

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：34408

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06742

研究課題名(和文) エムドゲイン由来新規骨形成ペプチドを用いたインプラント周囲骨増生法の開発

研究課題名(英文) The development of method for bone formation surround dental implant using the synthetic oligopeptide derived from emdogain.

研究代表者

片山 暢仁 (KATAYAMA, Nobuhito)

大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤)

研究者番号：00761842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は歯科インプラント治療におけるインプラント周囲の骨増生に有用な骨組織再生材料の開発を目的として、エムドゲイン由来新規骨形成ペプチドに着目し、新規骨形成ペプチドが骨再生に重要な役割を果たすヒト間葉系幹細胞の細胞増殖能と骨組織形成能を促進する作用があるかどうか検討を行った。本研究の成果として、新規骨形成ペプチドはヒト間葉系幹細胞の細胞増殖能と骨組織形成能を活性化させ、骨組織の再生に有用な生体材料である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated whether a synthetic oligopeptide derived from EMD can contribute the induction of bone formation surround dental implant. We found the synthetic oligopeptide promote the cell proliferation and hard tissue formation, so the synthetic oligopeptide might be useful for bone formation in the treatment of dental implant.

研究分野：硬組織再生

キーワード：エムドゲイン インプラント

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 本研究は歯科インプラント治療におけるインプラント周囲の骨増生に有用な骨組織再生材料の開発を目的として、エムドゲイン由来新規骨形成ペプチドに着目した。
- (2) この新規骨形成ペプチドはエムドゲインを用いた基礎研究から得られた本研究チームのオリジナルの骨形成を促進するペプチドである。
- (3) 申請者はこの新規骨形成ペプチドが骨再生に重要な役割を果たすヒト間葉系幹細胞の細胞増殖能と骨組織形成能を促進する作用があることを発見し、骨組織の再生に有用な生体材料である可能性を示した。

## 2. 研究の目的

そこで申請者はエムドゲイン由来新規骨形成ペプチドがインプラント周囲の骨増生にも有用であるのか検討し、新規インプラント周囲骨増生材料として臨床応用につなげることを目的としている。

## 3. 研究の方法

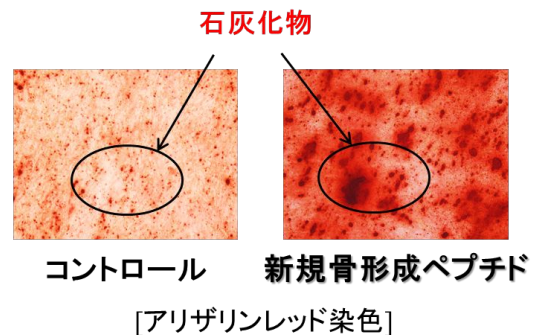
- (1) 理化学研究所より骨再生に重要なヒト間葉系幹細胞の提供を受けて増殖させ、実験に必要な細胞数を確保する。チタン合金上でヒト間葉系幹細胞を培養し、新規骨形成ペプチドを各種の濃度 (0, 10, 100, 1000 ng/mL) で培養液に溶解し細胞に作用させ、遺伝子・タンパクを抽出する。
- (2) 硬組織形成能、骨形成に関連する遺伝子発現 (Real-time-PCR)、骨形成シグナルの発現 (ウエスタンブロット) を検討する。
- (3) 骨形成シグナルの発現として、細胞増殖や分化に重要な働きを担う MAPK シグナルの発現の検討を行った。

## 4. 研究成果

- (1) 細胞増殖試験  
新規骨形成ペプチドを各種の濃度 (0, 10, 100, 1000 ng/mL) で培養液に溶解しヒト間葉系幹細胞に作用させ、ナカライ社製 Cell Count Reagent SF にて検討を行った。新規骨形成ペプチド添加群では対照群と比べて有意に細胞増殖能が促進され、10 ng/mL 濃度で最も細胞増殖能が促進されることがわかった。

- (2) Type 1 collagen、Osteocalcin 産生量の測定  
新規骨形成ペプチドを各種の濃度 (0, 10, 100, 1000 ng/mL) で培養液に溶解しヒト間葉系幹細胞に作用させ、Takara 社製 PIP EIA kit と Osteocalcin EIA kit を用いて、それぞれのタンパク産生量の測定を行った。新規骨形成ペプチド添加群では対照群と比べて有意にそれぞれのタンパク産生量が促進され、10 ng/mL 濃度で最も細胞増殖能が促進されることがわかった。

