

令和元年6月14日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17354

研究課題名(和文)新規アメロジェニン会合分子Grp78を標的とした新規歯周組織再生治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a novel medical device for periodontal tissue regeneration using newly amelogenin binding protein Grp78

研究代表者

豊田 敬介 (Toyoda, Kyosuke)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：70757947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト初代培養歯根膜細胞において、胃粘膜保護薬剤テブレノン(テプレノン)は熱ショックタンパク質であるGRP78の発現を増強し、細胞増殖には影響を与えない一方、細胞遊走を亢進させることが示唆された。また、テブレノン刺激によるGRP78の強発現が起点となりangpt14やアンフィレグリンの産生が促進されることを見出した。さらに、アメロジェニンが添加されるとIL-8やIL-6による強力な血管新生が誘導される可能性も明らかにした。以上のことから、テブレノンとアメロジェニンの混合刺激は創傷治癒に適した環境を創出する可能性があることから、新しい歯周組織再生療法の開発に対して一助を担うことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は歯周病細菌の感染により惹起され、慢性炎症を引き起こすことで歯周組織が破壊される疾患であり、重度歯周炎における歯槽骨欠損、とりわけ水平的歯槽骨欠損を再生させることは未だ困難である。この研究成果よりGRP78の強発現が歯根膜に好影響を与えると考え、テブレノンとアメロジェニンの混合刺激は創傷治癒に適した環境を創出する可能性があることから、新しい歯周組織再生療法の開発に対して一助を担うことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Teprenone enhanced the expression of GRP78 and cell migration in human periodontal ligament cells (hPDLs). In contrast, it didn't affect cell proliferation in hPDLs. In addition, the overexpression of GRP78 by teprenone promoted the production of angpt14 and amphiregulin. Furthermore, the addition of amelogenin to teprenone induced the production of IL-8 and IL-6 in hPDLs, resulting in enhanced angiogenesis. Collectively, our results suggested that topical administration of teprenone and amelogenin may create a suitable environment for periodontal wound healing and GRP78 may be a novel therapeutic target for periodontal tissue regeneration.

研究分野：歯周病学

キーワード：GRP78 amelogenin teprenone

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

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯周病細菌の感染により惹起され、慢性炎症を引き起こすことで歯周組織が破壊される疾患であり、重度歯周炎における歯槽骨欠損、とりわけ水平的歯槽骨欠損を再生させることは未だ困難である。近年、破壊された歯周組織の再生に一定の成果を上げているタンパク質がエナメル基質タンパク質(enamel matrix derivative:EMD)である。そのEMDの90%以上を占めるアメロジェニンは、細胞外基質蛋白(EMD)の一種であり、EMDによる歯周組織再生の中心的な分子である。研究代表者はこれまでにエナメル基質タンパク質であるアメロジェニンが熱ショックタンパク質であるGlucose-related protein 78 (GRP78)と直接結合することを発見し、さらにGRP78を強発現させてアメロジェニンで刺激すると、ヒト歯根膜細胞株の遊走が著しく亢進することを報告した(Toyoda *et al.* 2016 *J Cell Physiol*)。テプレノンは胃粘膜保護薬剤であり、熱ショックタンパク質を誘導することが知られている。本研究では、GRP78の強発現が歯根膜に好影響を与えると考え、テプレノン単体またはテプレノン+アメロジェニン混合刺激が歯周組織再生に応用可能かを、ヒト初代培養歯根膜細胞(hPDLCs)を用いて検討することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的はアメロジェニンと Grp78 の相互作用のメカニズムを解明すると共に、その相互作用により活性化するポイントを解析することで歯周組織再生機序の分子基盤の確立し、安全性の高い分子標的再生療法を開発することである。

