

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792133

研究課題名(和文) 合成ペプチドを用いた新たな歯周組織再生療法の試み

研究課題名(英文) Development of a new periodontal tissue regeneration therapy with Synthetic Peptides

研究代表者

掛川 文子 (KAKEGAWA AYAKO)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：70514280

研究成果の概要(和文): エナメルタンパク質のひとつであるエナメルシースプロテインは、主にエナメル質の小柱鞘の形成に係るタンパク質である。今までに、ブタエナメルシースプロテインがヒト歯根膜細胞(HPDL)細胞に対してセメント質様の硬組織形成能を持つということが歯周病モデル犬にて報告されている。そこで本研究では、歯周組織再生療法への応用を目指してエナメルシースプロテインの合成ペプチドを数種類作製し、これらのHPDL細胞に対する細胞分化誘導能活性を調べた。

前年度、ヒトエナメルシースプロテインのC末端側アミノ酸配列から数種類のペプチドを合成し、これらの細胞分化誘導能をHPDL細胞が有するアルカリフォスファターゼ(ALP)活性の測定、リアルタイムPCRによる骨マーカー(OPN, OC, BSP)発現量の測定、石灰化誘導実験などを行って確認した。その結果、ペプチドの中でSDKPPKPELPGVDF(H-2)の配列が最も強いHPDL細胞の硬組織誘導形成能を有していることが判明した。これらの結果から論文の執筆を行い、J Periodontal Resへ投稿し、受理された。

研究成果の概要(英文): Enamel sheath protein (ESP) is involved in the construction of the enamel sheath during tooth development. The 17 kDa ESP is a one-step cleavage product processed by proteolysis from the N-terminal side of sheathlin (ameloblastin/amelin), one of the porcine enamel matrix proteins. Enamel sheath protein exhibits periodontal ligament and cementum regeneration activity in a buccal dehiscence model dogs, and promotes the cytodifferentiation of cultured human periodontal ligament (HPDL) cells. The aim of this study was to determine the peptide segment on the C-terminal side sequence of the human ESP that possesses a cytodifferentiation activity on cultured HPDL cells. Material and Methods: The peptides synthesized on the basis of human ESP C-terminal side sequence were tested for their ability to increase the alkaline phosphatase (ALP) and mineralization activity of cultured HPDL cells. The expressions of osteocalcin, osteopontin and bone sialoprotein were measured by semi-quantitative PCR and therefore were determined to be specific indicators of mineralized tissue differentiation. Multiple synthetic peptides from the human ESP increased the ALP activity and stimulated matrix mineralization in long-term cultures of HPDL cells. Semi-quantitative PCR demonstrated the osteocalcin, osteopontin and bone sialoprotein expressions to increase relative to the control values. The peptide SDKPPKPELPGVDF had the strongest cytodifferentiation activity among all the synthetic

peptides tested. A specific peptide sequence derived from the C-terminal side of the human ESP promotes the cytodifferentiation and mineralization activity of HPDL cells in a cell culture system. This study was published J periodontal Res.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯周治療系 歯周外科学

キーワード：エナメルシースプロテイン、 ヒト歯根膜細胞、 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

シースプロテインとはエナメルタンパク質の1種であり、基質形成期の幼弱エナメル質の小柱鞘に多く含まれている。Fukaeらは、シースプロテインがヒト歯根膜細胞に対してTGF-β1様の高い硬組織形成誘導能を有していると報告している。(Fukae M *et al.* *Eur J Oral Sci* 2006) Kanazashiらの研究では、17KDa シースプロテインを歯周組織欠損モデル犬に使用したところセメント質様組織および骨様組織の再生が認められ、歯周組織再生療法に応用できる可能性を報告している。(Kanazashi M *et al.* *J Periodont Res* 2006)そして、2006年のFukaeらの研究で17KDa シースプロテインをヒト歯根膜細胞に作用させると骨形成マーカーであるALP活性の誘導が強く認められた。しかしながら、17KDa シースプロテインの分解産物である15KDaおよび13KDaシースプロテインにはALP活性の誘導を確認することができなかった。(Fukae M *et al.* *Eur J Oral Sci* 2006) このことから、歯周組織再生療法へ応用できる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

歯周疾患は日本国民の8割が罹患している生活習慣病であり、歯周組織再生療法の需要はとても高い。しかしながら、現在使用されている再生材料の多くが動物由来であり、(1)未知のウイルス感染の危険性 (2)ロットによって品質が異なる (3)安定した治療効果が得られない (4)大量生産が困難であるなどの問題を含む。しかしながら、人工的に合成したペプチドを歯周組織再生療法に応用すれば、感染からの安全確保、品質の一定化、一定した治療効果、大量生産を可能とすることができる。そこで本研究では、高い硬組織形成誘導能を持つシースプロテインの合成ペプチドを作成し、歯周組織再生療法への応用を検討する。