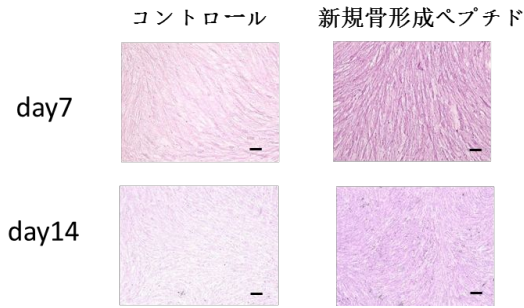
- (3) 硬組織形成能 (アリザリンレッド染色)  
新規骨形成ペプチドを各種の濃度 (0, 10, 100, 1000 ng/mL) で培養液に溶解しヒト間葉系幹細胞に作用させ、同仁堂社製 アリザリンレッドを用いて石灰化物形成能を評価した。新規骨形成ペプチド添加群ではアリザリンレッドによって赤く染色された石灰化物が対照群と比べて多くみられることがわかった。



- (4) 硬組織形成能 (ギ酸抽出法)  
新規骨形成ペプチドを各種の濃度 (0, 10, 100, 1000 ng/mL) で培養液に溶解しヒト間葉系幹細胞に作用させ、ナカライテスク社製 ギ酸を用いて細胞外マトリックスへのカルシウム析出量の測定を行った。新規骨形成ペプチド添加群ではアリザリンレッドによって赤く染色された石灰化物が対照群と比べて多くみられることがわかった。

- (5) ALP 活性の測定  
新規骨形成ペプチドを各種の濃度 (0, 10, 100, 1000 ng/mL) で培養液に溶解しヒト間葉系幹細胞に作用させ、Thermo Scientific 社製 1step pnp を用いて ALP 活性の測定を行った。新規骨形成ペプチド添加群では ALP 活性が対照群と比べて有意に促進することがわかった。

- (6) ALP 染色の測定  
新規骨形成ペプチドを添加した培養液でヒト間葉系幹細胞を培養し、Sigma 社製 ALP staining kit を用いて ALP 染色を行った。新規骨形成ペプチド添加群では ALP 染色の染色強度が対照群と比べて有意に促進することがわかった。

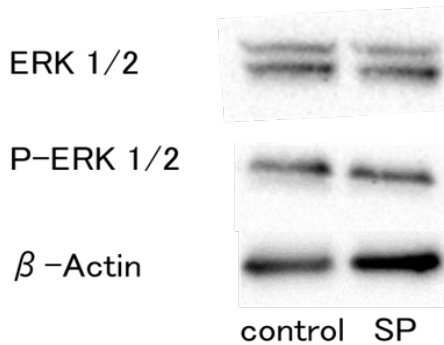


(7) その他（新規骨形成ペプチドを用いた成果）

歯肉線維芽細胞の細胞増殖、接着、ERK 経路活性化への影響

SP に対するヒト歯肉線維芽細胞の増殖は 10, 100 ng/ml 濃度の SP 添加 1 日, 3 日, 5 日, 7 日の培養後の評価において, SP 添加群で対照群と比較して有意に高い値を示した。SP に対するヒト歯肉線維芽細胞の接着は 100 ng/ml 濃度の SP 添加 15 分, 60 分, 120 分, 240 分の培養後の評価において, SP 添加群で対照群と比較して有意に高い値を示した。

ヒト歯肉線維芽細胞の ERK リン酸化に及ぼす SP の影響についてウエスタンブロット法を用いて検討を行った。SP はヒト歯肉線維芽細胞の ERK シグナルのリン酸化を増強した



ヒト歯髄幹細胞（HDPSC）への新規骨形成ペプチドの影響

HDPSC に対する EMD 由来合成ペプチドの細胞増殖への影響は 10, 100 ng/ml 濃度の EMD 由来合成ペプチド添加 5 日, 7 日の培養後の評価において, 両 EMD 由来

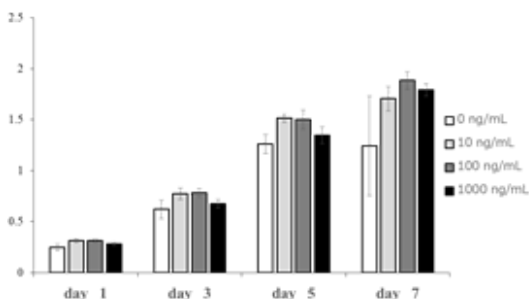


Figure.1 The effects of SP on cell proliferation in DPSCs.