3. 研究の方法

hPDLCs をテプレノンにて、またはテプレノン+アメロジェニンにて刺激して、以下の解析を行なった。

1. テプレノン単体刺激による GRP78 の遺伝子およびタンパク質発現の経時的変化について検討した。さらに、テプレノン刺激での歯根膜細胞の機能解析(細胞増殖能・細胞遊走能)を測定した。
2. DNA マイクロアレイを用いて、無刺激群とテプレノン刺激群を比較した遺伝子発現解析を行なった。さらに得られた結果をリアルタイム PCR 法、ウェスタンブロット法および ELISA 法を用いて遺伝子・タンパク質発現レベルで検証した。
3. DNA マイクロアレイを用いて、テプレノン刺激群とテプレノン+アメロジェニン混合刺激群を比較した遺伝子発現解析を行なった。さらに得られた結果をリアルタイム PCR 法、ELISA 法を用いて遺伝子・タンパク質発現レベルで検証した。

4. 研究成果

テプレノンがヒト初代培養歯根膜細胞機能に与える影響

テプレノン刺激後 15 時間で GRP78 の遺伝子発現(図 1)が、また 18 時間でタンパク質発現が(図 2)最も強く誘導された。さらに、無刺激群と比較してテプレノン刺激群では細胞増殖に有意差がない(図 3)一方、細胞遊走能が有意に促進されていた(図 4)。

図 1

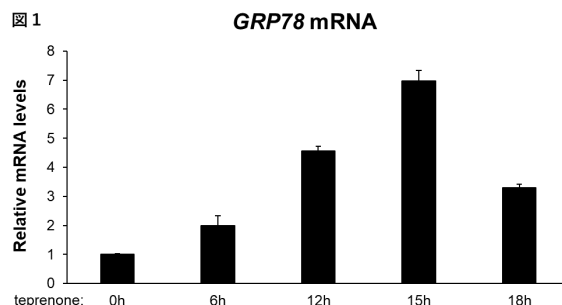


図 2

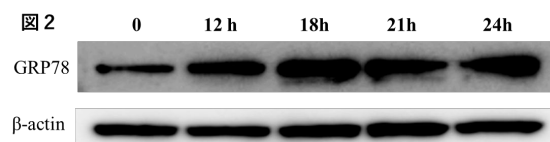


図 3

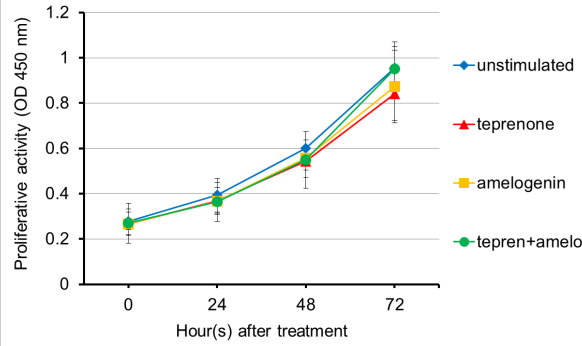
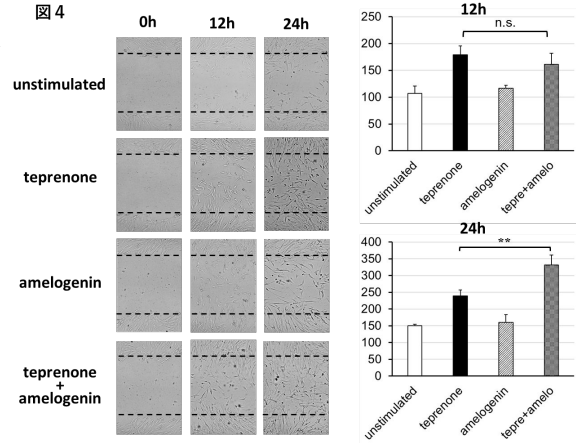


図 4



マイクロアレイ解析 (無刺激群 vs テプレノン刺激群)

無刺激群と比較してテプレノン刺激群において、血管新生作用のある *angptl4* 遺伝子が最も強く発現していた。次いで上皮細胞成長因子ファミリーの一つであるアンフィレグリンが高発現遺伝子として確認された。

