

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390499

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の増殖能をもつ塩基性抗菌ペプチド JH8194 の固定化と骨分化能の解析

研究課題名(英文) Evaluation of potential to promote the differentiation of osteoblastic cells by immobilized cationic antimicrobial peptide, JH8194 which promotes the proliferation of mesenchymal stem cells

研究代表者

二川 浩樹 (NIKAWA HIROKI)

広島大学・大学院医歯薬総合研究科・教授

研究者番号：10228140

研究成果の概要(和文)：

塩基性抗菌ペプチド固定化チタンおよび多孔質チタンについて骨芽細胞の骨分化を *in vitro* での検討を行った結果、以下の知見を得た。

可溶性 JH8194 による分化マーカーの発現は、コントロールと比較して 2～4 倍程度であった。これに対して、JH8194 固定化チタンの場合、Runx2, Osterix および OPN mRNA の発現を著しく促進し、約 20～40 倍の分化マーカーの発現を認めた。以上より、JH8194 を固定化することによって、骨芽細胞の分化を促進することが可能となることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

The objective of this study was to evaluate the effect of titanium immobilized with a cationic antimicrobial peptide (JH8194) derived from histatin on the differentiation of osteoblastic cells (MC3T3-E1). The titanium specimens (Ti) were immobilized with JH8194, according to the method previously described. JH8194-Ti enhanced the mRNA expressions of Runx2 and OPN, and ALPase activity in the MC3T3-E1, as compared with those of control- and blocking-Ti. These results, taken together, suggested the possibility that JH8194-Ti may be a potential aid to shorten the period of acquiring osseointegration

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：口腔生物工学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：①塩基性ペプチド②チタン③インプラント④骨芽細胞⑤オッセオインテグレーション

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、KRLFRRWQWRMKKY という 14 アミノ酸残基よりなる塩基性抗菌性ペプチ

ド JH8194 を合成し、この JH8194 は、アンホテリシン B と比較しても非常に高い抗菌性を示すことを明らかにした。

その後、本ペプチドに間葉系幹細胞の増殖能があることを見出し、さらに、間葉系幹細胞に対して骨分化の促進能をもつことを明らかにした。

## 2. 研究の目的

インプラントのより良いオッセオインテグレーションの獲得のために、これまでチタン表面へのタンパク・ペプチドあるいは薬剤などの固定化が試みられている。特にタンパク・ペプチドとしては国内外を通じて、フィブロネクチン、コラーゲンなどの細胞外接着因子 (ECM) や細胞接着能を示す RGD 配列を有するペプチドが主として用いられてきた。また、近年では、RGD 配列を持つ小ペプチドとともに、ペパラン硫酸のバインディングドメインである KRSR やヘパランバインディングドメインである FHRRIKA-を共固定した報告も見られる。

この一方で、我々は、ヒトあるいは哺乳類由来の塩基性抗菌性ペプチドの抗菌性の改良を行ってきた。特に、オランダ ACTA のグループの合成した Dhvar5 (KRLFKLLFSLRKY) とラクトフェリシン (LFB) のフラグメント

(FKCRRWQWRMCKLG) から新たに

KRLFRWQWRMKKY という 14 アミノ酸残基よりなる塩基性抗菌性ペプチド JH8194 を合成した。この JH8194 は、アンホテリシン B と比較しても非常に高い抗菌性を示すことを明らかにした。その後、本ペプチドに間葉系幹細胞の増殖能があることを見出し、さらに既知の哺乳類由来の塩基性抗菌ペプチド数種とスクリーニングアッセイを行った結果、この JH8194 の間葉系幹細胞に対する増殖能は、非常に高く、また間葉系幹細胞のグロースファクターとして知られる  $\beta$ FGF と相乗効果があることを明らかにした。

