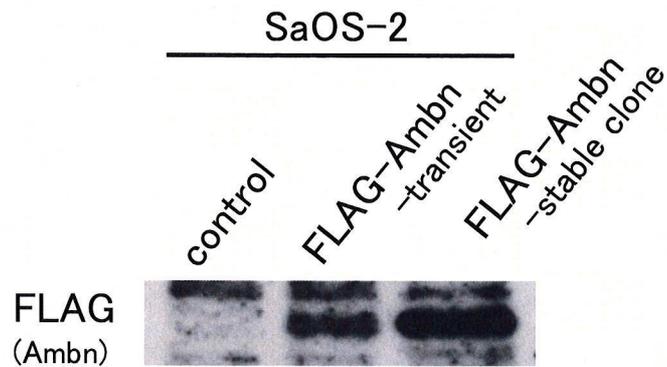


図6. アメロブラスチンの発現抑制の石灰化物形成能への影響
(ALZ染色、培養4日目)

石灰化誘導培地による培養で、NOS-1細胞は強い石灰化物形成を示すが、siRNAによるアメロブラスチンの発現抑制により、石灰化物形成能の低下が認められる。

A. Western blot法



B. 蛍光抗体法

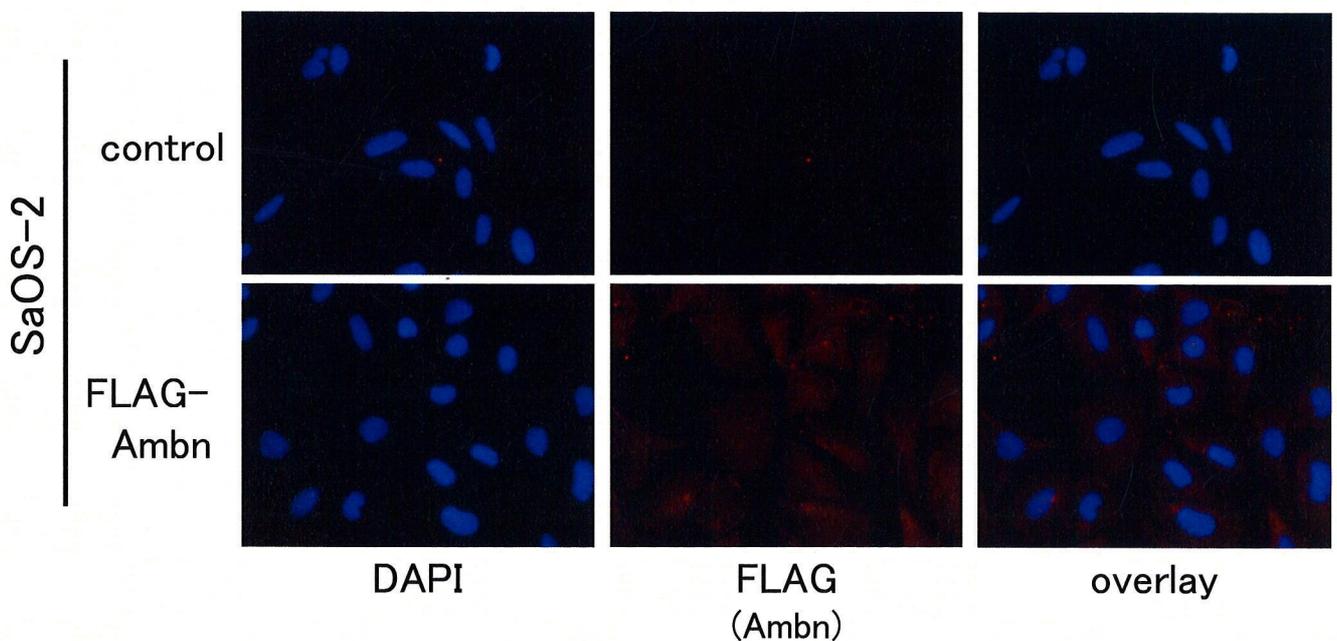


図7. アメロブラスチン(Ambn)過剰発現細胞におけるアメロブラスチンタンパクの発現

アメロブラスチンの発現がみられないSaOS-2細胞に遺伝子導入によりアメロブラスチンを過剰発現させた結果、アメロブラスチンタンパクの発現がWestern blot(A)および蛍光抗体法(B)により確認できる。

