

[最近のトピックス]

ヒト歯髄組織の再利用

伊藤 勝敏

生体機能・病態学系 顎顔面口腔外科学

歯髄組織は、歯の形成・維持にきわめて重要な働きをしている。また、歯髄組織は加齢や咬合圧などの間接刺激により第二象牙質を形成し、齲蝕などの直接刺激によりdentin bridgeのような第三象牙質を形成する。他方、イヌやウサギの歯髄を用いた異所性移植実験において、骨や骨様象牙質が形成されること^{1,2)}、さらにラット歯髄を象牙質・歯髄複合体として、あるいはシリコンチューブに入れた状態で筋肉内に自家移植すると、象牙細管を有する象牙質が形成されることが報告された³⁾。こうした歯髄組織の硬組織誘導現象には、骨形成タンパク質（Bone morphogenetic proteins : BMPs）の関与が示唆されている。

歯髄のBMP研究では、1994年ヒト歯髄由来の培養細胞にBMP-2, BMP-4, BMP-6のmRNA発現がはじめて報告された⁴⁾。1996年培養していないヒト歯髄組織においてもBMP-2, BMP-4, BMP-7 (OP-1)のmRNA発現が確認された⁵⁾。しかし、タンパク質レベルでの研究はほとんどおこなわれていない。

年齢20歳から30歳までの男女上下顎第三大臼歯の健全歯およびC₁の齲歯からヒト歯髄組織を採取して、ヒト歯髄組織におけるBMP-2タンパク質の発現を解析した。歯髄組織のSDS溶解液を電気泳動後、抗BMP-2抗体を用いてウェスタンブロッティング解析をおこなった結果、強いシグナルを示すバンドが50kDaの位置に（図1 A-a）、弱いバンドが32kDa, 25kDa, 16kDaの位置に検出された（図1 A-bはポジティブコントロールに用いたrhBMP-2）。ウェスタンブロッティングで検出された50kDaのバンドがBMP-2の前駆体であること確認するため、FLAG-BMP-2融合タンパク質をCOS-7細胞に発現させ、抗BMP-2抗体の特異性を検討した。ウェスタンブロッティングの結果、抗BMP-2, 抗FLAGともに62kDaの位置に強いシグナルが検出された（図1 B-a）。この結果は、今回用いた抗BMP-2抗体がBMP-2に対して高い特異性を有することを示すものであり、歯髄で検出された50kDaのバンドは、BMP-2の前駆体であることが強く示唆された。

本研究の結果から、ヒト歯髄組織のBMP-2タンパク質は主に前駆体の状態で存在しており、生理的状態の歯髄組織は石灰化に関して休眠状態にあることが示唆された。また、ヒト歯髄組織におけるBMP前駆体のプロセッシングならびに機能発現の制御機構を解明することは、歯髄生物学領域で重要であり、歯髄の恒常性維持機構の解明につながる可能性が示唆された。

文献

1. Yamamura T, Shimono M, Koike H, Terao M, Tanaka Y, Sakai T, Inoue T, Yoshiki S, Tachikawa T, Kawahara H, Watanabe O : Differentiation and induction of undifferentiated mesenchymal cells in tooth and periodontal tissue during wound healing and regeneration. Bull Tokyo dent Coll : 21, 181-221, 1980
2. Inoue T, Tanaka Y, Shimono M, Yamamura T : Osteogenic activity of transplanted dental pulp. JPN J Oral Biol : 26, 1344-1346, 1984
3. 下野正基 : 象牙質様硬組織の誘導. 歯医学誌 : 15 : 128-135, 1996
4. Takeda K, Oida S, Ichijo H, Imura T, Maruoka Y, Amagasa T, Sasaki S : Expression of bone morphogenetic protein genes in the human dental pulp cells. Bone 15 : 467-470, 1994
5. Gu G, Smoke RH, Rutherford RB : Expression of genes for bone morphogenetic proteins and receptors in human dental pulp. Arch Oral Bio 141 : 919-923, 1996

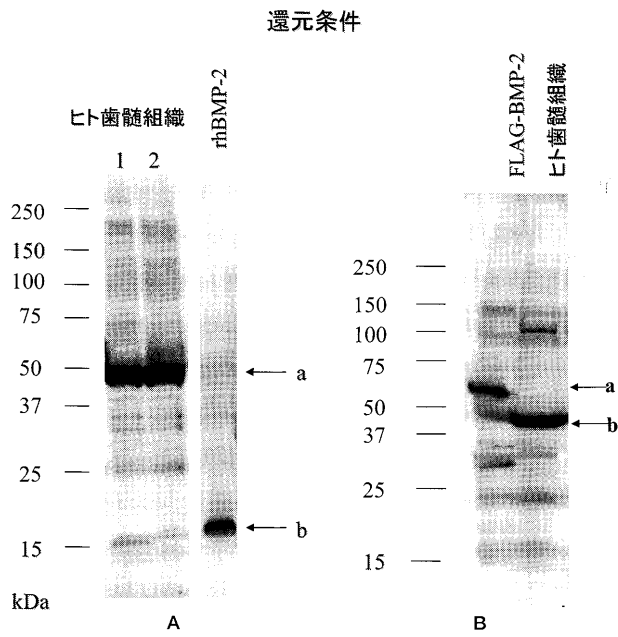


図 1

図 1 A ウェスタンブロッティング法による BMP-2 の検出

ヒト歯髄組織では (lane 1, 2), 抗BMP抗体と反応するメインバンドが50kDa (矢印a) に、弱いシグナルが34kDa, 25kDa, 16kDaの位置に検出された。一方、リコンビナントヒトBMP-2は、還元条件により二量体のs-s結合が切れるため、シグナルは16kDa (矢印b) の位置に存在していた。

B FLAG-BMP-2 融合タンパク質の発現と抗BMP-2 抗体の特異性の検証

ヒトBMP-2の全コーディング領域を組込んだpIRES-hrGFP-1aベクターをCOS7細胞に導入し、FLAGとの融合タンパクを発現させた。発現した融合タンパク質に、抗BMP-2抗体を用いてウェスタンブロッティングをおこなった。融合タンパクに対しては62kDa (矢印a)、ヒト歯髄組織に対しては50kDa (矢印b) のバンドがそれぞれ検出された。