この新知見に基づき、平成 16 年~18 年までの間に、JST の権利化試験にてサポートを受け、本ペプチドを成分に含む、抗生剤フリーの無血清培地を開発し、この間 5 件の特許出願を行うに至った。図のように JH8194 含む本 JST 培地は、市販無血清培地あるいは低血清培地に比べ、非常に高い間葉系幹細胞の増殖能を有するだけでなく、従来法である DMEM に子ウシ胎仔血清 (FBS) を 10% 添加したものよりも、有意に高い増殖能を有している。また、このような JH8194 による間葉系幹細胞の増殖促進は、早期の転写因子への作用ならびに STAT 系の活性化によることを明らかにしている。

以上の知見より、この JH8194 を骨治癒剤などとして応用可能であると考え、インプラント体 (チタン表面) に固定化することで、組織内では、より早い幹細胞の増殖能と骨分化促進により骨治癒の促進を行うことを通じ、オッセオインテグレーションを獲得することが可能となると考えられるため、その基

礎的検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) チタン

本実験には、直径 15 mm、厚さ 1.0 mm のチタンプレス円板 (小田鋼機株式会社、大阪)(チタン)を使用した (図 1)。

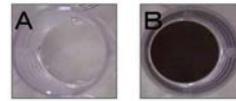


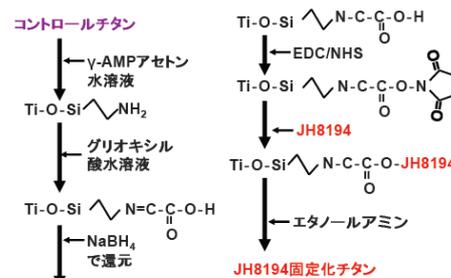
図 1 プラスチック (A) とチタン (B)

プラスチックは可溶性として、チタンはコントロール、ブロックング、JH8194 固定化チタンを使用した。

### (2) JH8194 のチタン表面への固定

チタンを各実験に用いるため、はじめにアセトンとエタノールでそれぞれ 30 分間、超音波洗浄を行った。その後、オートクレーブにて滅菌した。次に、5%ガンマアミノプロピルエトキシシランアセトン溶液に室温で 15 分間浸漬し、アセトンで洗浄した。続いて、5%グリオキシル酸水溶液に 2 時間浸漬し、超純水で洗浄した。その後、0.4%ホウ酸水素ナトリウム ( $\text{NaBH}_4$ ) に 24 時間浸漬して還元を行い、超純水で洗浄後、オートクレーブにて滅菌した。

1-ethyl-3-dimethylaminopropyl(EDC)-carbodiimide,hydrochloride)/N-hydroxysuccinimide (NHS) (BiaCore AB, Uppsala, Sweden)中に室温で 5 分間おき、炭酸水素ナトリウム ( $\text{NaHCO}_3$ , 10mM, pH8.0) で洗浄した後、チタン表面に付着したカルボキシル基を活性化させた。1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 20  $\mu$ M の JH8194 溶液を添加し、固定化反応を 30 分間行った。JH8194 と結合しなかった未反応のカルボキシル基をエタノールアミン (BiaCore AB)を用いてブロックングすることで、JH8194 固定化チタンを製作した。また、前処理のみ行ったチタンをコントロールチタンとし、EDC/NHS 処理後に JH8194 を固定しないで、エタノールアミン処理のみ行ったものをブロックングチタンとした。



(3) 使用細胞株および細胞培養

培養細胞は、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞 (MC3T3-E1 細胞) を使用した。MC3T3-E1 細胞は 10% ウシ胎仔血清 (FBS) (Biological Industries, Haemek, Israel), L-グルタミン, antibiotic mixture (Invitrogen) および 50 μg/ml アスコルビン酸 (Sigma) を含有した α 変法イーグル培地 (α-MEM) 中で、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下にて培養した<sup>10)</sup>。

(4) MTS 法

96 ウェル細胞培養用培養皿に MC3T3-E1 細胞を 1 × 10<sup>4</sup> cells/well 播種し、0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 μM の JH8194 存在下で 4 日間培養した後、細胞数を MTS 法で評価した。490 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (BIO-RAD Laboratories) を用いて測定し、JH8194 の細胞増殖に与える影響について検討した。

