

令和元年5月30日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11847

研究課題名(和文) ヒト由来アメロゲニンペプチドに対する歯根膜幹細胞の遺伝子発現

研究課題名(英文) Gene expression of periodontal ligament stem cells to human-derived amelogenin peptide

研究代表者

田中 昭男 (TANAKA, Akio)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10121823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エナメルマトリックスデリバティブに由来するアミノ酸配列、WYQNMIRを見出した。これはブタのアメロゲニン・エクソン5に相当する。ヒトのそれはWYQSIRとなり、ブタの場合の7個のアミノ酸のうちN(アスパラギン)とM(メチオニン)がヒトではS(セリン)に代わり、1個のアミノ酸が少なく6個のアミノ酸で構成されている。ヒトのアミノ酸配列を基にペプチドを合成し、ヒト歯根膜幹細胞が骨芽細胞へ分化するかを検討した。その結果、至適濃度はブタの場合よりも10倍高い値であったが、ブタ由来のペプチドと同様にヒト由来のペプチドもヒト歯根膜幹細胞を骨芽細胞に分化させる機能を有することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周組織の再生をもたらす物質の一つに幼若ブタの歯胚から抽出されたエナメルマトリックスデリバティブ(EMD)があり、それをラット背部に接種して組織反応物を得た。その解析によって、組織反応物がブタのアメロゲニン・エクソン5(WYQNMIR)に相当することが判明した。そのアミノ酸配列を基にペプチドを合成し、組織反応を検討した結果、EMDと同等の効果があることを明らかにした。ヒトにも存在するアメロゲニンのエクソン5に相当するアミノ酸配列はWYQSIRである。ヒトに関連するペプチドのほうが、よりヒトに対しては親和性が高いと考え、ヒトに関連する物質が活用できれば有益な物資を提供できる。

研究成果の概要(英文)：We found in our previous study an amino acid sequence, WYQNMIR, which corresponds to porcine amelogenin exon 5, whereas that of humans is WYQSIR. N (asparagine) and M (methionine) among 7 amino acids in pigs are replaced by S (serine) in humans, and human amelogenin exon 5 consists of 6 amino acids, one fewer than in the pig. The peptide corresponding to human amelogenin exon 5 was synthesized on the basis of the amino acid sequence, WYQSIR. We investigated the effect of human-derived peptide on the proliferation and osteoblastic differentiation of the human periodontal ligament stem cells in vitro. Although the optimal concentration of the peptide was ten times higher than that of the pig, it was suggested that the present peptide has potentiality to differentiate the human periodontal ligament stem cells into osteogenic cells in the same manner as the peptide in the pig.

研究分野：病理学・口腔病理学

キーワード：歯根膜幹細胞 歯周組織再生 新規合成ペプチド ヒトアメロゲニン アメロゲニンエクソン5

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯の周囲組織である歯周組織が壊されて歯の脱落をきたす疾患であり、中年以降多くの人が罹患している国民病である。失われた歯周組織を効率的に再生するには、再生を促進する物質が必要となる。その一つとして 1990 年代に市販されたエムドゲインがある。その物質はブタの歯胚から抽出された生物製剤であるので、種々雑多な物質が含まれている可能性があった。その組織反応性を調べる中で特徴的な反応産物があり、それをマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOF/MS) によって検討した結果、7つのアミノ酸シーケンスとして WYQNMIR (tryptophan, tyrosine, glutamine, asparagine, methionine, isoleucine, arginine) を見出すことができた (引用文献)。シーケンスに基づきペプチドを合成し、組織反応性を検討した結果、元の生物製剤と同等の効果が得られた。ブタ由来の生物製剤であるので、ヒトに親和性があるほうが良いと考え、ヒトのアメロゲニンのエクソン5について検索した結果、ブタのアメロゲニンとはアミノ酸配列が一部異なり、7つのアミノ酸シーケンスではなく、6個のアミノ酸シーケンスであり、N (asparagine) と M (methionine) が S (serine) に置き換わり、WYQSIR のシーケンスであることが認められた。この物質について反応性を検討した。