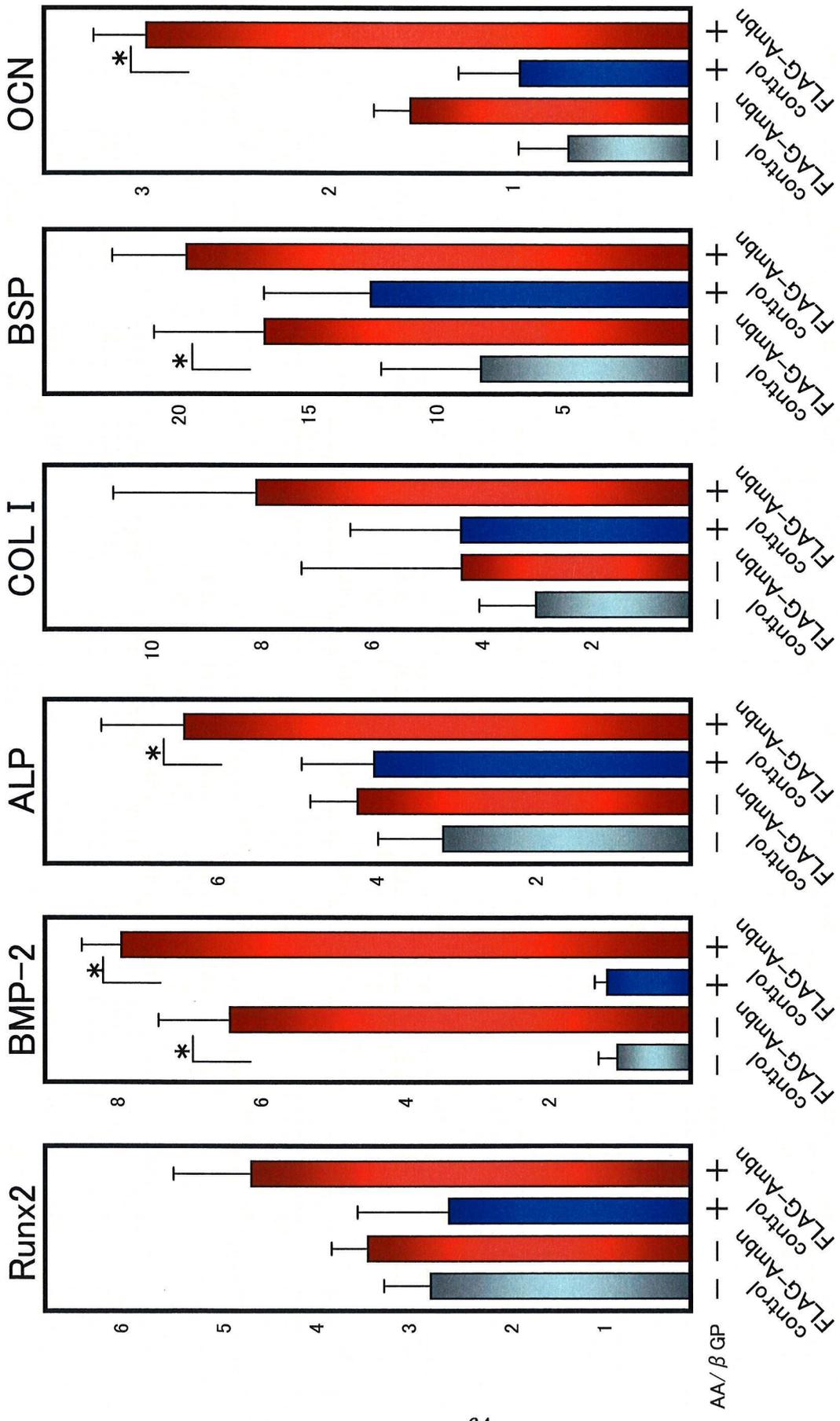
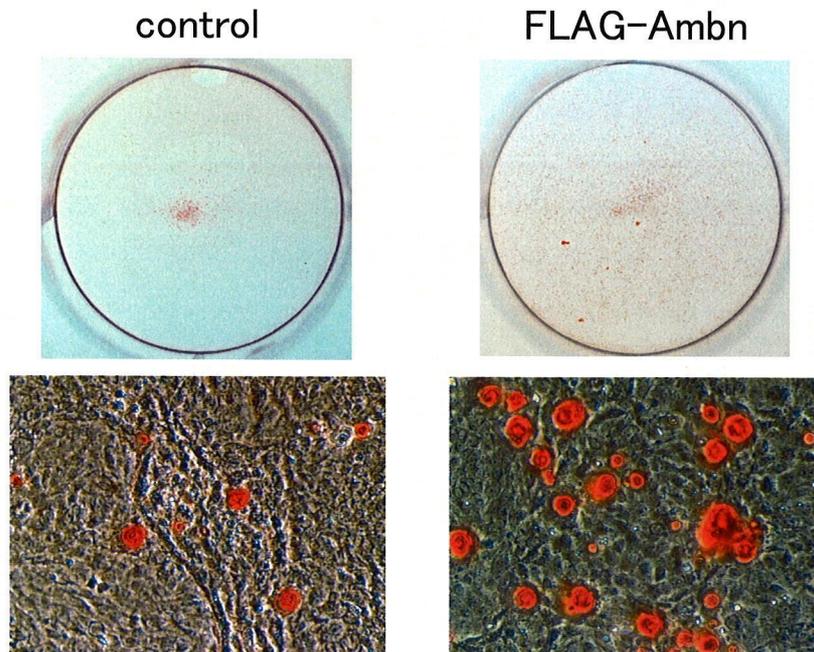


図8. アロブラスチン(Ambn)過剰発現細胞における各種石灰化関連因子mRNAの発現変化 (real time RT-PCR)

アロブラスチンを過剰発現させたSaOS-2細胞において、BMP-2、ALP、BSPおよびOCN mRNA発現の有意な上昇を認める。(* p < 0.05)