(5) RT-PCR および real-time quantitative RT-PCR

プラスチック上またはチタン上で培養した MC3T3-E1 細胞より、TRIzol reagent (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出し、ReverTra Ace reverse transcriptase (Toyobo) を用いて cDNA を作製した。骨芽細胞の分化マーカーである Runx2/Cbfa1 (Runx2), Osterix, Osteopontin (OPN) および Type-I collagen (Col-I) を Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) または、real-time quantitative RT-PCR で解析した。また、内在性コントロールとして β-actin の発現を解析した (表 1, 2)。

表1 RT-PCRにおけるPrimer

Target name	Primer	Sequence(5' -3')
Runx2	Primer F	CCAGATGGGACTGTGGTTACC
	Primer R	ACTTGGTGCGAGGTTGAGGG
Osterix	Primer F	CTGGGGAAAGGAGGCACAAAGAAG
	Primer R	GGGTTAAGGGGAGCAAAGTCAGAT
Osteopontin	Primer F	ACACTTCACTCCAATCGTC
	Primer R	TGCCCTTCCGTTGTGTGCC
β-actin	Primer F	GCTTCCTGGGCATGGAATCCTG
	Primer R	GGAGGAGCAACAATCTTGATCTTC

表2 real-time quantitative RT-PCRにおけるPrimerおよびprobe

Target name	Primer	Sequence(5' -3')
Type-I collagen	Primer F	AACCCGAGGTATGCTTGATCT
	Primer R	CCAGTCTTCAATTGCAATTGC
	Probe	CACGGCTGTGTGCGATGACG
β-actin	Primer F	CCACACTGTGCCCATCTACG
	Primer R	GTGGTGGTGGAGCTGTAGCC
	Probe	CCTGCGTCTGGACCTGGCTGGC

(6) 走査型電子顕微鏡観察 (SEM)

チタン上で 3 日間培養した MC3T3-E1 細胞を PBS で洗浄し、2% グルタルアルデヒド溶液で固定した。その後、PBS 洗浄を 3 回繰り返し、50, 60, 70, 80, 90, 95, 100% のアルコール上昇系列によって脱水後、TWIN COATER (JEC-550, JEOL, 東京) を用いて金蒸着を行った。

4. 研究成果

(1) 可溶性 JH8194 が骨芽細胞増殖に与える影響

細胞を播種した 4 日後に、可溶性 JH8194 の細胞増殖に与える影響について検討した。50 μM 以下の可溶性 JH8194 は、MC3T3-E1 細胞の増殖に影響を与えなかった。一方、JH8194 を 100 μM 添加した場合は、増殖は有意に抑制された (p < 0.01) (図 2)。

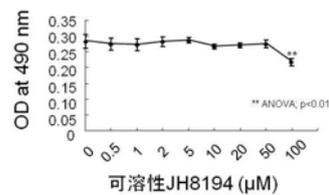


図 2 骨芽細胞の増殖に及ぼす可溶性 JH8194 濃度の影響

(2) 可溶性 JH8194 が骨芽細胞分化に与える影響

細胞を播種した 7 日目後に、可溶性 JH8194 が、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現に与える影響について検討した。可溶性 JH8194 は、JH8194 を添加しない場合と比較して、MC3T3-E1 細胞における Runx2, Osterix, および OPN mRNA の発現を促進した。一方、β-actin mRNA の発現には影響を与えなかった (図 3)。同様に、可溶性 JH8194 は、MC3T3-E1 細胞における Col-I mRNA の発現を濃度依存的に促進した。また、10 μM の可溶性 JH8194 は、Col-I mRNA の発現を有意に促進した (p < 0.05) (図 4)。