3. 研究の方法

(1) ペプチドの合成

ヒトエナメルシースプロテインのC末端側アミノ酸配列から以下のペプチドを合成した。

Fig1

エナメルシースプロテイン

アミノ酸シーケンス

```

1
*1
p: V P A F P R Q P G T P G V A S L E T M R Q L G S L Q L I N M L S Q Y S R F G F G K S F N S L W M
n: V P F F P Q S G T P G M A S L S L E T M R Q L G S L Q R L N T L S Q Y S R V G F G K S F N S L W M
n: V P F P Q S G T P G M A S L S L E T M R Q L G S L Q R L N T L S Q Y S R V G F G K S F N S L W M
51
p: H G L L P P H S S L P W M R P R E H E T Q Q V E Y S L P V H P P P L P S Q P S L Q P Q P G Q K P P F
n: H G L L P P H S S L P W M R P R E H E T Q Q V E Y S L P V H P P P L P S Q P S L K P Q Q P G L K P F
n: H G L L P P H S S L P W M R P R E H E T Q Q V E Y S L P V H P P P L P S Q P S L K P Q Q P G L K P F
101
*2
p: L Q P T V V T I S I Q N P V Q K G Y P A P P I Y Q G H P L Q V E G E P M V Q Q Q V A P S E K P P E A
n: L Q S A A A T T N Q A T A L K E A L Q P P I H L G H L P L Q E G E L P L V Q Q Q V A P S D K P P K P
n: L Q S A A A T T N Q A T A L K E A L Q P P I H L G H L P L Q E G E L P L V Q Q Q V A P S D K P P K P
151
p: E L P G L D F A D P Q D P S ----- M F P I A R 170
n: E L P G V D F A D P Q G S L P G M D F P D P Q G S L P G L D F A D P Q G S T I F Q I A R 196
n: E L P - V D F A D P Q G S L P G M D F P D P Q G S L P G L D F A D P Q G S T I F Q I A R 195

```

*1 : N-terminal side of 13-kDa sheath protein
*2 : C-terminal side of 13-kDa and 15-kDa sheath protein

合成したペプチド断片

- H-1: EGELPLVQQQVAPS
- H-2: SDKPPKPELPGVDF
- H-3: FADPQGPSLPGMDF
- H-4: FPDQGPSLPLGLDF
- H-5: FADPQGSTIFQIAR
- H-2': SDKPPKPELPGVDF
- H-2a: SDKPPKPELP
- H-2b: SDKPPKPEL
- H-2c: KPPKPELPGVDF
- H-2d: VAPSDKPPKP
- H-2e: PELPGVDF
- P-1: QVEGPMVQQQVAPSEK

(2) ALP Assay

HPDL細胞を96wellに 1×10^5 cell/mlの濃度で播種し、24時間後に各種ペプチドを作用させた。ペプチド添加48時間後に0.1Mパラニトロフェニルリン酸を基質とし、マイクロプレートリーダー405nmの条件で吸光度を測定した。

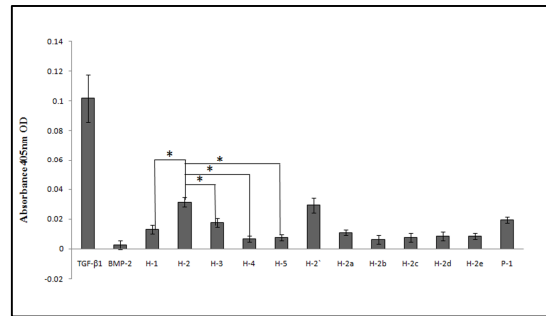
(3) 石灰化誘導実験

α MEM(10%FBS,1%PS添加)に50 μ mol/lアスコルビン酸,10mmol/ml β グリセロリン酸を添加し、細胞培養を行った。ペプチド添加24日後に1%アリザリンレッドSにて染色した。また、同様に培養した細胞が誘導したCaをカルシウムC-テストワコーを用いて調べた。

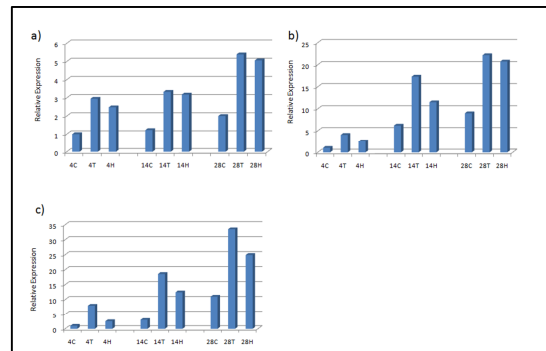
(4) RT-PCR

石灰化誘導培地を用いてHPDL細胞を培養

し、各種ペプチドを作用させた4日後および21日後にRNAAquosを用いて得たTotal RNA



に Ready to go を用いて PCR テンプレート



を作成した。GAPDHをコントロールとし、骨シアロタンパク質(BSP)、オステオカルシン(OC)、オステオポンチン(OPN)の発現を調べた。

4. 研究成果

Fig2 ALP Assay

Fig3 RT-PCR

ESPのペプチドがヒトHPDL細胞のALP活性を誘導することが示された。数種類のペプチドの中でSDKPPKPELPGVDF(H-2)の配列が最も強いALP活性の誘導を示した。H-2をさらに断片化したH-2a,b,c,d,eのALP活性誘導能はH-2に比較して低いことが判明した。(Fig.2)石灰化誘導培地での培養21日目には石灰化ノジュールも認められた。RT-PCRの結果では、H-2をHPDL細胞に添加すると骨形成マーカーであるBSP, OCの遺伝子発現の増強が認められた。(Fig.3)これらのことから、H-2はHPDL細胞に対して

硬組織形成誘導能を有している可能性が示唆された。

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)

Takegawa A, Oida S, Gomi K, Nagano T, Yamakoshi Y, Fukui T, Kanazashi M, Arai T, Fukae M
Cytodifferentiation Activity of Synthetic Human Enamel Sheath Protein Peptides.
J Periodontal Res. 査読有 45 (5) 2010 643 - 649

[学会発表](計1件)

Takegawa A, Oida S, Gomi K, Nagano T, Yamakoshi Y, Fukui T, Kanazashi M, Arai T, Fukae M
Cytodifferentiation Activity of Synthetic Human Enamel Sheath Protein Peptides.
2009年8月29日
Asian Pacific Society of Periodontology.
シンガポール

6 . 研究組織

(1)研究代表者

掛川 文子 (KAKEGAWA AYAKO)
鶴見大学・歯学部・学部助手
研究者番号：70514280

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし