

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32650

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07217

研究課題名(和文) 新たな自己組織化ペプチドハイドロゲルを用いた新規歯周組織再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of new periodontal tissue regeneration therapy by using of self assembling peptide

研究代表者

武内 崇博 (Takeuchi, Takeuchi)

東京歯科大学・歯学部・レジデント

研究者番号：10778484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は機能性モチーフ(PRG, PDS)を付与した自己組織化ペプチドハイドロゲルおよび中性自己組織化ペプチドハイドロゲル(SPG-178)の歯周組織への影響を検討することである。

ラット歯周組織欠損へ各ゲル応用後、2・4週にて評価した。Unfilled群と比較して欠損底部歯根側寄りに多くの新生骨を認め、骨梁構造解析においても有意に高い値を示した。免疫組織学的観察においてはSPG-178群の欠損底部周囲にPCNA陽性細胞を認めた。以上のことから機能性モチーフ付与および中性自己組織化ペプチドハイドロゲルは、歯周組織欠損の治癒を促進し、新規歯周組織剤として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to evaluate the effect of designer self-assembling peptide hydrogel (PRG, PDS) and neutral self-assembling peptide hydrogel (SPG-178) on periodontal tissue regeneration.

In vivo, rats were sacrificed and evaluated at 2 and 4 weeks after application of PRG, PDS, SPG-178 to surgically prepared rat periodontal defects. Compared with the Unfilled group, amount of new bone was found near the root of the defect and at the bottom of the defect. It was also significantly higher in trabecular structure analysis by using TRI-3D / BON. In immunohistological observation, PCNA positive cells were found around the defect bottom. This is thought to be osteoblasts, fibroblasts. From the above, it was suggested that the designer self-assembling hydrogel and the neutral self-assembling peptide hydrogel may promote healing of periodontal tissue defect and may be useful as a novel periodontal tissue preparation.

研究分野：歯周組織再生療法

キーワード：歯周組織再生療法 自己組織化ペプチドハイドロゲル 機能性モチーフ

1. 研究開始当初の背景

良好な歯周組織の再生を導くには細胞、シグナル、足場の3つの要素が必要不可欠である (Rios H F, J Periodontol 2011)。足場は組織再生を支持、促進させる骨組み構造を提供する。臨床の現場において他種骨、他家骨などの生体由来の足場材料が多く用いられているが、物性のばらつき、未知の感染リスクなどの点より生体由来材料から合成材料への転換が望まれている (Kao B et al., Tissue Eng Part A 2009)。

自己組織化ペプチドハイドロゲルは必須アミノ酸由来で、その構造は生体の細胞外マトリックスに類似しており、ナノ構造を有する優れた三次元的足場材料として注目されている (Zhang S et al., Biomaterials 1995)。なかでも RADA16 は宿主細胞の分化、遊走を促進する良好な微小環境を提供するという報告 (Bradshaw M et al., Sci Rep 2014) や、頭蓋骨などの生体組織修復に効果的であるとする報告がなされてきた (Misawa H et al., Cell Transplant 2006)。

これまでの研究で申請者らは、RADA16 が細胞増殖に有利な場を形成することで歯周組織治癒を促進することを初めて見出した (Takeuchi T et al., J Clin Periodontol 2016)。

前述のように RADA16 単独応用でも歯周組織欠損の治癒に効果を示したが、課題もある。ペプチド側鎖に細胞との相互作用をより良好にする機能性モチーフを修飾することが可能であり (Yang Y et al., Nanotoday 2009, Maude S et al., Nanomedicine 2013)、Horii ら (PLoS One 2007) は ALK や DRG、PRG を修飾させた RADA16 はマウス前芽細胞の分化・増殖を促進し骨組織の再生の可能性があることを、Kumada ら (PLoS One 2010) は RGD や PRG モチーフを付与することで創傷治癒、特に歯根膜組織の再生に有効な可能性があることを報告した。これらは in vitro による報告であり、生体に応用した際の効果については明らかになっていない。また RADA16 は pH3 と強酸性の性質を持つ。In vitro で細胞と用いる際には事前の緩衝の工程が必要になり、生体に応用した際は即座に緩衝され為害性はないとされているが、より安全な使用の為に中性であることが理想的であると考える。近年、我が国で新たに中性の自己組織化ペプチドハイドロゲルが開発され、三次元培養や安全な止血剤としての研究が報告されている (Nagai Y et al., Biomaterials 2012, Komatsu S et al., PLoS One 2014) ので、その応用も検討する必要がある。