A. ALZ染色



B. 石灰化物の定量

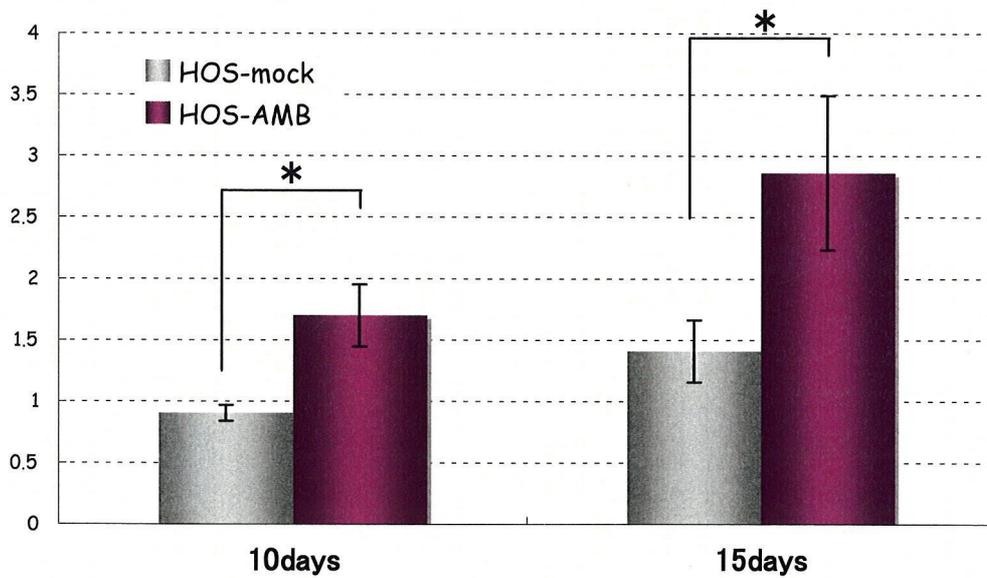
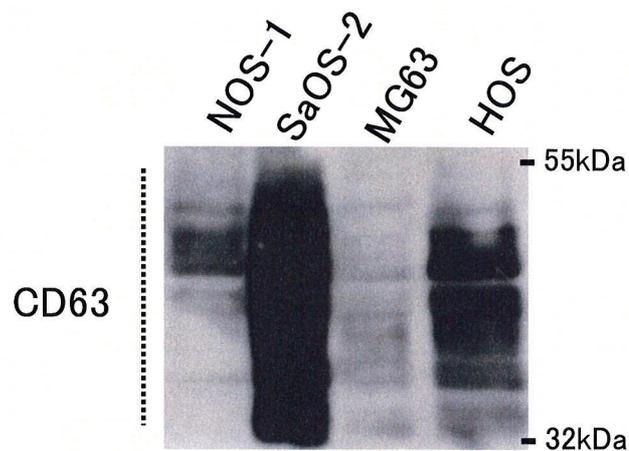


図9. アメロブラスチン過剰発現細胞の石灰化物形成能への影響

- A. アメロブラスチンを過剰発現させた細胞では、石灰化形成能の亢進が認められる。
- B. 形成された石灰化物の定量を行った結果、培養10、15日目において有意な差を認める。(* $p < 0.05$)

A. 骨芽細胞様細胞におけるCD63の発現



B. アメロブラスチンとCD63との結合

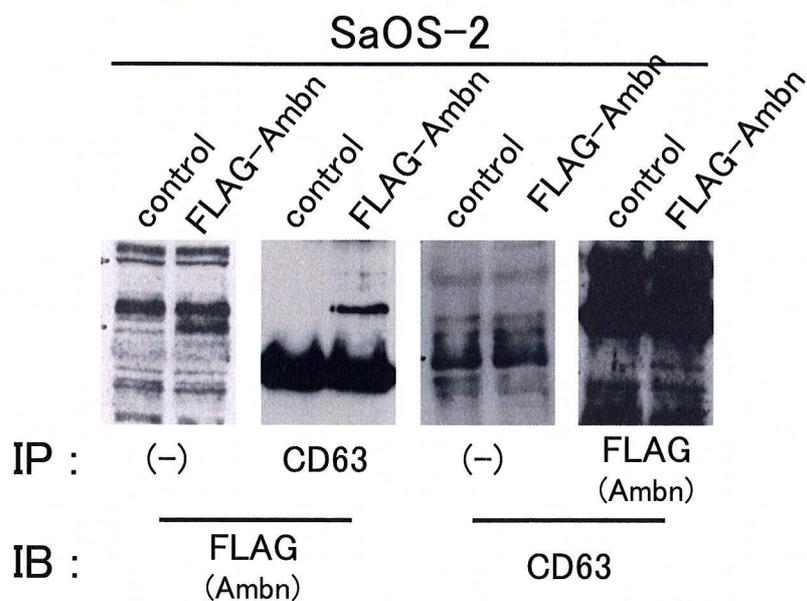
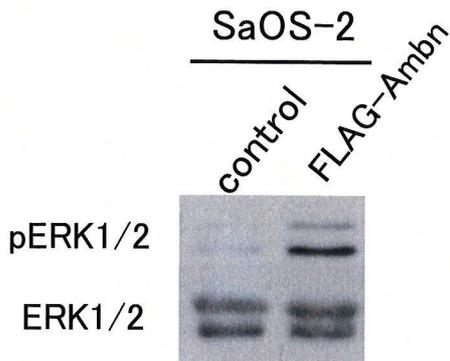


図10. 骨芽細胞におけるアメロブラスチン(Ambn)結合タンパクの検討

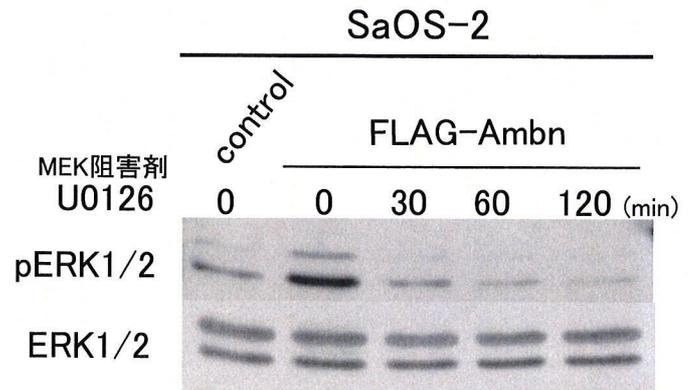
A. Western blotによる検討の結果、NOS-1、SaOS-2およびHOS細胞にCD63の発現が認められる。

