

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09946

研究課題名(和文) EMD由来アミノ酸シーケンスを化学修飾したバイオアクティブインプラントの創製

研究課題名(英文) Creation of bioactive implants using chemically modified amino acid sequences from EMD

研究代表者

嘉藤 弘仁 (KATO, Hirohito)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70745348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は口腔インプラント治療におけるインプラント周囲の硬組織再生に有用な因子として、エムドゲイン(EMD)由来新規骨形成ペプチドに着目した。申請者らは純チタン表面にナノチューブ構造を析出させ、親水性を付与することで骨分化誘導を促進するナノ構造制御チタンシート(TNS)を開発した。そこで本研究では、インプラント埋入周囲組織の硬組織再生の方法として、EMD由来新規骨形成ペプチドをTNSに化学修飾することで、さらなる硬組織分化誘導を促進するバイオアクティブインプラント材料の開発を目指すことを目標に検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、骨量不足症例へのインプラント治療の応用が増加しており、インプラント周囲の骨造成に対する重要性が高まっている。しかし、移植骨が定着するまで4～6ヶ月かかることや、その術式の難易度も高いという課題があり、骨造成を伴うインプラント治療は長期間におよび、その予後は術者の技量にも左右されるという問題がある。そこで、申請者らが開発した骨形成能力をもつ新規骨形成ペプチドをTNSに化学修飾させることによって、早期のオッセオインテグレーションの確立による治療期間の短縮とインプラント周囲の骨形成量を増加させることが可能となり、インプラント治療の予後改善につながる事ができる。

研究成果の概要(英文)：This study focused on novel bone-forming peptides derived from emd-gain (EMD) as a useful factor for hard tissue regeneration around implants in oral implant therapy. The applicants developed a nanostructure-controlled titanium sheet (TNS) that promotes the induction of bone differentiation by depositing nanotube structures on the surface of pure titanium and providing hydrophilic properties. In this study, we investigated the chemical modification of TNS with novel osteogenic peptides derived from EMD as a method of hard tissue regeneration of the tissue surrounding implant placement, with the aim of developing bioactive implant materials.

研究分野：歯周病学

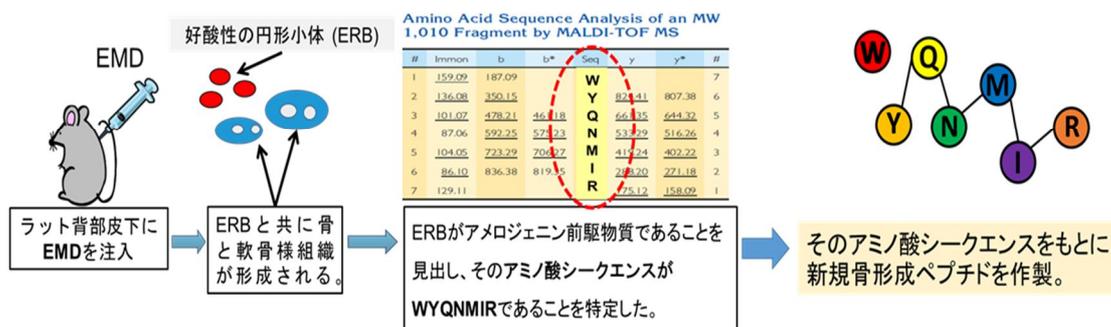
キーワード：アミノ酸 インプラント

1. 研究開始当初の背景

- (1) EMD は歯周組織の再生治療を目的に作製された製剤であり、現在に至るまで約 20 年間もの間、世界中で臨床応用されている。申請者らは EMD をラット背部皮下に注入すると、骨・軟骨様組織と好酸性の円形小体 (ERB) が形成されることを発見した。この ERB には 7 種のアミノ酸シーケンス (WYQNMIR) が含まれており、MALDI-TOFMS 解析から、そのアミノ酸配列はブタのアメロジェニン前駆物質であることを特定した。このアミノ酸シーケンスが硬組織形成を促進するのではないかと仮説を立て、硬組織形成を促進する新規骨形成ペプチドとして作製した。(図 1)

