

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11219

研究課題名(和文)セメント芽細胞分化誘導を基軸とした歯周組織再生型インプラントの基盤開発

研究課題名(英文)A basic research on dental implants with periodontal tissue based on induction of cementblast differentiation

研究代表者

迫田 賢二 (SAKODA, Kenji)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：70419654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯周組織再生療法に使われているエナメルマトリックスタンパク(EMD)で間葉系幹細胞を刺激するとセメント質形成に關与するCEMP-1の発現が亢進した。

CEMP-1の発現には転写因子HIF-1が関わっている。歯根膜線維芽細胞(HPDLF)をEMDで刺激してもHIF-1の転写活性が上昇した。HIF-1の標的分子にSDF-1がある。SDF-1は間葉系幹細胞を誘導することからその産生について調べた。

HPDLFをEMD刺激することでSDF-1の産生量が増加した。したがってSDF-1は間葉系幹細胞の誘導による歯周組織再生を促す可能性があり、EMDとSDF-1のインプラントへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that CEMP-1 expression was enhanced by stimulating mesenchymal stem cells with enamel matrix protein (EMD).

The expression of CEMP-1 involves the transcription factor HIF-1. We found that stimulation of periodontal ligament fibroblasts (HPDLF) with EMD raises HIF-1 transcriptional activity. One target molecule of HIF-1 is SDF-1. Since SDF-1 induces mesenchymal stem cells, we investigated its production.

We found that SDF-1 production increased when HPDLF were stimulated with EMD. Therefore, SDF-1 may promote periodontal regeneration by induction of mesenchymal stem cells. EMD and SDF-1 are expected to be applied to dental implant treatment.

研究分野：歯周病学

キーワード：エナメルマトリックスタンパク SDF-1 HIF-1

### 1. 研究開始当初の背景

歯周組織再生療法には、GTR 法とエムドゲイン®療法があり、前者では有細胞セメント質が、後者では無細胞セメント質が再生してくるといわれている。その詳細なメカニズムには未解明な点も多く存在するが、そもそも、どうして有細胞セメント質と無細胞セメント質の2種類あるのかは不明である。2つのセメント質の作られるスピードが違うことは昔から知られており、無細胞セメント質に対して有細胞セメント質の方が速い(*J Clin Periodontol. 1990;17(9):663-8*)。しかし、有細胞セメント質の付着強度には疑問がもたれていることや、(*Quintessence Int. 1998;29(10):621-30*)、歯周組織再生療法において再生させようとしているのは歯周炎で破壊された歯根歯頸側の無細胞セメント質が主であることから、有細胞セメント質の再生は真の意味での歯周組織再生とはいえないかもしれない。そこで、無細胞セメント質の再生・構築が速く効率的にできれば予知性の高い治療になると思われ、未だ不明な点が多いセメント芽細胞に焦点を当てセメント芽細胞分化誘導に着目した。

我々は、骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)を用いてチタン表面上でのセメント芽細胞分化誘導を試みた結果、エナメルマトリックスタンパク(EMD)を固定したチタン表面上でMSCはセメント芽細胞のマーカーの一つであるCEMP1を発現し、Nogginを添加することでCEMP1の発現が有意に亢進した。また、Choiらはマウスの歯根形成や歯周組織形成が低酸素状態で起こる事を示し、低酸素はHIF-1(hypoxia inducible factor 1)依存的に歯由来幹細胞のCEMP1発現とセメント芽細胞分化を促進することを報告した(*Tissue Eng Part A. 2014;20(1-2):410-23.*)。我々もまた、MSCにエムドゲイン®と低酸素模倣剤(DFO; Desferrioxamine, HIF-1安定化剤、透析患者でも使用されているキレート剤)を添加することで、CEMP1発現が亢進することを確認している。