B. アメロブラスチン(FLAG-tag)およびCD63の免疫沈降によりCD63およびアメロブラスチン(FLAG-tag)が検出されたことから、アメロブラスチンとCD63が結合していることがわかる。

A. ERKのリン酸化



B. MEK阻害剤によるpERKへの影響



C. Elkのリン酸化

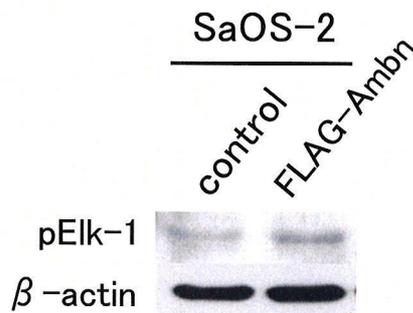
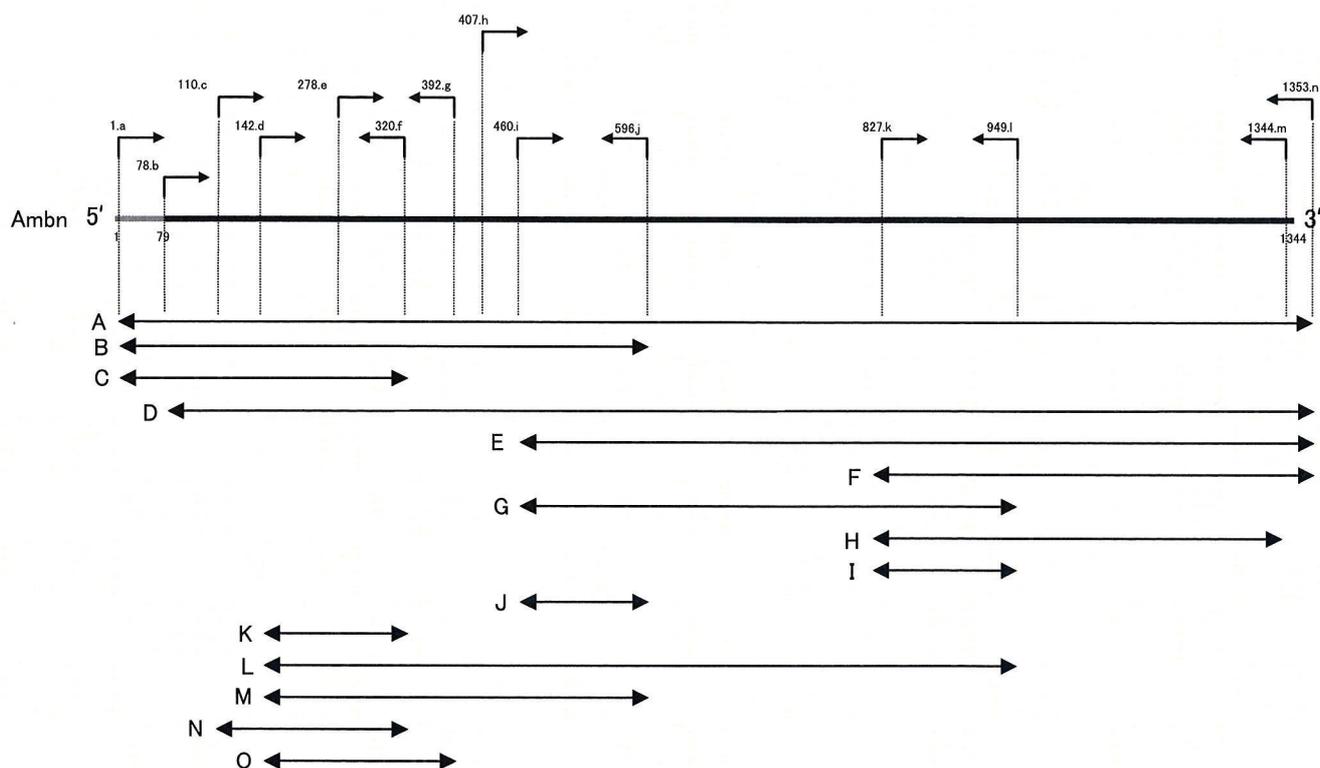


図11. アメロラスチン(Ambn)過剰発現細胞における細胞内シグナル伝達機構の検討

- アメロラスチン過剰発現細胞では、ERKの著明なリン酸化が認められる。
- アメロラスチン過剰発現細胞で認められるERKのリン酸化は、MEK阻害剤 U0126投与により抑えられる。
- アメロラスチン過剰発現細胞では、Elkのリン酸化が認められる。

A. アメロブラスチンのmRNAに対する各種primer



B. 各種primerに対する増幅

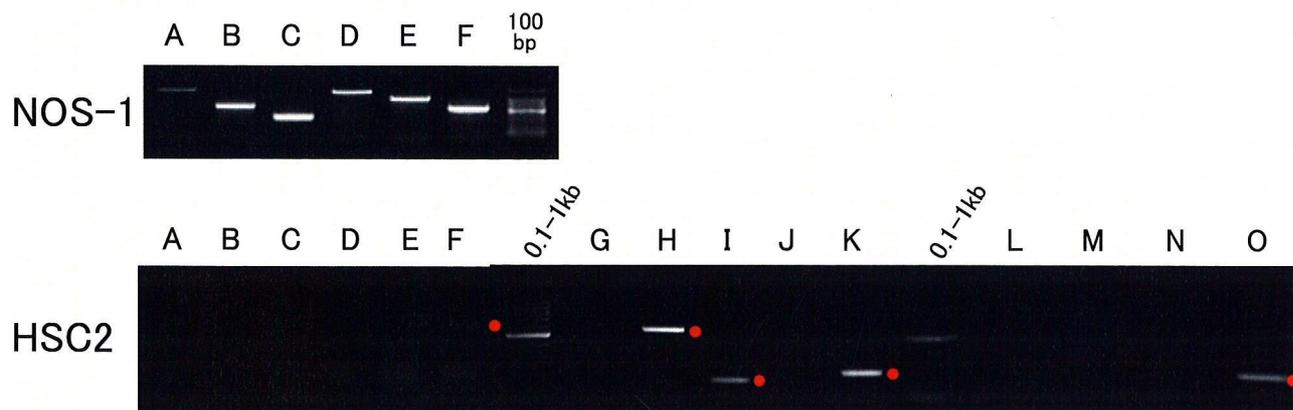


図12. 非石灰化細胞におけるアメロブラスチンの発現

A. アメロブラスチンのmRNAに対する各種primerの設計部位(表1参照)

B. 骨芽細胞様細胞株(NOS-1)では、すべての領域でアメロブラスチンmRNAの発現がみられるが、石灰化能を有さない扁平上皮癌細胞株(HSC2)にもいくつかの領域(●)でアメロブラスチンのmRNA発現が認められる。

Ameloblastin (sheathlin, amelin)