図 1

EMDの基礎研究から硬組織形成を促進するオリジナルペプチドの作製



- (2) 研究分担者である田口らは純チタン表面に濃アルカリ処理を施すことでナノチューブ構造を析出させ、チタン表面に親水性を付与することに成功した。このナノ構造制御チタンシート (TNS) は骨芽細胞のチタン表面への接着や硬組織分化を誘導する機能があり、ラット大腿骨に TNS を埋入するとチタンプレート周囲に著明な新生骨が形成され、高い骨接触率を示すことを明らかにした。
- (3) 申請者らが開発した骨形成能力をもつ新規骨形成ペプチドを TNS に化学修飾させることによって、早期のオッセオインテグレーションの確立による治療期間の短縮とインプラント周囲の骨形成量を増加させることが可能となり、インプラント治療の予後改善につながる可以考虑。

2. 研究の目的

- (1) 近年、骨量不足症例へのインプラント治療の応用が増加しており、インプラント周囲の骨造成に対する重要性が高まっている。しかし、移植骨が定着するまで 4~6 ヶ月かかることや、その術式の難易度も高いという課題があり、骨造成を伴うインプラント治療は長期間におよび、その予後は術者の技量にも左右されるという問題がある。
- (2) そこで、申請者らが開発した骨形成能力をもつ新規骨形成ペプチドを TNS に化学修飾させることによって、早期のオッセオインテグレーションの確立による治療期間の短縮とインプラント周囲の骨形成量を増加させることが可能となり、インプラント治療の予後改善につながる可以考虑。
- (3) また本研究で用いる化学修飾によるチタン表面改質は従来のコーティング法のデメリットであるコーティングの剥離や感染によるインプラント周囲炎を防ぐことができると想定される。
- (4) 本研究では EMD の基礎研究から得られたアミノ酸シーケンス (WYQNMIR) をもつ新規骨形成ペプチドをナノ構造制御チタンに化学修飾することによって、硬組織形成能を有するバイオアクティブインプラント材料となりうるのか、in vitro・in vivo 両面で

明らかにする。

3. 研究の方法

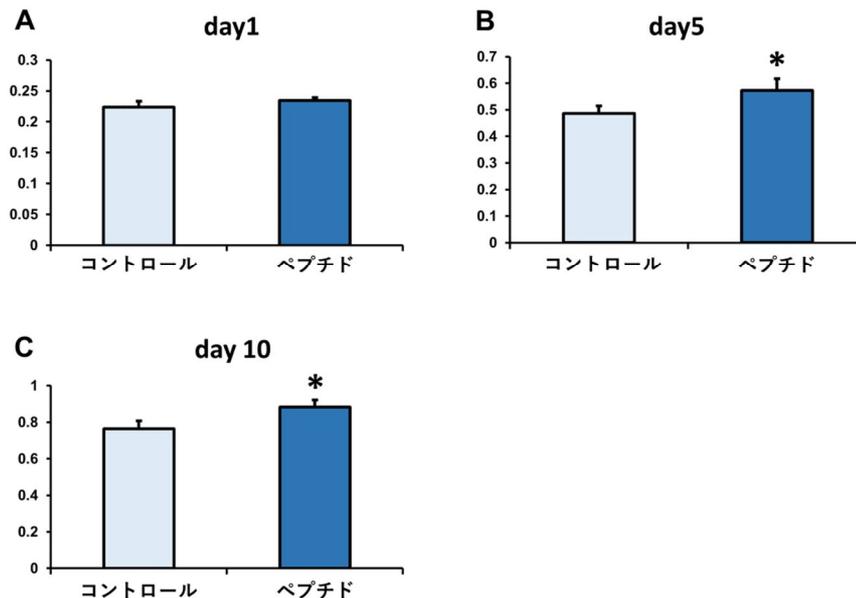
- (1) ナノ構造制御チタン(TNS)表面への新規骨形成ペプチド(EMD 由来アミノ酸シーケンス)の化学修飾の手法として、電気化学反応を応用して作製する。
- (2) *in vitro* での検討として、新規骨形成ペプチドでヒト骨髄間葉系幹細胞を刺激、培養し、硬組織形成能、骨形成に関連する mRNA 発現 (Real-time-PCR)、タンパク (ELISA 法) を検討することとする。
- (3) 実験群 (化学修飾した TNS) および対照群 (純チタン) を設定し、生後 8 週齢の SD 系ラット大腿骨に直径 1.3 mm のチタンスクリューを埋入する。屠殺 10 日前にカルセイン、3 日前にテトラサイクリンの腹腔内注射を行い生体染色による新生骨への蛍光色素沈着による新生骨形成率を評価する。
- (4) 埋入 8 週後に麻酔薬過剰投与により安楽死させ、大腿骨を摘出し組織を採取する。その後、固定・脱灰・包埋し、組織標本を作製する。動物実験で得られた組織標本から H-E 染色、ピラヌエバ骨染色、免疫染色 (オステオポンチン、オステオカルシン、型コラーゲン) を検討し、組織学的評価を行う。