### 2. 研究の目的

研究開始当初、本研究はインプラント周囲に歯周組織付着器官を構築することで、その恒常性と自己再生・修復能および力学的緩衝能を合わせ持った口腔インプラントを提案し、その基盤確立のためにチタン上でのセメント芽細胞分化誘導を行うこととした。そして、歯周組織獲得をインプラント周囲にも求め、歯周組織付着器官を具備した「歯周組織再生型インプラント」開発の基盤を確立することが当初の目的であった。

EMDで間葉系幹細胞を刺激するとCEMP-1の発現が亢進することが分かった。CEMP-1はセメント芽細胞、歯根膜細胞に発現し、セメント質形成に関与しており、CEMP-1の発現には転写因子HIF-1が重要な役割を担っている。そして、研究を進めていく中でヒト歯根膜線維芽細胞(HPDLF)をEMDで刺激したと

ころ、HIF-1の転写活性が上昇した。HIF-1の標的分子の1つにSDF-1がある。SDF-1は間葉系幹細胞を誘導することからその産生についても調べた。また歯周組織再生療法として広く用いられているEMDの作用機序の中に歯周組織、血液から間葉系幹細胞を誘導するという仮説がある。そこでHPDLFを用いて、EMD刺激によるSDF-1産生ならびに炎症性メディエーターであるプロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)の影響について検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### ●細胞培養

ヒト歯根膜線維芽細胞(HPDLFs)はLonza Biosciencesより購入し、stromal cell growth medium(Lonza Biosciences)を用いて継代培養し、4代から7代のものを実験に使用した。

#### ●試薬

EMDはStraumann Institute(Basel, Switzerland)より購入し、1% trifluoroacetic acid(Sigma, St Louis, MO, USA)に10 mg ml<sup>-1</sup>の濃度で溶解し冷凍保存した。この保存溶液は実験の直前に解凍して使用した。PGE<sub>2</sub>とLY294002(PI3Kの特異的阻害剤)はWako Pure Chemical Industries(Osaka, Japan)より購入した。PGE<sub>2</sub>レセプター(EP1, EP2, EP3, EP4)のアゴニスト(EP1アゴニスト(ONO-DI-004), EP2アゴニスト(ONO-AE1-259-01), EP3アゴニスト(ONO-AE-248), EP4アゴニスト(ONO-AE1-329))were Ono Pharmaceutical Co. Ltd.(Osaka, Japan)より供与された。Dibutyryl-cAMP(dbcAMP)はTocris(Ellisville, MO, USA)より購入した。

#### ●ELISA

96ウェルマルチプレート(Asahi Glass, Tokyo, Japan)にHPDLFsを1.5×10<sup>5</sup> cells ml<sup>-1</sup>の濃度にて播種し、10% FBS含有α-MEM(Sigma, St Louis, MO, USA)で24時間培養した。その後その培地は1% FBS含有α-MEMに交換した。その24時間後、細胞に様々な刺激を加えた。培養上清中のSDF-1αの濃度はELISA kit(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)にて測定した。細胞内のphosphorylated AKT 1/2/3(Ser473)はAKT Pathway Activation Profile InstantOne™ ELISA Kit(Thermo Fisher, Pittsburgh, PA, USA)にて測定した。

#### ●RNA isolation and RT-PCR

細胞中のTotal RNAはTRIzol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)にて抽出し、ReverTra Ace® kit(Toyobo, Osaka, Japan)にてcDNAを合成した。使用したプライマーは以下の通りである。  
SDF-1α : sense primer, 5'-ctagtcaagtgcgtccacga-3', antisense primer, 5'-acacacagccagtcacag-3'; GAPDH : sense primer, 5'-gagtcaacggatttgctgt-3', antisense primer, 5'-gacaagcttcccgttctcag-3'。