以上のことより、これまで以上に安全かつ効率的な歯周組織再生を目指すうえでの足場材料を開発するために、機能性モチーフを修飾した RADA16 や中性自己組織化ペプチドハイドロゲルを生体に応用し、その影響を検討する発想に至った。

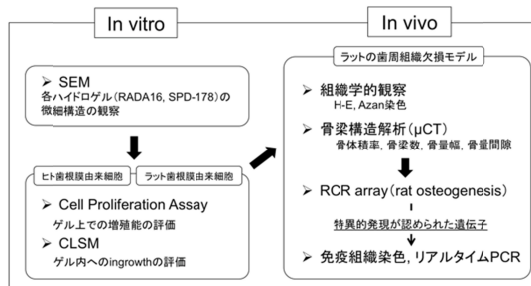
2. 研究の目的

本研究は宿主細胞に親和性が高く、歯周組織の再生を効率よく促進する材料の開発を目指し、次の具体的目標を定めて実施する。
(1)機能性モチーフを付与した自己組織化ペプチドハイドロゲルの歯周組織再生への効果の評価

(2)新たに開発された中性の自己組織化ペプチドハイドロゲルの有用性の検討

3. 研究の方法

In vitro では各ハイドロゲルの微細構造を SEM にて観察する。ヒト・ラット歯根膜由来細胞を用い Cell Proliferation assay、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による三次元的遊走についての解析を行う。In vivo 実験ではラットを使用する。両側上顎第一臼歯近心に外科的に歯周組織欠損を作成 (Bizenjima et al, J Clin Periodontol 2015) し、実験側には機能性モチーフを修飾した自己組織化ペプチド (PRG、PDS)、中性の新規ゲル (SPG-178) を応用する。対照側は RADA16 のみを応用し、術後 2、4、8 週で μ CT 撮影後、検体を採取し、通法に従い切片を作成し観察する。 μ CT による組織形態計測では骨梁構造解析ソフトを用いて 3 次的に解析する。欠損部から組織サンプルを採取し、骨形成関連の遺伝子発現プロファイルを PCR アレイにて解析する。その後特異的上昇が見られた遺伝子に関して免疫組織染色、リアルタイム PCR にて検証する。



4. 研究成果

(1)各ゲルの微細構造

各ゲルとも細胞外マトリックスに類似した微細な網目状構造を認めた。SPG-178 は他に比較してマクロな構造であった。

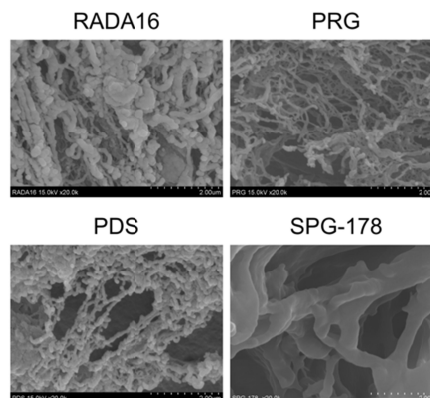


図1 SEMによる強拡大像(×20000)

(2)マイクロCT解析

Unfilled群と比較して、特にPRG、PDS応用群にて欠損周囲に幼弱な新生骨様構造物を認めた(図2)。

TRI/3D-BONを用いた骨梁構造解析においては各群とも週齢を重ねるごとに高い値を示し、CT画像同様にPRG、PDS群にて高い値を示す傾向にあった(図3)。

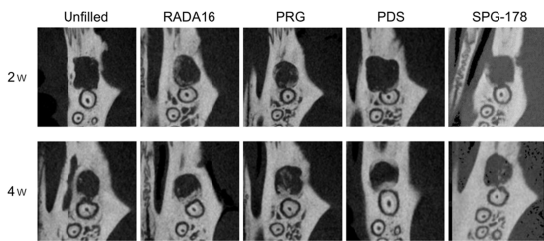


図2 術後2・4週におけるマイクロCT画像(水平断)