4. 研究成果

- (1) 新規骨形成ペプチドによるヒト骨髄間葉系幹細胞の細胞増殖への影響

培養開始 1, 5, 10 日後において、ペプチド添加群で増殖能が有意に促進した。(図 2)

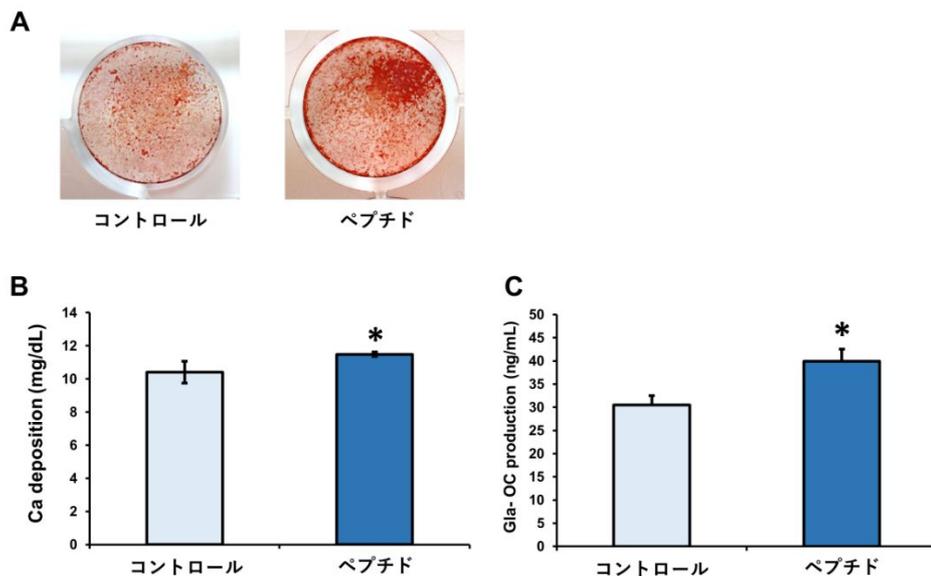
図 2 増殖試験



(2) 新規骨形成ペプチドによるヒト骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞分化能への影響

培養開始 1 4 日後において、ペプチド添加群で石灰化物形成が有意に促進した。またオステオカルシン産生量も有意に促進した。(図 3)