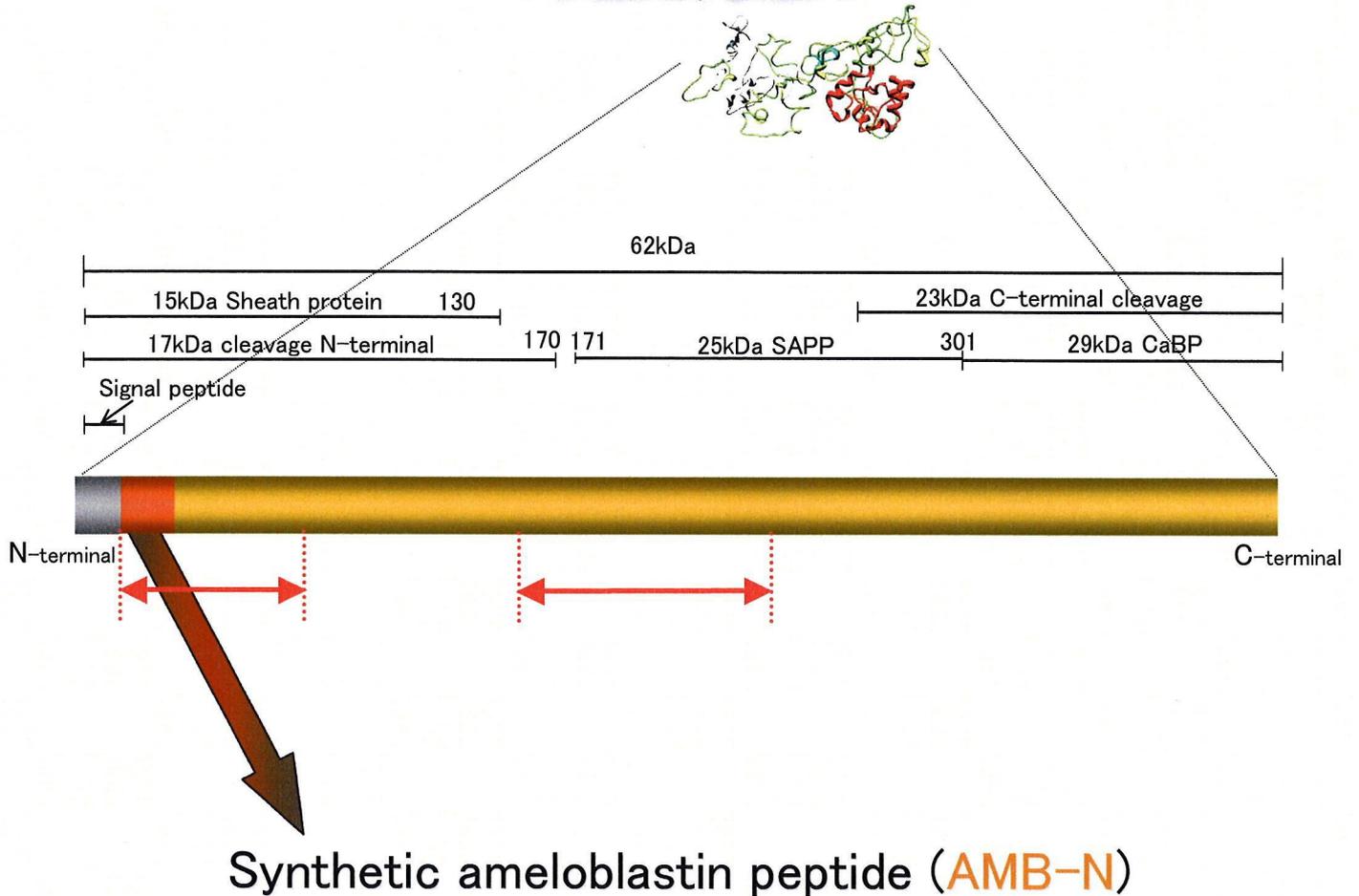


図13. アメロブラスチン合成ペプチド作製部位

図12の結果から石灰化と関連する可能性のある領域(←→)のうち、種を超えてよく保存されているアメロブラスチンN末端部の合成ペプチド(AMB-N)を作製することにした。