2. 研究の目的

ヒト由来のアメロゲニンのエクソン5に相当する WYQSIR がどのくらい組織再生に効果があるかを検討した。すなわち、WYQSIR のアミノ酸シーケンスに基づき、人工的にペプチドを合成し、このペプチドの特徴を明らかにするためにヒト歯根膜幹細胞の培養液中に添加して細胞の増殖能、アルカリフォスファターゼ (以下、ALP と略す。) 活性、カルシウム沈着量、オステオカルシン産生量、Runx2 mRNA の発現、オステオネクチン mRNA 発現について調べ、その有効性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯根膜幹細胞の分離培養および同定

ヒトの抜去第三大臼歯を PBS および D-MEM で洗浄し、外科用メスで歯根表面から歯根膜組織を剥離し、1立方ミリメートルの大きさに細切した。それにタイプ コラゲナーゼ 3 mg/mL とディスパーゼ 4 mg/mL を加え、37℃ で1時間酵素処理を行った。それに増殖培地 (10% FBS 含有の D-MEM) を加えて酵素反応を停止させ、十分にピペッティングして細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液を Cell Strainer (ポアサイズ 70 μm) で濾過し、Single cell にした。Single cell を 1,000 rpm、5分で遠心分離し、増殖培地を加えた 75 平方センチメートルフラスコに播種した。2日後に増殖し、壁着している細胞を残すために浮遊している細胞を増殖培地で洗浄して除去し、新たに増殖培地を加え、形成したコロニーを 75 平方センチメートルフラスコに移し、継代を行った。

継代した細胞の処理は次の通りである。増殖培地を加えた 8well チャンバースライドに 2×10^4 cells/mL になるように 2~3 継代細胞を播種した。3日後、細胞に 70%エタノールを加え、-20℃、10分間で固定した。固定した細胞に PBS (3%BSA 含有) を加え、室温、30分でブロッキングした。蛍光免疫染色にて歯根膜幹細胞を同定するために、一次抗体として抗 STRO-1 抗体および抗 SSEA-4 抗体を 4℃ で別々に一晚反応させ、二次抗体として FITC 標識抗体を室温で 60分反応させた。免疫染色した細胞を DAPI 入り封入剤にて封入し、共焦点レーザー走査顕微鏡で撮影した。

(2) 細胞増殖試験

ヒト歯根膜幹細胞を 96well マイクロプレートに 2×10^4 cells/mL で播種し、1、10、100、1,000、10,000 ng/mL のヒト由来アメロゲニンペプチド (以下、HAP と略す。) を含む増殖培地 (実験群) と HAP を含まない増殖培地 (対照群) にて培養した。培養開始後 1、3、5、7日にホルマザン検出キットにて生細胞数を測定した。測定およびデータの解析は Soft Max[®] Pro software にて行った。後述の通り至適濃度は 1,000 ng/mL であったので、この濃度を以後実験に使用した。

(3) 硬組織分化誘導実験

ALP 活性の測定

ヒト歯根膜幹細胞を骨芽細胞に分化させるため、DMEM (10%FBS 含有) に 50 μM L-アスコルビン酸、10 mM β-グリセロリン酸、10 nM デキサメタゾンを添加し、骨芽細胞分化誘導培地を作製した。

ヒト歯根膜幹細胞を 24well マイクロプレートに 4×10^4 cells/mL で播種し、増殖培地にて 1週間培養した後、1,000 ng/mL の HAP を含む骨芽細胞分化誘導培地 (実験群) と含まない骨芽細胞分化誘導培地 (対照群) に交換した。骨芽細胞分化誘導培地に交換後 7日および 14日において、細胞を PBS にて洗浄し、0.2% Triton X-100 にて細胞を溶解した。溶解後の細胞浮遊液に 1-Step PNPP substrate を添加し、ALP 活性を測定した。測定およびデータの解析は Soft Max[®] Pro software にて行った。

カルシウム析出量の測定

ヒト歯根膜幹細胞を 24well マイクロプレートに 4×10^4 cells/mL で播種し、増殖培地にて 1 週間培養した後、1,000 ng/mL の HAP を含む骨芽細胞分化誘導培地（実験群）と含まない骨芽細胞分化誘導培地（対照群）に交換した。骨芽細胞分化誘導培地に交換後 21 日において、10%ギ酸にて細胞外に析出したカルシウムを溶解した。溶解後の細胞浮遊液に Calcium E-test Kit を添加し、カルシウム析出量を測定した。測定およびデータの解析は Soft Max[®] Pro software にて行った。

アリザリンレッド染色

ヒト歯根膜幹細胞を 24well マイクロプレートに 4×10^4 cells/mL で播種し、増殖培地にて 1 週間培養した後、1,000 ng/mL の HAP を含む骨芽細胞分化誘導培地（実験群）と含まない骨芽細胞分化誘導培地（対照群）に交換した。骨芽細胞分化誘導培地に交換後 21 日において、細胞を PBS にて洗浄し、70%エタノールを -20°C で 10 分間添加することによって細胞を固定した。アリザリンレッドの 1%水溶液を室温で 3 分間添加し、蒸留水にて 3 回洗浄した。アリザリンレッドにより染色された石灰化物を顕鏡した。

オステオカルシン産生量の測定

ヒト歯根膜幹細胞を 24well マイクロプレートに 4×10^4 cells/mL で播種し、増殖培地にて 1 週間培養した後、1,000 ng/mL の HAP を含む骨芽細胞分化誘導培地（実験群）と含まない骨芽細胞分化誘導培地（対照群）に交換した。骨芽細胞分化誘導培地に交換後 21 日において、培養上清を回収し、オステオカルシン検出 Kit にて ELISA 法によるオステオカルシン タンパク発現量の測定を行った。測定およびデータの解析は Soft Max[®] Pro software にて行った。

PCR 法による遺伝子発現量の測定

ヒト歯根膜幹細胞を 24well マイクロプレートに 4×10^4 cells/mL で播種し、増殖培地にて 1 週間培養した後、1,000 ng/mL の HAP を含む骨芽細胞分化誘導培地（実験群）と含まない骨芽細胞分化誘導培地（対照群）に交換した。骨芽細胞分化誘導培地に交換後 24 時間において、RNeasy Mini Kit にて total RNA を抽出し、PrimeScript RT Reagent Kit にて RNA の逆転写を行い、cDNA を作製した。StepOnePlus Real-time PCR System にて、Runx2 およびオステオネクチンの遺伝子発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト歯根膜幹細胞の分離培養および同定
蛍光免疫染色において培養細胞は STRO-1 (図 1A) および SSEA-4 (図 1B) はともに陽性であり、ヒト抜去歯から分離培養した細胞が歯根膜幹細胞であることを同定した。

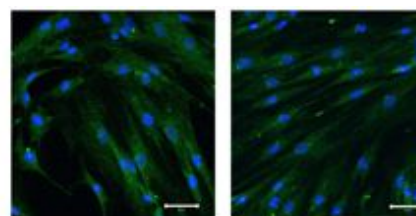


図 1 A : STRO-1 陽性
図 1 B : SSEA-4 陽性
スケールバー = 50 μm

(2) 細胞増殖試験

培養開始後 1、5、7 日において、1,000 ng/mL の HAP 添加群で生細胞数が有意に増加し、生細胞数の増加量が最大であったため (図 2)、1,000 ng/mL を HAP のヒト歯根膜幹細胞に対する至適濃度とした。

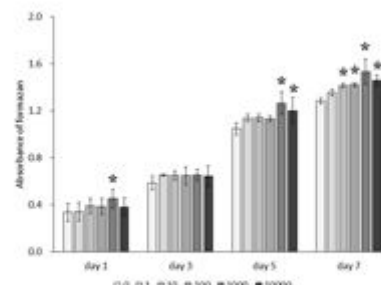


図 2 : 細胞増殖に対する HAP の効果

(3) 硬組織分化誘導実験

1,000 ng/mL の HAP 添加群において、骨芽細胞分化誘導培地に交換後 7 日および 14 日で ALP 活性が有意に増加した (図 3A、図 3B)。

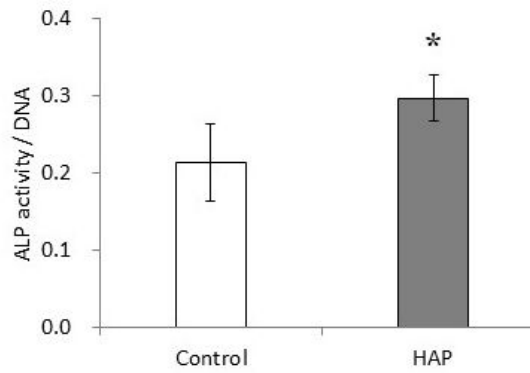


図 3 A : 培養 7 日後の ALP 活性

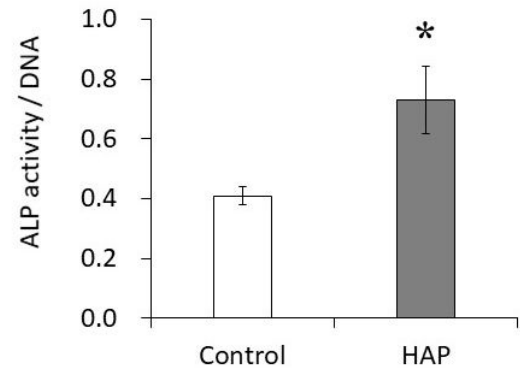


図 3 B : 培養 14 日後の ALP 活性

骨芽細胞分化誘導培地に交換後 21 日でカルシウム析出量が有意に増加し (図 4 A)、石灰化物の形成量は対照群 (図 4 B) に比較して実験群 (HAP 群) では増加した (図 4 C)。

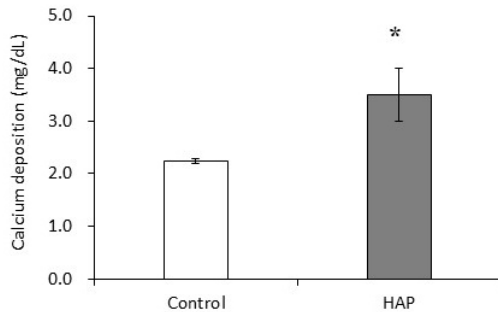


図 4 A : 培養 21 日後のカルシウム析出量

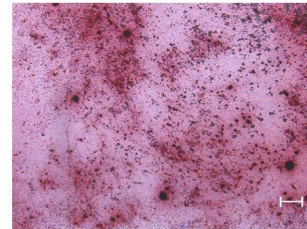


図 4 B :
対照群のカルシウム析出
スケールバー = 100 μm

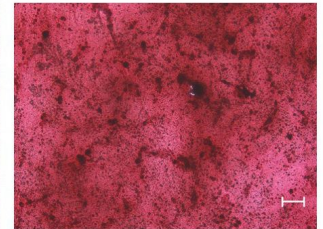


図 4 C :
HAP 群のカルシウム析出

オステオカルシン産生量が有意に増加した (図 5)。

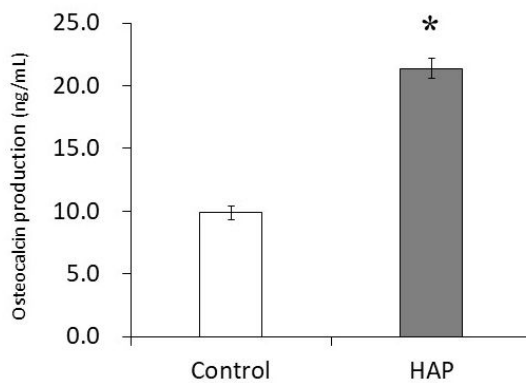


図 5 : オステオカルシン産生量

1,000 ng/mL の HAP 添加群において、骨芽細胞分化誘導培地に交換後 24 時間で Runx2 mRNA 発現量は有意に増加したが (図 6 A)、オステオネクチン mRNA 発現量は逆に有意に減少した (図 6 B)。

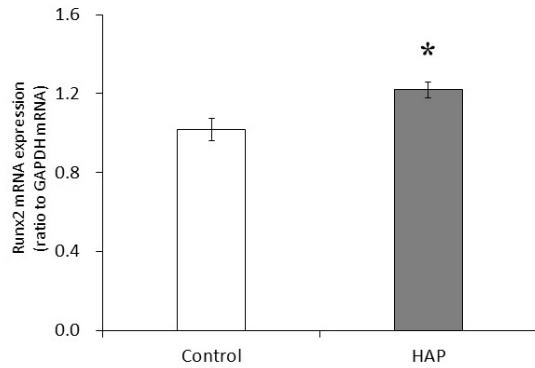


図 6A : Runx2 mRNA 発現量

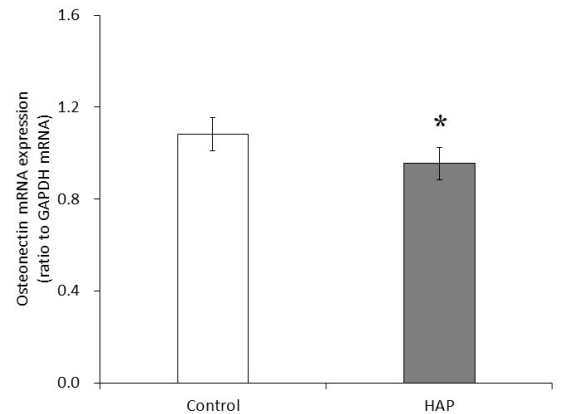


図 6B : オステオネクチン mRNA 発現量

以上のように細胞の増殖や骨芽細胞分化を示すが、文献的にヒトの全長アメロゲニンは骨髄の間葉系幹細胞の細胞増殖および骨芽細胞分化を促進する（引用文献 ）が、歯根膜細胞には効果がない（引用文献 ）という報告がある。しかし、今回の結果からヒトアメロゲニンの部分配列であるエクソン 5 の作用は過去の報告と異なっているため、部分配列と全長アメロゲニンとは作用経路が異なるかもしれない。また、EMD はオステオネクチン mRNA の発現が促進しているのに対して、ヒトのアメロゲニンエクソン 5 では低下していた。したがって、ブタ由来のアメロゲニンエクソン 5 と HAP では作用経路が異なるかもしれない。

以上のことより、HAP はヒト歯根膜幹細胞の細胞増殖と硬組織分化を促進し、歯周組織再生において有効な生体材料である可能性が示唆された。

< 引用文献 >

Kim N, et al. Analysis of eosinophilic round bodies formed after injection of enamel matrix derivative into the backs of rats. *J Periodontol* 2005; 76: 1934-1941.

Tanimoto K, et al. Amelogenin enhances the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Cell Tissue Organ* 2012; 196: 411-419.

Huang YC, et al. Effects of human full-length amelogenin on the proliferation of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Cell Tissue Res* 2010; 342:205-212.

Tanimoto K, et al. Differential effects of amelogenin on mineralization of cementoblasts and periodontal ligament cells. *J Periodontol* 2012; 83: 672-679.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

富永和也、竹内友規、本田秀太、岡村友玄、和唐雅博、田中昭男。
 エナメルマトリックスデリバティブ由来新規骨形成剤ペプチドの有効性。査読有、日本歯周病学会会誌 2017; 59: 39-47. doi: 10.2329/perio.59.39

〔学会発表〕(計 3 件)

Takeuchi T, Masuno K, Kato H, Taguchi Y, Umeda M, Tanaka A, Tominaga K.

A Human amelogenin-derived oligopeptide promotes osteogenic differentiation of hPDLSCs. 97th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research 2019, Vancouver, Canada.

竹内友規、富永和也、本田秀太、嘉藤弘仁、田口洋一郎、梅田誠、田中昭男

ヒトアメロジェニン由来ペプチドがヒト歯根膜幹細胞の増殖、硬組織分化に及ぼす影響
 第 61 回春季日本歯周病学会学術大会 2018、東京。

竹内友規、富永和也、本田秀太、嘉藤弘仁、田口洋一郎、梅田 誠、田中昭男。

ヒトアメロジェニン由来ペプチドがヒト歯根膜幹細胞の増殖、遊走、接着に及ぼす影響
 第 556 回大阪歯科学会例会 2017、枚方市。

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：富永 和也

ローマ字氏名：(TOMINAGA, Kazuya)

所属研究機関名：大阪歯科大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁) : 80278572

(2)研究協力者

研究協力者氏名：竹内 友規

ローマ字氏名：(TAKEUCHI, Tomoki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。