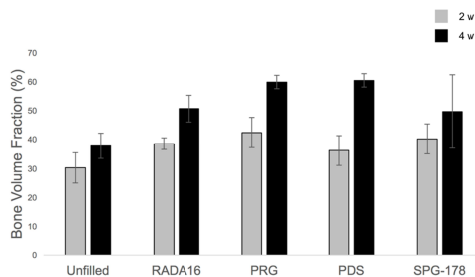


図3 TRI/3D-BONによる骨梁構造解析(骨体積率 n=6)

(3)組織学的観察

術後2週においてUnfilled群以外で欠損底部根尖部付近に新生骨様構造物を認めた。

術後4週は切片を作製中である。切片が揃い次第、画像解析ソフトにより上皮の深行増殖なども計測していく。

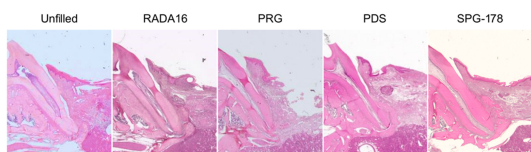


図4 術後2週におけるH-E染色(×12.5)(矢状断)

(4)免疫組織学的観察

測定部位は図5右上にあるよう欠損の境界部に沿って3部位を規定した。2、4週ともにSPG178応用群ではUnfilled群と比較して新生骨上部および結合組織内にPCNA陽性細胞を多く認めた。

PRG、PDS群については切片を増やし他のマーカーを含めた染色を行う予定である。さらに陽性細胞率を算出し、統計学的に分析する。

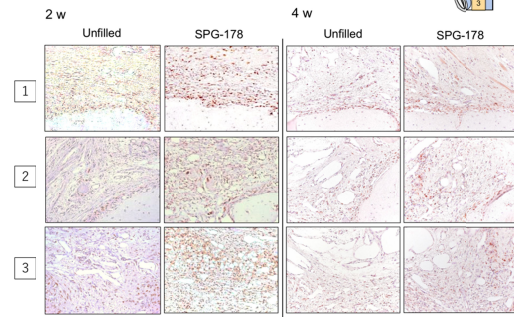
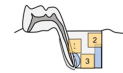


図5 術後2・4週における免疫組織染色(×200)(PCNA)

(5)達成できなかった項目

主にin vitroでの研究が滞っているが、ラット歯根膜由来細胞の単離・培養や、PCRのための組織サンプル採取などの予備実験は行っている。In vivoにおいては切片ができ次第、染色後分析を行っていく。

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 3 件)

(1) 武内崇博, 松上大亮, 吉田 航, 備前島 崇浩, 難波 崇, 齋藤 淳
自己組織化ペプチドハイドロゲル応用における歯周組織治癒メカニズムの解明
日本歯周病学会 60 周年記念京都大会, 平成 29 年 12 月 16 日, 京都市
日本歯周病学会会誌 59(秋季特別号); 201, 2017.

(2) Takeuchi T, Yoshida W, Suzuki E, Bizenjima, T, Seshima F, Kinumatsu T, Saito A.
Investigating the healing mechanism of surgical periodontal defect following application of a self-assembling peptide nanofiber hydrogel
American Academy of Periodontology 103rd Annual Meeting, September 9-12th, 2017, Boston, USA
AAP 103rd Annual Meeting On-Site Program, p55

(3) Takeuchi T, Yoshida W, Suzuki E, Bizenjima T, Seshima F, Kinumatsu T, Saito A.
Elucidation of periodontal healing mechanism following application of a self-assembling peptide nanofiber hydrogel
National Symposium Osteology Japan 2017, June 4th, 2017, Tokyo
Program & Abstracts p.19.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

武内 崇博 (TAKEUCHI TAKAHIRO)

東京歯科大学・歯学部・レジデント

研究者番号：10778484

(2)研究協力者

吉田 航 (YOSHIDA WATARU)

松上 大亮 (MATSUGAMI DAISUKE)