

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19147

研究課題名(和文)新規BMP-2ペプチドおよびRANKL結合ペプチドの固定化と骨関連細胞分化の制御

研究課題名(英文) Immobilization of novel BMP-2 peptide and RANKL-binding peptide and its regulatory effects on the bone-related cell differentiation

研究代表者

首藤 崇裕 (Shuto, Takahiro)

大阪歯科大学・医療保健学部・助教

研究者番号：40804604

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)：本研究では、インプラント治療の長期安定性の向上に大きく寄与する表面修飾法の開発を目指し、新規合成BMP-2ペプチドとRANKL結合ペプチド(W9ペプチド)の骨芽細胞および破骨細胞分化に与える影響について検討した。その結果、新規BMP-2ペプチドは骨芽細胞の分化を促進し、W9ペプチドと併用することで相加的な影響を示すこと、またBMP-2ペプチドがW9ペプチドの破骨細胞分化抑制能を阻害することなく機能することが示唆された。チタン板表面にペプチドを固定化した場合も同様であった。したがって、これらのペプチドによって、チタン製インプラント周囲において骨形成優位な環境を作り出すことができると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

In vitroではあるが本研究結果より、新規合成BMP-2ペプチドとW9ペプチドの組み合わせは、より安価で安全性が高く、オッセオインテグレーション獲得や長期の予後に好影響をもたらす可能性も大きいことが予想され、口腔インプラント治療にとって非常に有意義と考えられる。また、本固定化法の確立ができれば、チタンだけでなく、近年インプラント材料として脚光を浴びているポリエーテルエーテルケトン(PEEK)材やジルコニアなどにも応用でき、さらには整形外科領域におけるインプラント臨床応用にも展開できると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the effects of novel synthetic BMP-2 peptide and RANKL-binding peptide (W9 peptide) on osteoblast and osteoclast differentiation with the aim of developing a surface modification method that greatly contributes to the improvement of long-term stability of implant treatment. The results of this study suggest that the novel synthetic BMP-2 peptide and W9 peptide shows synergetic effects of promoting osteoblastic differentiation, and the BMP-2 peptide has no inhibiting functions of suppressing osteoclast differentiation by W9 peptide. In the case of peptide immobilization to titanium surface, the similar results were obtained. Therefore, these peptides could locally alter the balance of bone formation and resorption, so as to be favorable for titanium implants.

研究分野：歯学

キーワード：BMP-2ペプチド RANKL結合ペプチド インプラント 骨芽細胞 破骨細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔インプラント治療において、強固なオッセオインテグレーション(インプラント体と骨組織の結合)の早期獲得は、治療の成功に導くために必要不可欠である。その実現のためにインプラント体表面に骨形成誘導物質を修飾する方法があり、申請者はその修飾物質として骨形成因子である BMP-2 由来のペプチド(BMP-2 ペプチド)に着目した。BMP-2 ペプチドは BMP-2 タンパクと比べて生体に対してのリスクが低く、安価という利点があり臨床応用に繋げやすい。また近年、インプラント治療の増加に伴い、埋入後の炎症による歯槽骨吸収などの予後不良も散見されていることから、骨吸収抑制能と骨形成促進能を有する RANKL 結合ペプチドである W9 ペプチドにも着目した。

### 2. 研究の目的

本研究では、インプラント治療の長期安定性の向上に大きく寄与する表面修飾法の開発を目指し、新規合成 BMP-2 ペプチドと W9 ペプチドを固定化したチタンが骨芽細胞および破骨細胞分化に与える影響について検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1)新規 BMP-2 ペプチドの合成

齊藤らの報告(Suzuki et al., J Biomed Mater Res, 2000., Saito et al., J Biomed Mater Res, 2004.)をもとに、BMP-2 のアミノ酸配列 73 番目~92 番目、68~87 番目に相当する BMP-2 ペプチドの共通配列を有する新規の BMP-2 ペプチドを合成した。システイン 78 番目と 79 番目を、セリン 78 番目と 79 番目に置換すると ALP 活性を促進したという報告をもとに、本新規 BMP-2 ペプチドのアミノ酸配列でも同様に置換した。またネガティブコントロールとして活性部位を含まないペプチドも合成した。

