

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20593

研究課題名(和文)ペプチド創薬とPRPを併用した歯周組織代謝活性の解明と歯根吸収予防治療への応用

研究課題名(英文) Application to root resorption prevention and elucidation of periodontal tissue metabolic activity mechanism by drug discovery using amelogenin peptide and Platelet Rich Plasma

研究代表者

吉見 友希 (Yoshimi, Yuki)

広島大学・病院(歯)・病院助教

研究者番号：50707081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アメロゲニンの特異的活性を有する機能性アメロゲニンペプチドと創傷治癒に効果的とされるPRPにおける歯周組織の代謝調節機構に及ぼす影響を解明し、これらを利用した歯根吸収予防法を確立することを究極の目標として研究を行なった。機能性アメロゲニンペプチドとPRPを併用することにより、セメント芽細胞の細胞活性に有効であることが示唆された。歯根吸収は過度なセメント質の吸収により引き起こされる病態であり、セメント芽細胞の細胞活性を向上させる機能性アメロゲニンペプチドを用いた新規の歯根吸収予防法の開発の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on functional amelogenin peptides and PRP which is considered effective for wound healing. We clarified the influence of these on the metabolic regulation mechanism of periodontal tissues and studied as the ultimate goal of establishing the root absorption prevention method using these. It was suggested that the combination of functional amelogenin peptide and PRP is effective for cell activity of cementoblasts. Root absorption is a condition caused by excessive absorption of cementum. This study suggested the possibility of developing a novel root absorption prevention method using functional amelogenin peptide which improves the cell activity of cementoblasts.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：アメロゲニン 歯根吸収

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療は、歯周組織の骨リモデリングを利用して歯を移動させる治療であるが、これに伴う副作用の一つに歯根吸収が挙げられる。歯根吸収は通常臨床症状を伴うことなく進行し、時に治療の中断を余儀なくされる。また、歯根吸収した歯は矯正歯科治療後の安定性に大きな影響を及ぼす。歯根吸収の発症因子として、過度な矯正力や治療の長期化に加えて、不正咬合の状態、歯根の形態、年齢および骨代謝疾患などの全身的要因が関連している。しかしながら、吸収した歯根を修復・再生させる治療法はこれまでのところ確立されていない。もし、矯正歯科治療中に歯根吸収の予防処置を行うことができれば、より安全で安定した矯正歯科治療を行うことが可能となる。

アメロゲニン[®]は、歯の発生過程においてエナメル芽細胞より分泌される細胞外基質の約90%を占める蛋白質である。また、硬組織を無細胞性に誘導する働きを有しており、エナメル質やセメント質形成に参与している。近年、ブタの幼若エナメル蛋白抽出物であるエムドゲイン[®]が製品化され、組織再生療法の一つとして臨床的に有用であることが示唆されている。しかしながら、エムドゲイン[®]は多類のエナメル蛋白を含み、どの構成成分が組織再生効果に参与しているのかは明確にされていない。また、動物由来タンパクを用いていることから抗原性や品質の安定性は定かではない。申請者はこれまでに、エナメル蛋白の主成分であるアメロゲニンの効果に着目し、ヒトリコンビナント完全長アメロゲニンを精製するとともに、歯周組織構成細胞に対する影響の検討を重ね、アメロゲニンがヒトセメント芽細胞における細胞増殖能および基質産生能を亢進させることを明らかにした。一方で、アメロゲニンは破歯細胞活性化因子 RANKL の発現を抑制し、破歯細胞数を減少させることも報告されている。しかしながら、アメロゲニンは、生体内では酵素により様々な断片に分解される。また、完全長アメロゲニンは、C末端側に親水性領域、N末端側に疎水性領域を持つため強い極性を帯びており、生理的条件下では凝集し、生理活性の低下を引き起こす。そのため、安定した効果を得ることが難しかった。そこで申請者は、アメロゲニンの安定した効果を引き出すために、その活性部位を探索してきた。これまでの検討により、アメロゲニンの親水性領域である C 末端側に活性部位が存在することを明らかにした。そして、アメロゲニンの活性部位を含む機能性アメロゲニンペプチドの作用により、細胞の増殖および分化の亢進が認められた。特定されたアメロゲニンの活性部位は歯胚のエナメル基質中に検出される機能性ペプチド断片であった。以上の結果を元に、ヒトアメロゲニンペプチドとして特許を出願した。しかしながら、機能性アメロゲニンペプチドの詳細な