A. RT-PCR

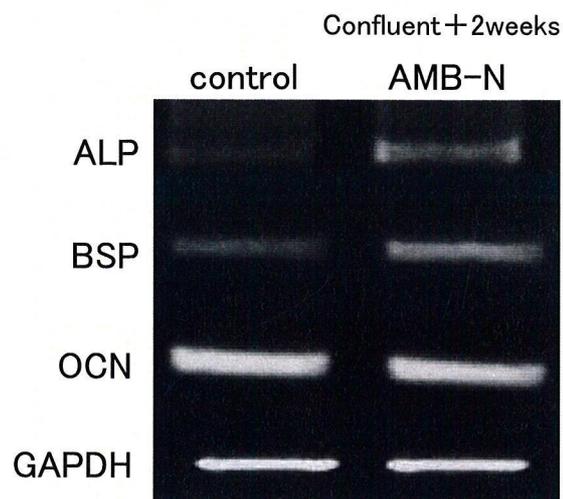
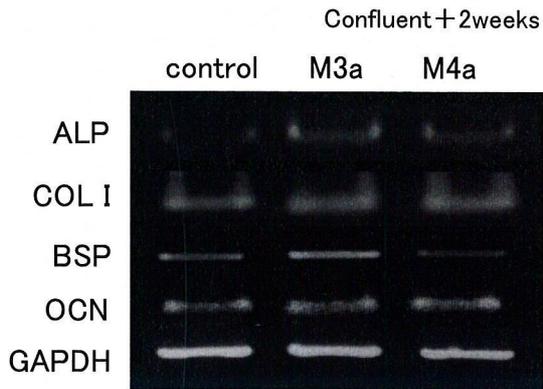