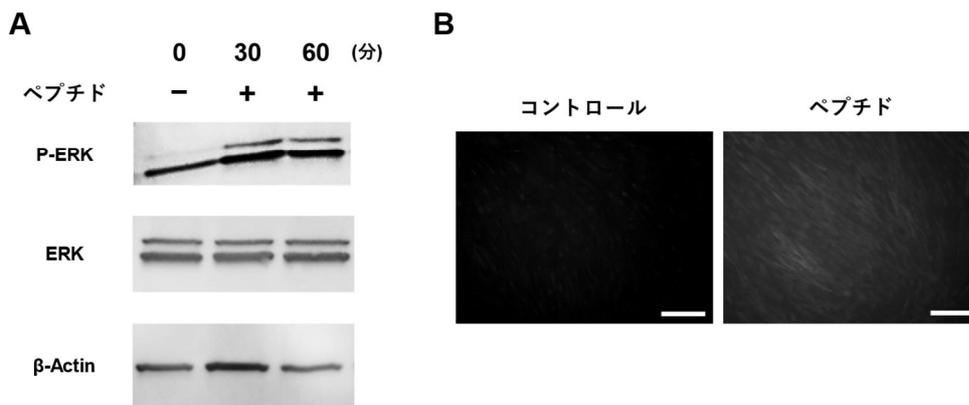
図 3 骨芽細胞分化能の評価



(3) 新規骨形成ペプチドによるヒト骨髄間葉系幹細胞の作用機序への影響に関する検討

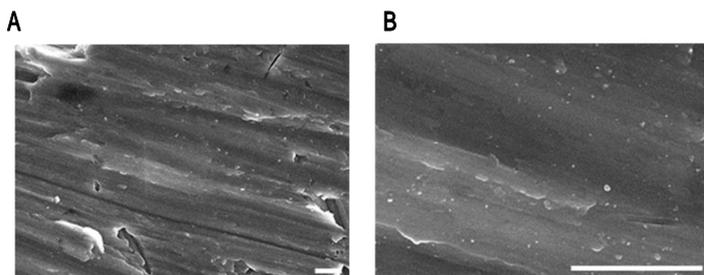
ペプチド刺激開始 30, 60 分後において、ペプチド添加群で ERK のリン酸化が促進することが明らかになった。(図 4)

図 4 作用機序の検討



(4) チタン表面の解析

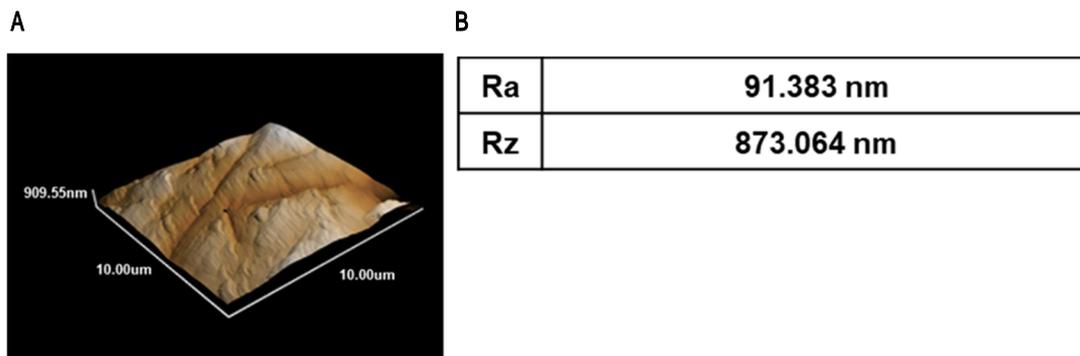
走査電子顕微鏡 (SEM) によるチタン表面の解析 (A: $\times 10,000$ B: $\times 50,000$)



(5) チタン表面構造の解析

(A) SPM による3次元構造解析

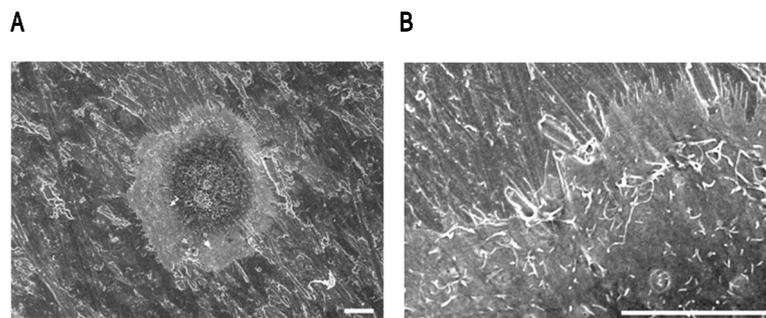
(B) SPM により算出された平均粗さ (Ra) と最大高さ粗さ (Rz)



(6) チタン表面への細胞接着試験 (歯肉上皮細胞)

細胞がチタン表面へ接着する機序の解析として、上皮細胞を用いた接着試験を行った。

(A: ×1,000 B: ×5,000)



本研究期間においては、チタン表面構造の観察技法とチタン表面への細胞接着試験の手法について検索を行った。今後、ペプチド修飾を施したチタンを動物組織に埋入する臨床モデル試験へ研究を進めていく予定である。

(研究成果のまとめ)

本研究から EMD 由来新規骨形成ペプチドはヒト間葉系幹細胞の増殖と骨芽細胞分化を促進することによって、インプラント治療における骨形成促進に寄与する可能性が示唆された。しかし、TNS への化学修飾の技術確立が困難であるため研究進捗が難航している。今後の展望として、化学修飾技術の安定化と動物実験による臨床モデル試験を実施し生体組織での組織反応を観察することによって、さらなる知見の蓄積を試みる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Li R, Kato H, Taguchi Y, Umeda M.	4. 巻 24
2. 論文標題 Intracellular glucose starvation affects gingival homeostasis and autophagy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 1230
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-05398-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Li R, Kato H, Taguchi Y, Deng X, Minagawa E, Nakata T, Umeda M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Glucose Starvation-Caused Oxidative Stress Induces Inflammation and Autophagy in Human Gingival Fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1907
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox11101907.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yi Chie Chen, Hirohito Kato, Yoichiro Taguchi, Daisuke Kimura, Takaya Nakata, Kazuya Tominaga, Makoto Umeda	4. 巻 55
2. 論文標題 Effects of amelogenin synthetic peptide on cell proliferation and cell adhesion in human periodontal ligament stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Osaka Dental University	6. 最初と最後の頁 219-224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.13039/501100001691	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yu Wei Tsai, Hirohito Kato, Yoichiro Taguchi, Kazutaka Imai, Kenjiro Kobuchi, Tsurayuki Takahashi, Makoto Umeda	4. 巻 55
2. 論文標題 Effects of high intensity red LED on hard tissue formation and expression of inflammatory cytokines in human bone marrow mesenchymal stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Osaka Dental University	6. 最初と最後の頁 225-230
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18905/jodu.55.2_225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Li R, Kato H, Nakata T, Yamawaki I, Yamauchi N, Imai K, Taguchi Y, Umeda M.	4. 巻 672
2. 論文標題 Essential amino acid starvation induces cell cycle arrest, autophagy, and inhibits osteogenic differentiation in murine osteoblast	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 168-176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.06.055.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中野裕司, 嘉藤弘仁, 田口洋一郎, 今井一貴, 中田貴也, 富永和也, 梅田 誠
2. 発表標題 ヒト歯髄幹細胞に対するエナメルマトリックスデリバティブ由来アメロジェニンペプチドの影響
3. 学会等名 第65回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鄧 信, 嘉藤弘仁, 田口洋一郎, 柏谷幸翔, 榎 にい菜, 津守紀昌, 梅田 誠
2. 発表標題 グルコース代謝由来の乳酸がヒト歯根膜幹細胞の硬組織分化に及ぼす影響
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 李 潤伯, 嘉藤 弘仁, 田口 洋一郎, 尾松 系樹, 皆川 咲佳, 万代 千晶, 彭 一豪, 今井 一貴, 山内 伸浩, 梅田 誠
2. 発表標題 細胞内グルコース飢餓によるヒト歯肉線維芽細胞の創傷治癒とストレスに及ぼす影響
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鄧 信, 嘉藤 弘仁, 田口 洋一郎, 中村 百合香, 秋本 秀樹, 神田 智子, 文元 智優, 水谷 翔, 吉村 公博, 梅田 誠
2. 発表標題 低グルコース環境がヒト歯根膜幹細胞の増殖と硬組織分化に及ぼす影響
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蔡 祐維, 嘉藤 弘仁, 田口 洋一郎, 今井 一貴, 小淵 健二郎, 高橋 貫之, 梅田 誠
2. 発表標題 ヒト骨髓間葉系幹細胞の硬組織形成と炎症性サイトカインの発現に対する高出力赤色LEDの影響
3. 学会等名 第64回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陳 怡潔, 嘉藤 弘仁, 田口 洋一郎, 木村 大輔, 中田 貴也, 富永和也, 梅田 誠
2. 発表標題 ヒト歯根膜幹細胞に対するアメロジェニンペプチドの増殖と接着への影響
3. 学会等名 第64回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	田口 洋一郎 (TAGUCHI Yoichiro) (60434792)	大阪歯科大学・歯学部・准教授 (34408)	

6. 研究組織（つづき）

	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	李 潤伯 (LI Runbo) (60984622)		
研究協力者	尾松 系樹 (OMATSU Keiju)		

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