(図 5)

angptl4 (図 6) とアンフィレグリン (図 7) はタンパク質レベルでも発現・分泌の増強が確認された。

図 5

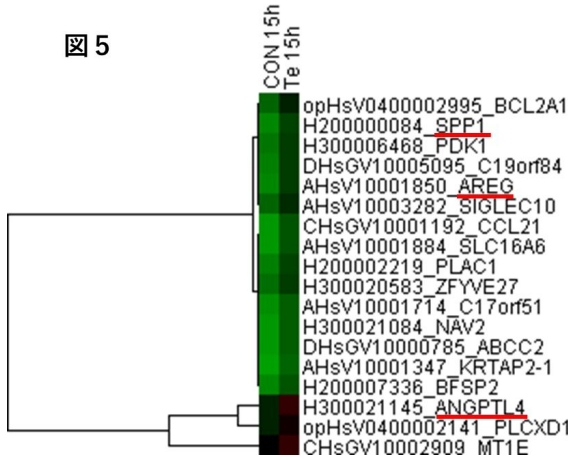


図 6

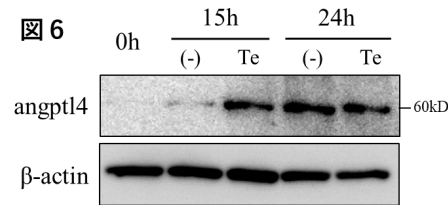
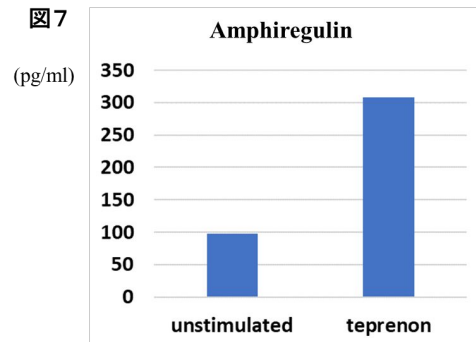


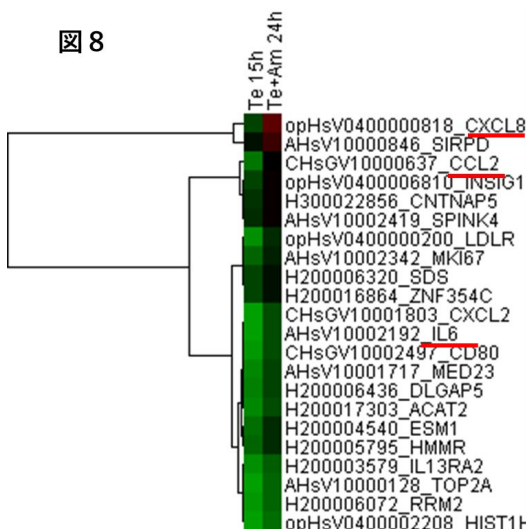
図 7

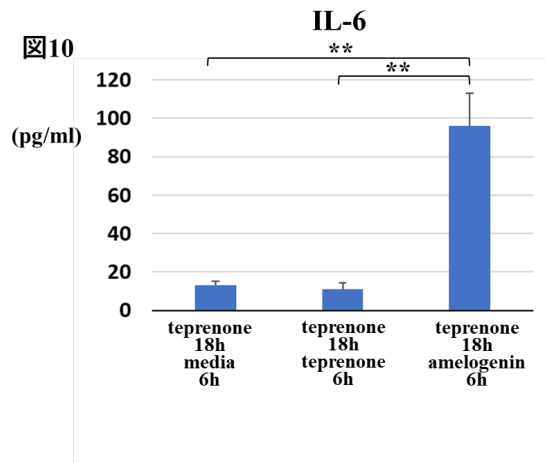
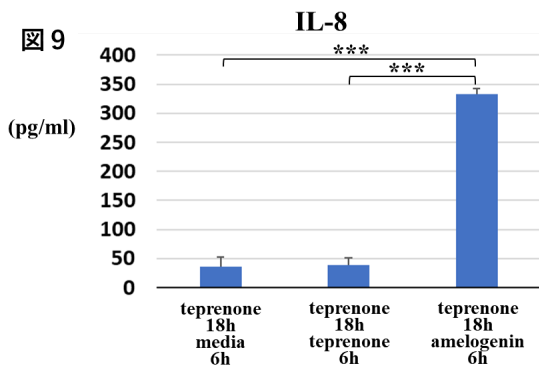