作用機序は未だ解明できていない。

一方、血小板は創傷の治癒に係る細胞で、その顆粒中には創傷治癒や組織再生に効果的な成長因子が多く含まれていることが知られており、これを濃縮した PRP を再生療法に応用する試みが近年盛んに行われている。また、PRP は自己血由来であるため、副作用も少なく安全に使用することができ、さらに、アルギン酸ゲルとカルシウムを混合しゲル化させることで様々な部位に徐放性に応用可能である。近年矯正歯科治療において、歯肉へ直接 PRP を注入することにより、歯周組織の代謝が活性化され、歯牙の移動期間が短縮されることが報告された。PRP には Transforming growth factor (TGF) などの成長因子が含まれており、これらの作用により代謝が亢進されることが推察されているが、その効果や詳細なメカニズムは未だ解明されていない。

以上の背景より、アメロゲニンの活性部位を有する機能性アメロゲニンペプチドを矯正歯科治療へ適用させることによりセメント質の誘導が期待される。また、PRP には歯周組織の代謝活性亢進作用を有している可能性が予想されることから、機能性アメロゲニンペプチドと PRP を用いた歯根吸収を予防する新たな治療法の確立を目指す本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果を進展させ、アメロゲニンの特異的活性を有する機能性アメロゲニンペプチドと創傷治癒に効果的とされる PRP における歯周組織の代謝調節機構に及ぼす影響を解明し、これらを利用した歯根吸収予防法を確立することを究極の目標とする。

3. 研究の方法

本研究では、歯周組織に対する機能性アメロゲニンペプチドおよび PRP の影響を解明し、歯根吸収を積極的に予防する治療法を確立することを目的とした計画を立案し、研究を行った。

(1) 機能性アメロゲニンペプチドおよび PRP の歯根吸収抑制効果の解明 (*in vitro*)

機能性アメロゲニンペプチドおよび PRP を歯周組織構成細胞に添加し、細胞増殖能の変化を解析した。また、セメント芽細胞および破歯細胞の基質産生能に対して、石灰化関連マーカーおよび骨吸収マーカーの遺伝子および蛋白発現レベルについて解析を行った。

(2) 機能性アメロゲニンペプチドおよび PRP のシグナル伝達経路の解明 (*in vitro*)

歯周組織構成細胞における機能性アメロ

ゲニンペプチドおよび PRP のシグナル伝達経路について検討を行った。また、歯根吸収抑制のメカニズムを探索した。

(3) 動物実験による検討

申請者らが開発したラット歯根吸収モデルを使用した。12 週齢 Wister 系雄性ラットの上顎前部に矯正用アンカースクリューを植立し、これを固定源として、第一大臼歯をコイルスプリングで前方へ牽引する。過度な矯正力を負荷することで、牽引開始より数日後に上顎臼歯遠心根近心側に歯根吸収窩が形成される。矯正力を負荷したラット臼歯の歯根膜内に、機能性アメロゲニンペプチドおよび PRP を投与し、歯根周囲への浸透性についての評価を行うとともに、歯根吸収の予防効果について組織学的な検討を行った。

4. 研究成果

(1) 機能性アメロゲニンペプチドの作用により、セメント芽細胞の増殖能および基質産生能の亢進が認められた。その結果は誌上に掲載された。また、PRP の作用により、歯周組織構成細胞の代謝調節に影響を及ぼすことが示唆された。

(2) 機能性アメロゲニンペプチドは MAPK-ERK 経路を介して、セメント芽細胞の増殖能を亢進させることが明らかとなった。その結果は誌上に掲載された。PRP の作用経路および歯根吸収のメカニズムについては、現在、論文投稿を検討中であるため、データを割愛する。

(3) ラット歯根吸収モデルに機能性アメロゲニンペプチドおよび PRP の局所投与を行い、歯根吸収抑制効果についての検討を行ったところ、機能性アメロゲニンペプチドおよび PRP 単独投与では有意差が認められなかった。しかしながら、両者を併用することにより、有意差は認められないものの、歯根吸収が抑制される傾向が認められた。今後投与濃度等の検討を行い、検証を続けていく必要があると考えられる。