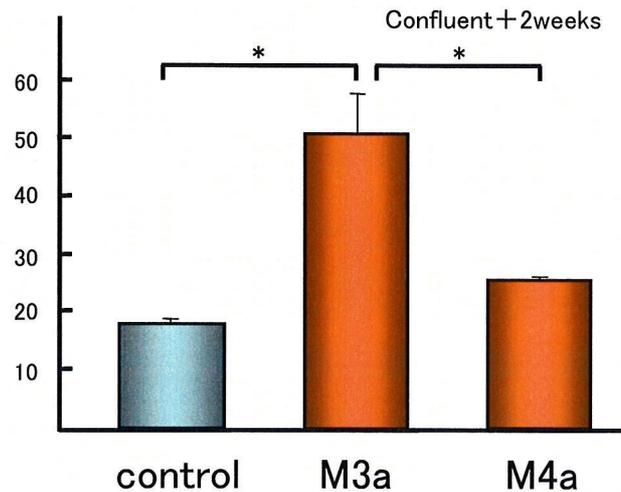
図14. AMB-N添加の骨芽細胞への影響

AMB-N添加によりMC3T3-E1細胞のALPおよびBSPのmRNA発現が上昇する。

A. RT-PCR



B. ALP活性



C. ALZ染色

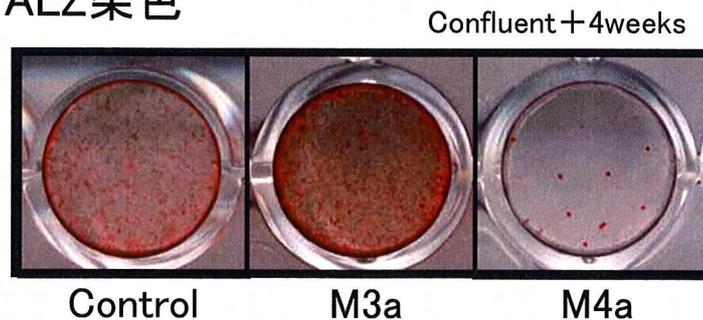


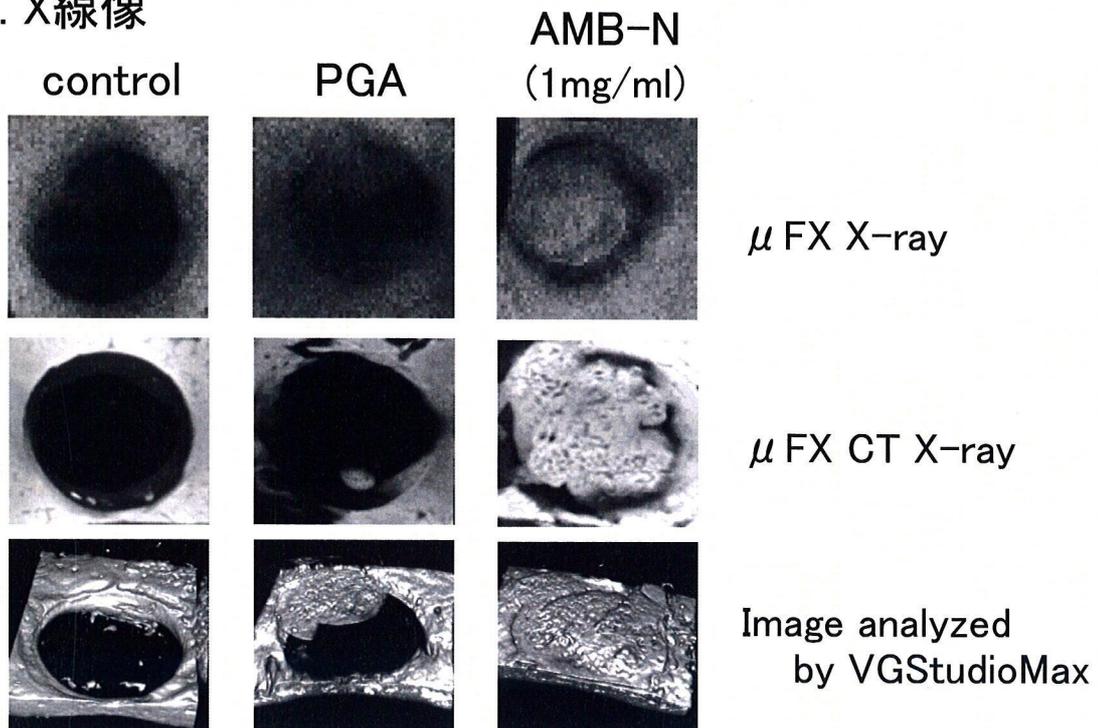
図15. AMB-N配列の遺伝子導入による骨芽細胞への影響

A. 合成されたAMB-Nを細胞外へ分泌するM3a細胞のみで、ALPおよびBSPのmRNA発現が上昇する。

B. M3a細胞でのみ、ALP活性が上昇する。（* $p < 0.05$ ）

C. M3a細胞でのみ、石灰化物形成能が上昇する。

A. X線像



B. 新生骨の定量

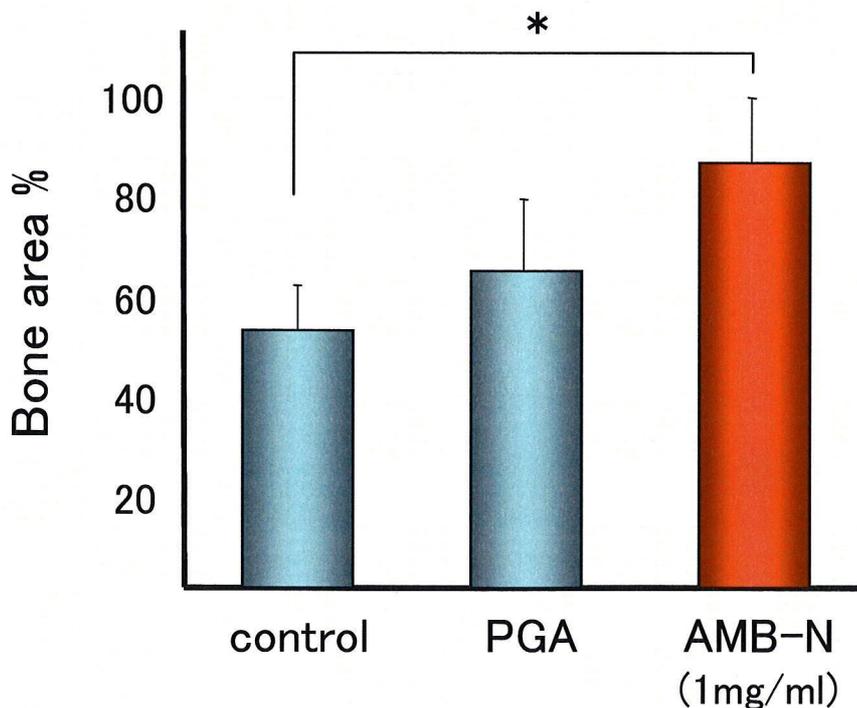
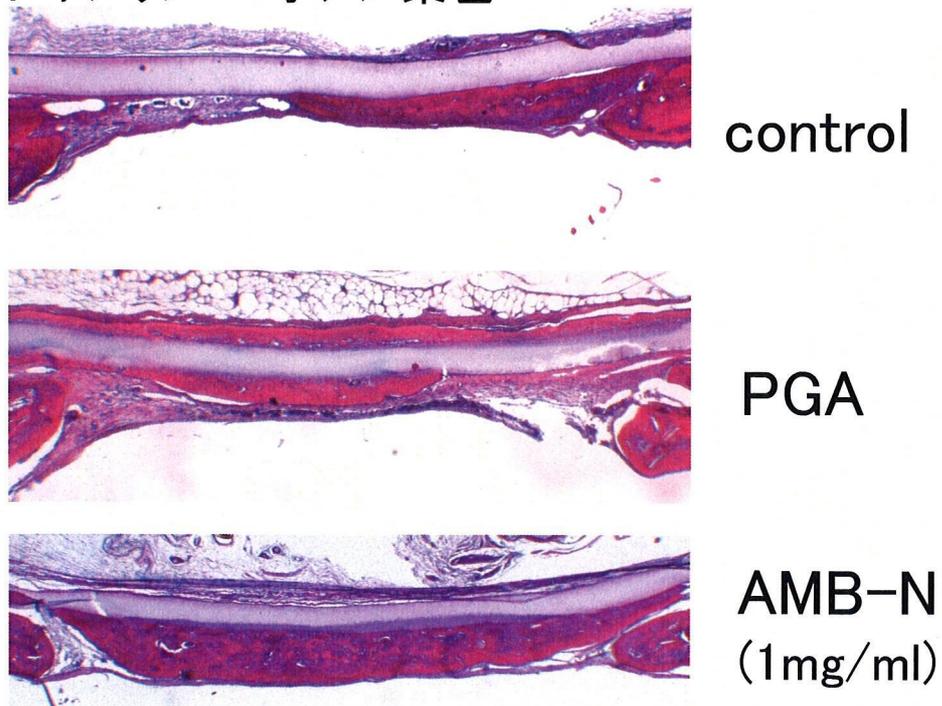


図16. AMB-Nの骨形成促進効果(X線学的評価)

- A. AMB-N投与群ではcontrol群に比べ、早期の骨欠損閉鎖が観察される。
(PGA:プロピレングリコールアルギネート)
- B. 定量的評価でも、AMB-N投与により有意な新生骨の形成が認められる。
calculated by Scion Image (* p<0.05)