合成ペプチド添加群では対照群と比較して有意に高い値を示し, 100 ng/ml 濃度の EMD 由来合成ペプチド添加群が最も有意に高い値を示した。

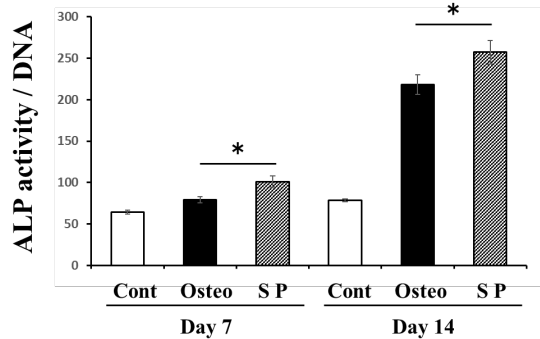


Figure.3 The effects of SP on ALP activity in DPSCs.

また HDPSC に対する EMD 由来合成ペプチドの硬組織分化への影響は培養開始 7 日, 14 日において ALP 活性(上図), カルシウム析出量, および石灰化物形成能(下図)を有意に促進した。

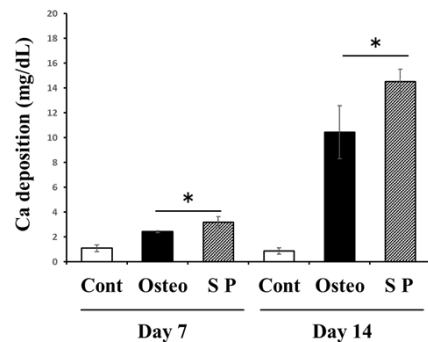
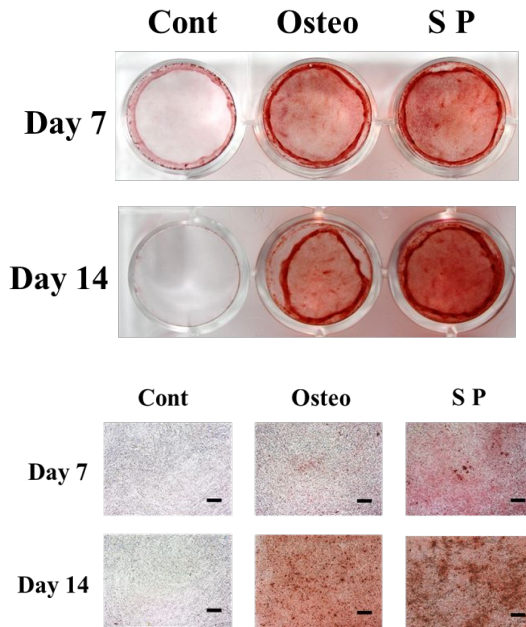
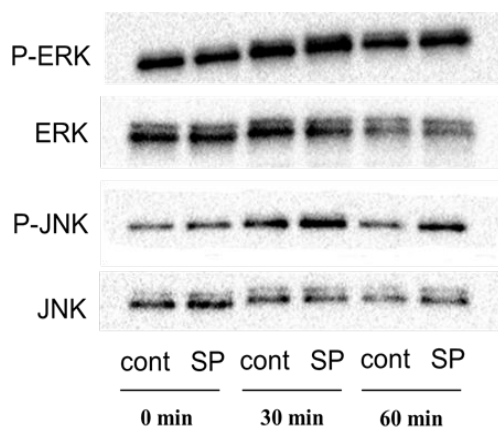


Figure.4 The effects of SP on calcium deposition in DPSCs.

さらに、ヒト歯髄幹細胞の ERK、JNK のリン酸化に及ぼす SP の影響についてウエスタンブロット法を用いて検討を行った。SP はヒト歯髄幹細胞の ERK および JNK シグナルのリン酸化を増強することが明らかになった。

したがって、エムドゲインと同様に、新規骨形成ペプチドは MAPK 経路を介して、ヒト歯髄幹細胞の細胞増殖、硬組織分化を促進する可能性が示唆された。



大阪歯科大学・歯学部・准教授

梅田 誠 (UMEDA, Makoto)  
大阪歯科大学・歯学部・教授

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計1件)

野口正皓、田口洋一郎、山脇 勲、片山暢仁、高橋宰達、梅田 誠  
高グルコース環境と *Porphyromonas gingivalis* 刺激におけるヒト骨髄間葉系細胞に対する vitamin E の影響  
第146回日本歯科保存学会学術大会  
2017年6月10日 リンクステーション青森 (青森県、青森市)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

片山 暢仁 (KATAYAMA, Nobuhito)  
大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤)  
研究者番号: 00761842

##### (2)研究協力者

嘉藤 弘仁 (KATO, Hirohito)  
大阪歯科大学・歯学部・助教

山脇 勲(YAMAWAKI, Isao)  
大阪歯科大学・歯学部・大学院生

田口 洋一郎 (TAGUCHI, Yoichiro)