以上の結果より、機能性アメロゲニンペプチドと PRP を併用することにより、セメント芽細胞の細胞活性に有効であることが示唆された。歯根吸収は過度なセメント質の吸収により引き起こされる病態であり、セメント芽細胞の細胞活性を向上させる機能性アメロゲニンペプチドを用いた新規の歯根吸収予防法の開発の可能性が示唆された。

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 3 件)

1. Ryo Kunimatsu, Yuki Yoshimi, Naoto Hirose, Tetsuya Awada, Mutsumi Miyauchi, Takashi Takata, Wu Li, Li Zhu, PK Denbesten, Kotaro Tanimoto, The C-terminus of amelogenin enhances osteogenic differentiation of human cementoblast lineage cells. J Periodontol Res.52(2):218-224:2017,doi:10.1111/jre.12384. 査読有

2. Tetsuya Awada, Ryo Kunimatsu, Yuki Yoshimi, Naoto Hirose, Tomomi Mitsuyoshi, Keisuke Sumi, Kotaro Tanimoto, Effects of C-terminal amelogenin peptides on the metabolism of osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun.482(4):1154-1159:2017, doi:10.1016/j.bbrc.2016.12.003. 査読有

3. Yuki Yoshimi, Ryo Kunimatsu, Naoto Hirose, Tetsuya Awada, Mutsumi Miyauchi, Takashi Takata, Wu Li, Li Zhu, PK Denbesten, Kazuo Tanne, Kotaro Tanimoto. Effects of C-terminal amelogenin peptide on proliferation of human cementoblast lineage cells. J Periodontol. 87(7):820-7:2016,doi:10.1902/jop.2016.150507. 査読有

[学会発表](計 6 件)

1. 木村 綾、國松 亮、吉見 友希、柄 優至、粟田 哲也、郡司 秀美、中島 健吾、宮内 睦美、高田 隆、谷本 幸太郎。ヒト培養セメント芽細胞の代謝に対するフラボノイド類化合物バイカリンの影響、第 75 回日本矯正歯科学会大会,2016.11.7-9,アスティとくしま・むらさきホール(徳島県徳島市)

2. 安藤 和代、鷺見 圭輔、國松 亮、吉見 友希、粟田 哲也、中島 健吾、阿部 崇晴、谷本 幸太郎。アメロゲニンペプチドが由来の異なる間葉系幹細胞に及ぼす影響について、第 75 回日本矯正歯科学会大会,2016.11.7-9,アスティとくしま・むらさきホール(徳島県徳島市)

3. Yuki Yoshimi, Ryo Kunimatsu, Tetsuya Awada, Naoto Hirose, Tomomi Mitsuyoshi, Keisuke Sumi, Hidemi Gunji, Kengo Nakajima, Aya Kimura, Mutsumi Miyauchi, Takashi Takata, Kotaro Tanimoto, Amelogenin variants increased the proliferation of HCEM through the MAPK-ERK signaling pathway, 第 74 回日本矯正歯科学会大会,2015.11.18-20,福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

4. Ryo Kunimatsu, Yuki Yoshimi, Tetsuya Awada, Yuki Asakawa-Tanne, Naoto Hirose, Tomomi Mitsuyoshi, Keisuke Sumi, Hidemi Gunji, Yuji Tsuka, Kazuo Tanne, Kotaro Tanimoto, Effects of human full length amelogenin on the proliferation of human osteoblasts, 第 74 回日本矯正歯科学会大会,2015.11.18-20,福岡国際会

議場・マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

5. 栗田 哲也、國松 亮、吉見 友希、廣瀬 尚人、平田 伊佐雄、加藤 功一、谷本 幸太郎、アメロゲニン由来新規ペプチドを用いた骨再生療法への応用, 第 74 回日本矯正歯科学会大会, 2015.11.18-20, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

6. Yuki Yoshimi, Ryo Kunimatsu, Naoto Hirose, Tetsuya Awada, Tomomi Mitsuyoshi, Hidemi Gunji, Takashi Takata, Kotaro Tanimoto, Amelogenin isoforms effect the proliferation in human periodontal cells, 8th International Orthodontic Congress 2015, 2015.9.27-30, London(UK)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

吉見 友希 (YOSHIMI YUKI)

広島大学・病院 (歯)・病院助教

研究者番号 : 50707081