マイクロアレイ解析 (テプレノン刺激群 vs テプレノン+アメロジェニン刺激群)

テプレノン刺激群と比較してテプレノン+アメロジェニン混合刺激群において、血管新生誘導因子である IL-8 遺伝子が最も強く発現していた。次いで IL-6 が高発現遺伝子として確認された(図 8)。IL-8 (図 9) IL-6 (図 10) はタンパク質レベルでも分泌の増強が確認された。

図 8





考察

今回の結果から、hPDLCSにおいてテプレノンはGRP78の発現を増強し、細胞増殖と細胞分化には影響を与えない一方、細胞遊走を亢進させることが示唆された。また、テプレノン刺激によるGRP78の強発現が起点となりangptl4やアンフィレグリンの産生が促進されることを見出した。さらに、アメロジェニンが添加されるとIL-8やIL-6による強力な血管新生が誘導される可能性も明らかにした。

以上から、テプレノンとアメロジェニンの混合刺激は創傷治癒に適した環境を創出する可能性があることから、新しい歯周組織再生療法の開発に対して一助を担うことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

1. Sanui T, Fukuda T, Yamamichi K, **Toyoda K**, Tanaka U, Yotsumoto K, Taketomi T, Nishimura F: Microarray analysis of the effects of amelogenin on U937 monocytic cells. *American Journal of Molecular Biology* 2017, 7(2): 107-122.
2. Yamamichi K, Fukuda T, Sanui T, **Toyoda K**, Tanaka U, Nakao Y, Yotsumoto K, Yamato H, Taketomi T, Uchiumi T, Nishimura F. Amelogenin induces M2 macrophage polarisation via PGE2/cAMP signalling pathway. *Archives Oral Biology* 2017, 83: 241-251.
3. Sanui T, Fukuda T, Tanak U, **Toyoda K**, Yotsumoto K, Nakao Y, Yamato H, Taketomi T, Nishimura F: Sprouty2 Inhibition Resolves Inflammation in Periodontal Disease and Creates a Suitable Environment for Periodontal Tissue Regeneration. *Journal of Cell Biology & Immunology* 2017, 1: 101.

〔学会発表〕(計 3件)

1. 讃井彰一, 四本かれん, **豊田敬介**, 福田隆男, 田中麗, 山道研介, 西村英紀: 限局性侵襲性歯周炎患者にエナメルマトリックスデリパティブによる歯周組織再生療法を行った一症例 第60回春季日本歯周病学会学術大会、福岡国際会館、福岡市、2017.5.13
2. Urara Tanaka, Karen Yotsumoto, Terukazu Sanui, Takao Fukuda, **Kyosuke Toyoda**, Fusanori Nishimura: Microarray analysis of U937 monocytic cells stimulated with amelogenin. Penn Periodontal Conference 2017, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA, 2017.6.29
3. 福田隆男, 中尾雄紀, 讃井彰一, **豊田敬介**, 田中麗, 西村英紀: 広汎型侵襲性歯周炎患者に対し歯周組織再生療法を含む包括的治療を行った一症例 日本歯周病学会60周年記念京都大会、国立京都国際会館、京都市、2017.12.16-17

〔その他〕

ホームページ等

九州大学研究者情報

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/index.html>

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯周病学分野

<http://www.dent.kyushu-u.ac.jp>

6 . 研究組織

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。