A. ヘマトキシリン-エオジン染色



B. 新生骨の定量

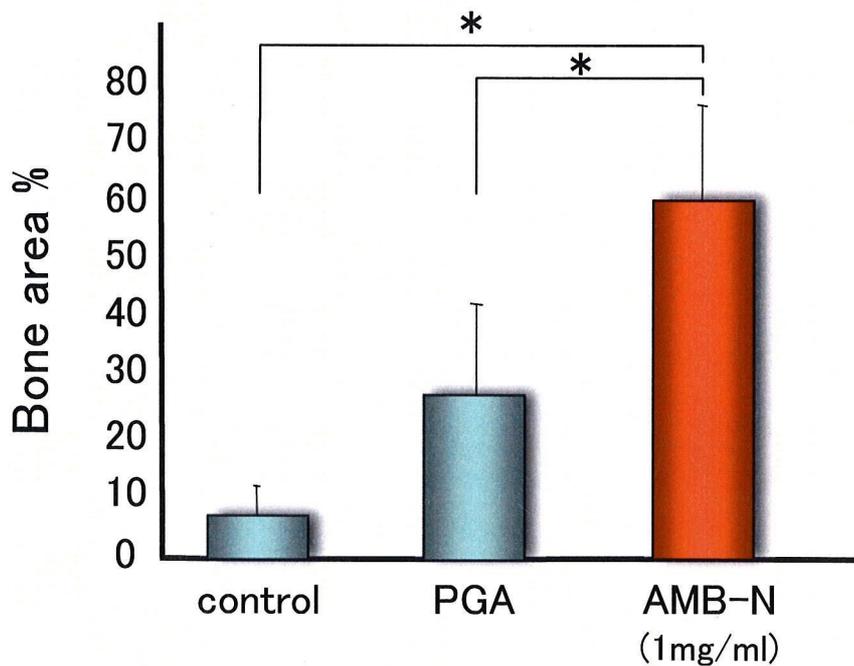


図17. AMB-Nの骨形成促進効果(組織学的評価)

- A. AMB-N投与群ではcontrol群に比べ、新生骨形成の亢進が観察される。
(PGA:プロピレングリコールアルギネート)
- B. 定量的評価でも、AMB-N投与により有意な新生骨量の増加が認められる。
calculated by Scion Image (* p<0.05)

アメロブラスチン

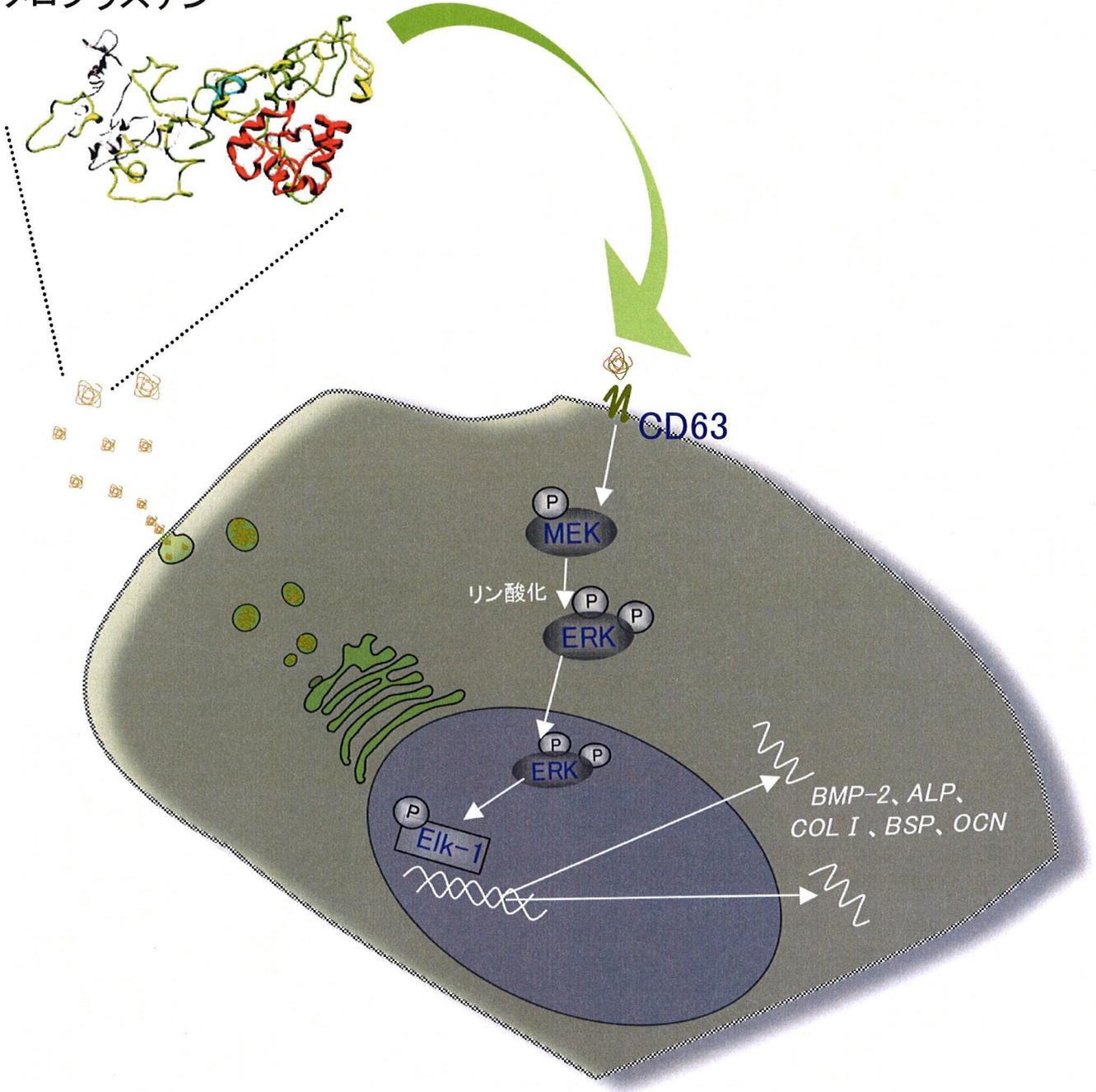


図18. アメロブラスチンによる骨芽細胞の石灰化促進作用機序について

骨芽細胞がアメロブラスチンを合成・分泌し、細胞外基質に分泌されたアメロブラスチンは、オートクラインまたはパラクライン的に細胞膜受容体CD63と結合する。その後、MEK/ERKのリン酸化を介し、転写因子Elkを活性化し、石灰化関連因子の転写が促されることが示唆される。