#### (2)新規 BMP-2 ペプチドおよび W9 ペプチドの骨芽細胞と破骨細胞分化への影響

ペプチドを培養液中に直接添加した場合の骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞における骨芽細胞分化マーカー(Runx2, Osterix, Type collagen)、および破骨細胞前駆体培養細胞株 RAW264.7 細胞における破骨細胞分化マーカー(TRAP, Cathepsin K)の発現を real time quantitative RT-PCR によって解析した。

MC3T3-E1 細胞において、ALP 染色およびカルシウム沈着の評価のための石灰化染色を行った。

RAW264.7 細胞については、TRAP 染色によって RANKL 刺激による多核巨大細胞形成の評価も行った。

#### (3) 新規 BMP-2 ペプチドおよび W9 ペプチド固定化チタン板の作製

申請者がこれまでに行ってきた実績のあるタンパク固定化方法(Makihira, Shuto et al., Int J Mol Sci, 2010.)によって、新規 BMP-2 ペプチドと W9 ペプチドのチタン板表面への固定化を行った。

#### (4) 新規 BMP-2 ペプチドおよび W9 ペプチド固定化チタン板の骨芽細胞と破骨細胞分化への影響

ペプチドをチタン板へ固定化した場合の骨芽細胞と破骨細胞の分化マーカーの発現を上記(2)と同様の手法によって解析した。

### 4. 研究成果

(1) 2019年度は、新規BMP-2ペプチドを合成し、本ペプチドがMC3T3-E1細胞の分化に与える影響について分子生物学的および生化学的手法により検討した。

チタンへのペプチド固定化の前に、BMP-2ペプチドを培養液中に直接添加した場合の細胞への影響を検証した。細胞増殖アッセイによる解析の結果、使用した濃度(100 μMまで)のBMP-2ペプチドはMC3T3-E1細胞およびRAW264.7細胞の細胞活性に影響を及ぼさないことを確認した。

real-time quantitative RT-PCR法による解析の結果、BMP-2ペプチド刺激によってMC3T3-E1細胞における骨芽細胞分化マーカーであるRunx2、OsterixおよびType collagenの遺伝子発現量が顕著に増加した。また、MC3T3-E1細胞のALP染色陽性を亢進した。

(2) 2020年度は、新規BMP-2ペプチドとW9ペプチドがMC3T3-E1細胞およびRAW264.7細胞の分化

に与える影響について分子生物学的・生化学的手法により検討した。

BMP-2ペプチドの場合と同様に、細胞分化に対する影響の検討を行う前に、W9ペプチドを培養液中に直接添加した場合の細胞活性への影響を検証した。過去の報告(Furuya et al., J Biol Chem, 2013.)を参考に、200  $\mu$ MまでのW9ペプチドを使用し細胞増殖アッセイを行った結果、MC3T3-E1細胞およびRAW264.7細胞の細胞活性に影響を及ぼさないことを確認した。

ペプチドを培養液中に直接添加した場合(可溶性条件)の細胞への影響を検証した結果、W9ペプチド単独刺激はBMP-2ペプチド単独刺激のときと同様に、MC3T3-E1細胞における骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現量を増加させALP染色陽性を亢進した。また、2つのペプチドの同時刺激では、単独刺激の場合と比較して、骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現量を増加させ、ALP染色陽性も亢進した(図1)。さらに、両ペプチドは、MC3T3-E1細胞における石灰化も促進する傾向が認められた(図2)。

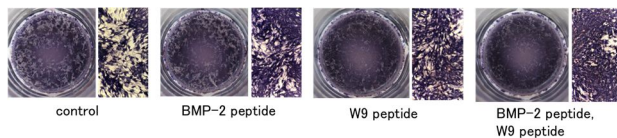


図1 骨形成培地中で培養したMC3T3-E1細胞のALP染色

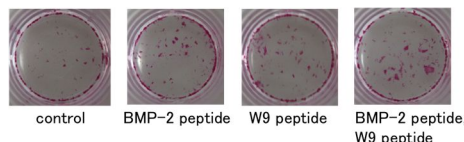


図2 骨形成培地中で培養したMC3T3-E1細胞の石灰化染色

可溶性条件での検証後、チタン板表面にペプチドを固定化しMC3T3-E1細胞への影響を検討した。その結果、可溶性条件と同様に、両ペプチドはコントロール群、ペプチド単独刺激群と比較して骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現を促進した(図3)。

RAW264.7細胞の分化に対するペプチドの影響については、W9ペプチド単独では遺伝子発現解析によりTRAP、Cathepsin Kといった破骨細胞分化マーカーの発現を抑制する傾向が見られたが、両ペプチドの併用では十分なデータは得られなかった。

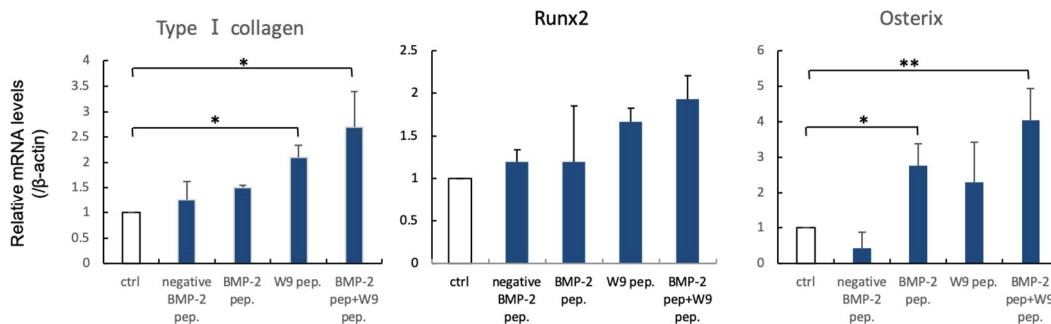


図3 ペプチド固定化チタンが骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現に与える影響

(3) 2021年度は、両ペプチドによる刺激がRAW264.7細胞における破骨細胞分化マーカーの発現に与える影響をreal-time quantitative RT-PCR法により解析し、さらにTRAP染色によって破骨細胞分化・融合の評価を行った。

RANKL存在下において、W9ペプチド単独刺激の場合と同様に両ペプチドの併用は、RAW264.7細胞における破骨細胞分化マーカーの発現を抑制し、同細胞の分化・融合を阻害することがわかった。

ペプチド固定化条件の場合、可溶性条件と同様に、破骨細胞分化マーカーの発現抑制が認められた(図4)。

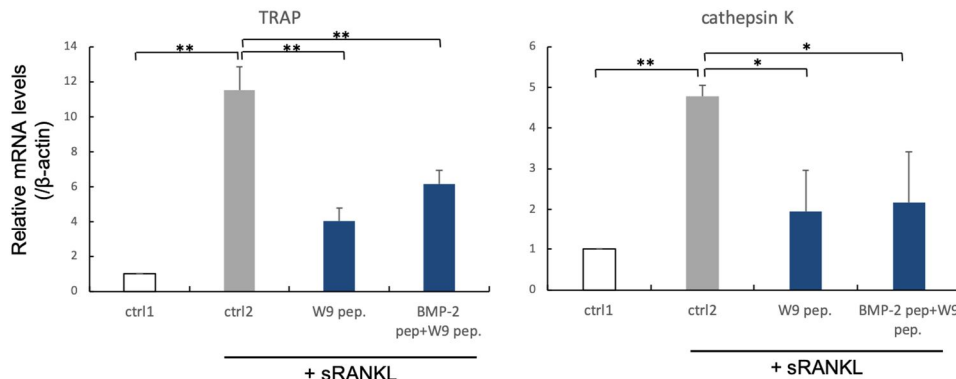


図4 ペプチド固定化チタンが破骨細胞分化マーカーの遺伝子発現に与える影響

以上の結果より、新規BMP-2ペプチドは骨芽細胞の分化を促進し、W9ペプチドと併用することで

相加的な影響を示すこと、またBMP-2ペプチドがW9ペプチドの破骨細胞分化抑制能を阻害することなく機能することが示唆された。したがって、これらのペプチドは、チタン製インプラント周囲において骨形成優位な環境を作り出すことができるチタン表面修飾物質になり得ると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	峯 裕一  (MINE Yuichi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関