#### ●Transient Transfection and Reporter Gene Assays

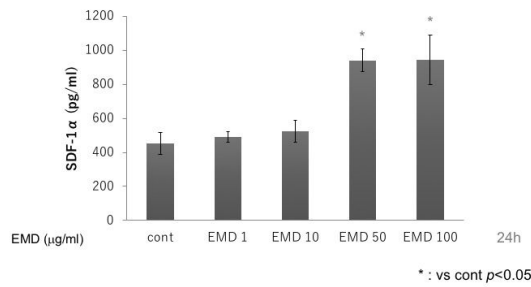
使用したプラスミドは以下の通りである。

・mammalian HIF1 luciferase reporter vector (pHIF1-luc; Panomics, Santa Clara, CA, USA)

・ pSV-β-galactosidase control vector (pSV-βgal; Promega, Madison, WI, USA).  
 12-well プレート中でコンフルエントに近い HPDLFs に Neon™ Transfection System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を使用して上記プラスミドを導入した。導入 72 時間後 HPDLFs を 4 時間 EMD と PGE<sub>2</sub> で刺激した。ルシフェラーゼ活性は β-galactosidase にて標準化した。

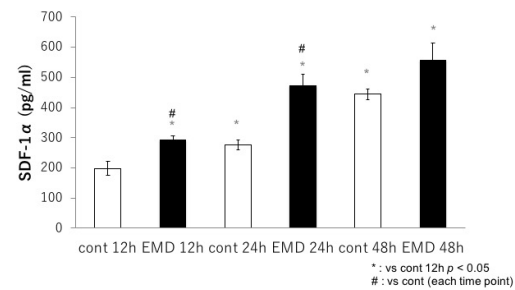
#### 4. 研究成果

HPDLFs において EMD は SDF-1α の産生を亢進する



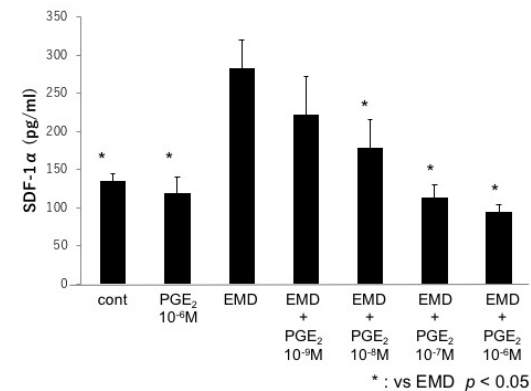
HPDLFs に EMD を 0 ~ 100 μg/ml 加えたときの SDF-1α 産生量をみたもので、50、100 μg/ml で有意な産生亢進を認めた。以後の EMD は 50 μg/ml で行った。

HPDLFs は時間依存的に SDF-1α 産生を亢進する



時間を追って SDF-1α の産生をみたもので、時間依存的に SDF-1α の産生は亢進している。多群間比較で各時間の cont と EMD を比較すると 12h と 24h で EMD は cont に対して有意な産生亢進を認めた。以後の刺激時間は 24h

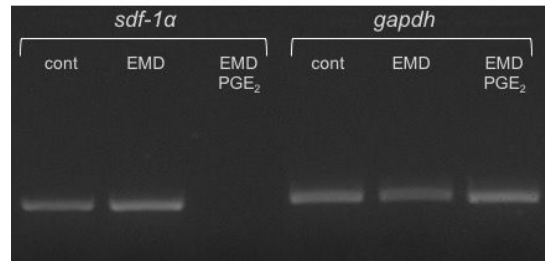
HPDLF において PGE<sub>2</sub> は EMD による SDF-1α 産生を抑制する



EMD 刺激に PGE<sub>2</sub> を添加したもので、EMD 刺激により SDF-1α の産生が亢進し、そこに

PGE<sub>2</sub> が加わることで濃度依存的に SDF-1α の産生が抑制された。以後の PGE<sub>2</sub> の濃度は 10<sup>-6</sup>M で行った。

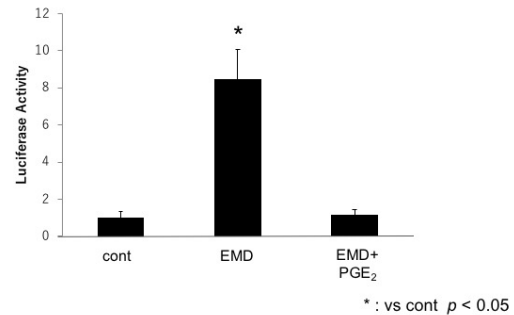
HPDLFs において PGE<sub>2</sub> は EMD による SDF-1α 遺伝子発現を抑制する



SDF-1α の遺伝子発現を RT-PCR 法でみたもので、EMD 刺激により SDF-1α の発現が亢進し、そこに PGE<sub>2</sub> が加わることでその発現が抑制された。

次に SDF-1α の転写因子である HIF-1 の転写活性をレポーターアッセイにて測定した。

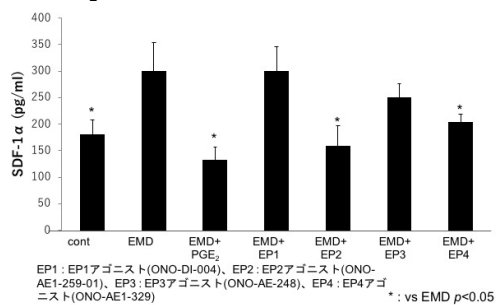
#### HIF-1 レポーターアッセイ



EMD により HIF-1 の転写活性が亢進し、EMD に PGE<sub>2</sub> が加わると HIF-1 の転写活性は抑制された。

次に PGE<sub>2</sub> のレセプターには EP1, EP2, EP3, EP4 があるが、そのいずれが関与しているかを調べるために PGE<sub>2</sub> レセプターアゴニストを用いた。

#### PGE<sub>2</sub> レセプターアゴニストの影響

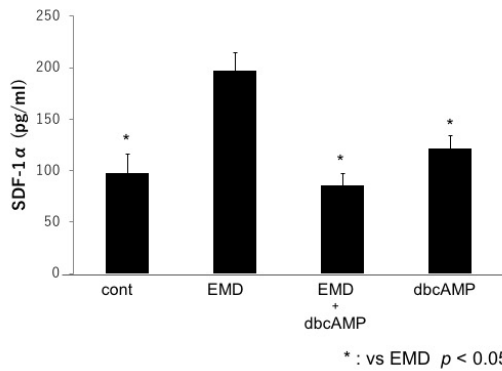


PGE<sub>2</sub> によって SDF-1α の産生抑制が見られるが、EP2 と EP4 のアゴニストも PGE<sub>2</sub> と同様に EMD による SDF-1α 産生亢進を抑制している。

次に、PGE<sub>2</sub> によって細胞内の cAMP 合成が促進されることが知られているため cAMP の関与を調べた。

EMD による SDF-1α 産生に対する cAMP

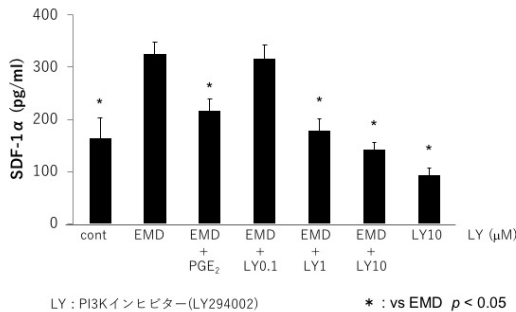
## アナログの影響



ジブチルcAMP (db-cAMP)はcAMPの塩基部分と糖部分に脂溶性のブチリル基を導入した化合物で、細胞膜の透過性が高いため細胞外から投与してもcAMP合成が促進されたのと同じ効果をもたせることができる。dbcAMPの添加によってSDF1 $\alpha$ の産生が抑制された。

次に、HIF1はPI3K/AKTシグナル経路を介して活性化することが知られているため、EMDからのPI3K/AKTシグナル経路について調べた。

## EMDによるSDF-1 $\alpha$ 産生へのPI3Kシグナルの関与

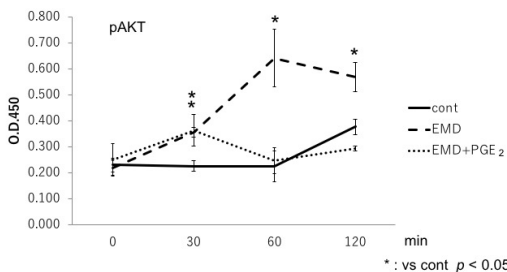


PI3Kインヒビターである、LY294002を添加することでPGE<sub>2</sub>と同様にSDF-1 $\alpha$ の産生が抑制された。

PI3Kの下流にあるPIP3はPTENというタンパクによって抑制されることが知られており、PTENはPGE<sub>2</sub>からのシグナルによって活性化するという報告があるため、SDF1産生抑制にPTENの関与を調べてみたが、PTENは関与していなかった。

そこで、PIP3の下流にあるAKTの活性化について調べてみた。

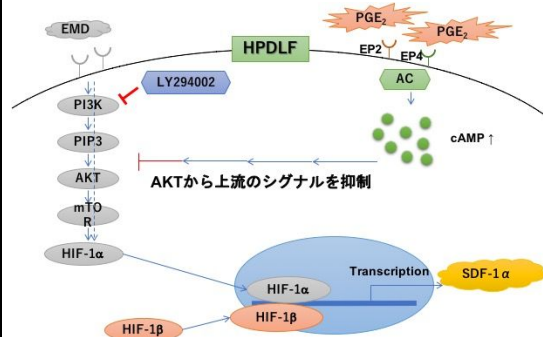
## PI3KシグナルにおけるAKTのリン酸化



PI3K/AKTシグナル経路におけるAKTの

リン酸化を見たもので、contと比較したときに30分ではEMDとEMD+PGE<sub>2</sub>群でAKTのリン酸化が確認できたが、60分を過ぎるとEMDではAKTのリン酸化が亢進し、EMD+PGE<sub>2</sub>群ではAKTのリン酸化が抑制された。

## 結果のまとめ



- EMDによってSDF-1 $\alpha$ の産生が亢進した。
  - 転写因子HIF-1の関与
  - PI3K/AKT経路の関与
- EMDによるSDF-1 $\alpha$ 産生はPGE<sub>2</sub>によって抑制された。
  - PGE<sub>2</sub>レセプターEP2とEP4、そしてcAMPの関与
  - PI3K/AKT経路のAKTから上流を抑制
  - 詳細なメカニズムについては今後さらなる研究が必要

## 結論

EMDはHPDLFsにおいてSDF-1 $\alpha$ 産生を促進し、その一部にPI3K/AKTシグナル経路が関与していることが示された。また、PGE<sub>2</sub>はPI3K/AKTシグナル経路を阻害することで、EMDによるSDF-1 $\alpha$ 産生を抑制することが示された。

## 最後に

本研究成果は、当初の計画通りとはいかなかった。しかしながら、セメント質形成に関与しているCEMP-1の転写因子でもあるHIF-1の機能の一部を解明することができた。また、SDF-1 $\alpha$ は間葉系幹細胞の誘導に非常に重要な役割を担っており、HIF-1、SDF-1 $\alpha$ に関する更なる研究は、「新規歯周組織再生療法の開発」や「歯周組織再生型インプラント開発」の基礎研究としては非常に意義のあることではないかと考えられる。

## 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)

〔雑誌論文〕(計 0件)

投稿準備中

〔学会発表〕(計 1件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

6. 研究組織

(1)研究代表者

迫田賢二（SAKODA Kenji）  
鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教  
研究者番号：70419654

(2)研究分担者

白方良典（SHIRAKATA Yoshinori）  
鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授  
研究者番号：60359982

研究分担者

瀬名浩太郎（SENA Kotaro）  
鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教  
研究者番号：60701117

(3)連携研究者

なし  
研究者番号：

(4)研究協力者

なし