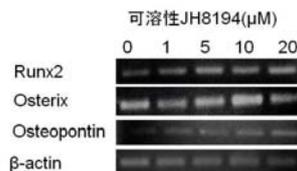


図 3 骨芽細胞の分化に及ぼす可溶性 JH8194 濃度の影響

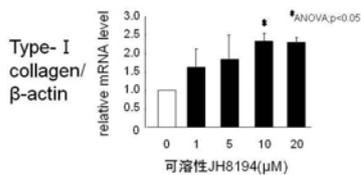


図 4 骨芽細胞の分化に及ぼす可溶性JH8194濃度の影響

### (3) JH8194 固定化チタンが骨芽細胞分化に与える影響

細胞を播種した7日目後に、JH8194 固定化チタンが、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現に与える影響について検討した。20 μM の JH8194 固定化チタンは、コントロールチタンおよびブロッキングチタンと比較して、MC3T3-E1 細胞における Runx2, Osterix および OPN mRNA の発現を著しく促進した。一方、すべてのチタンは、β-actin mRNA の発現に影響を与えなかった(図 5)。

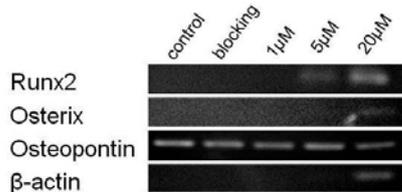


図 5 骨芽細胞の分化に及ぼすJH8194固定化チタン濃度の影響

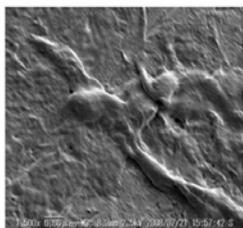


図 6 JH8194固定化チタンによる骨芽細胞の分化

### (4) JH8194 固定化チタン上の骨芽細胞の形態観察

細胞を播種した3日目後に、20 μM の JH8194 固定化チタン上での骨芽細胞形態を SEM(VE-8800, KEYENCE, 大阪)を用いて観察した。JH8194 を固定化したチタン上で、MC3T3-E1 細胞は伸展していた(図 6)。

## 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1件)

1. Titanium immobilized with an antimicrobial peptide derived from histatin accelerates the differentiation of osteoblastic cell line, MC3T3-E1. Makihira S, Shuto T, Nikawa H, Okamoto K, Mine Y, Takamoto Y, Ohara M, Tsuji K. Int J Mol Sci.11(4):1458-70, 2010.査読有

〔学会発表〕(計5件)

1. 歯科用インプラントとチタンの表面処理. 二川浩樹, 牧平清超, 西村正弘, 高萩隆行, 京極秀樹. 広島大学ナノデバイス・バイオ融合科学研究シンポジウム集積医科学研究部門 2009年5月27日 東広島市
2. 歯科用インプラントとチタンの表面処理. 二川浩樹 一歯科材料を中心とした生体材料開発の最前線— 第34回材料制御研究会 中四国支部会(主催 日本金属学会・日本鉄鋼協会中国四国支部・広島大学歯学部口腔保健学科), 2008年12月26日 広島市
3. 塩基性抗菌ペプチドを応用した骨再生. 二川浩樹, 牧平清超. 第2回口腔からQOLを目指す連携研究 広島大学(骨再生G) 2008年6月26日 広島市
4. 塩基性抗菌性ペプチドの応用と固定化抗菌剤を用いた洗剤開発の2つの事例から. 二川浩樹 日本補綴歯科学会 公募型シンポジウム2, 2008年6月7日 名古屋
5. 塩基性抗菌ペプチドの応用と新規インプラントの可能性 二川浩樹. 人工歯根研究会(中国地域ニュービジネス協議会) 2008年3月3日 広島市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

二川 浩樹 (NIKAWA HIROKI)  
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
 研究者番号: 10228140

### (2) 研究分担者

牧平 清超 (MAKIHIRA SEICYO)  
 九州大学・大学院歯学研究院・准教授  
 研究者番号: 80304450

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: