

令和 5 年 10 月 29 日現在

機関番号：32650

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21076

研究課題名（和文）機能性モチーフ修飾自己組織化ペプチドハイドロゲルによる歯周組織再生の基礎的研究

研究課題名（英文）Fundamental study of periodontal tissue regeneration by functionalized designer self-assembling peptide hydrogels

研究代表者

松上 大亮（Matsugami, Daisuke）

東京歯科大学・歯学部・レジデント

研究者番号：00906381

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：in vivoではラット上顎臼歯近心に歯周組織欠損モデルを作成し、組織切片作製を中心に行った。

in vitroでは主に機能性モチーフのゲル内部への細胞遊走を中心に検討した。マウス前骨芽細胞はRADA16のゲル内部への侵入は認めず、PRGのゲル内部への侵入を認めた。また、機能性モチーフ修飾SAPハイドロゲルであるPRG群は、RADA16群と比較し、細胞接着や細胞増殖、基質石灰化に関連する28種類の遺伝子発現量が多い傾向を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、歯周組織欠損モデルにおける機能性モチーフ修飾自己組織化ペプチドハイドロゲルの応用が歯周組織の治癒に及ぼす影響を比較・検討した。今回の結果から、足場材料として機能性モチーフ修飾自己組織化ペプチドハイドロゲルが歯周組織の治癒において機能すると考えられた。本研究で得られた知見を基に、さらに効率的な歯周組織再生療法が確立されれば重篤な歯周組織に対する治療選択の幅を広げることができると思われる。

研究成果の概要（英文）：In vivo, we created a periodontal tissue defect model in the mesial region of a rat maxillary molar, and mainly performed tissue sectioning.

In vitro, we mainly investigated the cell migration into the gel of the functional motif. There were significant cell migrations into the functionalized peptide PRG.

In addition, the PRG group, which is a functional motif-modified SAP hydrogel, tended to have higher expression levels of 28 genes involved in cell adhesion, cell proliferation, and matrix mineralization compared to the RADA16 group.

研究分野：医師薬学

キーワード：自己組織化ペプチドハイドロゲル PRG RADA16

1. 研究開始当初の背景

優れた生体材料である SAP ハイドロゲル: 必須アミノ酸で構成される SAP ハイドロゲル (RADA16) は, 天然の細胞外マトリックス (ECM) に近い特性に加え, ナノ構造を有しており, 細胞の増殖と移動を促進する 3 次元的足場材料として注目されている (Zhang S et al., Biomaterials 1995)。RADA16 は宿主細胞の分化, 遊走を促進する良好な微小環境を提供し, マウス頭蓋骨などの生体組織修復に効果的であるとされている (Bradshaw M et al., Sci Rep 2014; Misawa H et al., Cell Transplant 2006)。我々は, ラットの歯周組織欠損モデルに RADA16 を応用し, 歯周組織治癒を促進することを世界に先駆けて報告したが (Takeuchi T et al., J Clin Periodontol 2016), RADA16 をペプチド修飾することにより, さらに効果的な組織修復法の開発ができないか検討する必要があると考えた。

ペプチド修飾による RADA16 の機能向上: 細胞付着の重要な結合配列であるアルギニン-グリシル-アスパラギン酸 (RGD) は, インテグリンと特異的に作用する。RGD 含有ペプチドは, 細胞の付着, 増殖, 骨芽細胞の分化と石灰化を促進する (Mota A et al., Cell J 2014)。また, ラミニンは, 主に細胞接着機能を調節する基底膜に局在する ECM タンパク質であり, 細胞接着活性部位 (YIGSR: Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) を有し (Murata J et al., Int J Biol Macromol 1989), その YIGSR を含有したペプチドは I 型コラーゲンの合成を促進することが報告されている (Yoon JH et al., Biochem Biophys Res Commun 2012)。これらの背景に基づき, 申請者は RADA16 に機能性モチーフである RGD を修飾した PRG, およびラミニンを修飾した PDS に着目し, ラット歯周組織欠損モデルに PRG と PDS を応用し, (1) 治癒に及ぼす影響に関する形態学的, 組織学的, 免疫組織学的解析と, (2) 歯根膜由来細胞の増殖および形態に関する in vitro 解析の結果を報告した (Matsugami D et al., J Periodontal Res 2021)。申請者はこれまでの研究で以下の点を明らかにした。PRG および PDS は RADA16 と比較し, PCNA, VEGF, α -SMA 陽性細胞および新生骨の形成量を有意に増加させた。PRG は RADA16 および PDS と比較し, 歯根膜由来細胞の増殖や細胞突起の伸長を促進させた。このように申請者らは, 機能性モチーフ修飾 SAP ハイドロゲル, 特に PRG が細胞増殖と血管新生に有利な場を形成することで歯周組織治癒を促進することを初めて見出した。しかし, 以下の 3 点が未だ不明である。

RADA16 に修飾されている機能性モチーフが細胞接着に及ぼす影響

細胞のゲル内部への侵入と血管新生の関連

機能性モチーフの足場としての効果が骨芽細胞分化と新生骨形成に及ぼす影響

2. 研究の目的

本研究では, 付与された機能性モチーフが細胞接着, 各種細胞の分化および血管新生を促進するメカニズムを解析し, 歯周組織治癒促進を分子レベルで明らかにすることを目的として実験を行った。

3. 研究の方法

In vivo においてはラット上顎第一臼歯近心に歯周組織欠損を作成後，RADA16，PRG，PDS を応用する。術後 1，3，7 日で安楽死させ，検体を採取し，組織切片を作製し，欠損内の組織 ゲルの接触面の接着について，免疫組織化学的に Integlin 5 および 3 の発現局在を観察・評価する。また，術後 2 週にて新生歯周組織を採取し，Osteogenesis に焦点を当て，PCR array を行う。

In vitro においてはラット歯根膜由来細胞 (rPDL cells) をラット切歯から分離・培養する。ゲル上に rPDL cells およびマウス全骨芽細胞 (MC3T3-E1) を播種し 5 時間，3，7 日のタイムポイントで CLSM にて Phalloidin，DAPI を用い各ゲル内への遊走，侵入状態を評価する。

また，96well プレートに RADA16，PRG，PDS を注入し，両細胞をそれぞれ播種する。0，3，7 日のタイムポイントでサンプルを採取し，PCR array にて特異的な発現変化を示した骨形成関連遺伝子の抽出および接着関連遺伝子である Integlin 5 および 3 をリアルタイム PCR にて定量解析を行う。

4. 研究成果

1) Rat osteogenesis の網羅的遺伝子発現解析 (RT² Profiler PCR Array Rat osteogenesis (PARN-026Z))

術後 2 週において RADA16 群では Unfilled 群と比較して *Alpl*, *Bmp5*, *Csf2*, *Fgfr2*, *Gdf10*, *Mmp8*, *Vegfb* などの骨形成や成長因子，血管新生に関与する 7 遺伝子の発現上昇 (> 3.5 fold) を認めた (図 1)。

PRG 群では Unfilled 群と比較して，*Alpl*, *Bglap*, *Bmp2,3,5,6,7*, *Bmpr1a,b*, *Chrd*, *Col10a1*, *col2a1*, *Comp*, *Csf2,3*, *Dlx5*, *Egf*, *Fgf1,2*, *Fgfr2*, *Flt1*, *Gdf10*, *Gli1*, *Igf1r*, *Itga2,3*, *Mmp10,8,9*, *Nog*, *Pdgfa*, *Runx2*, *Smad1,2,3,5*, *Sost*, *Sox9*, *Sp7*, *Tgfb3*, *Tgfr3*, *Tnf*, *Vdr*, *Vegfb* などの骨形成や成長因子，細胞接着，血管新生に関与する 44 遺伝子の発現上昇 (≥ 3.5 fold) を認めた (図 2)。

PDS 群では Unfilled 群と比較して，骨形成や細胞接着，血管新生に関与する遺伝子の発現 (> 3.5 fold) は認められなかった (図 3)。

図 1. RADA16 の骨形成関連 84 遺伝子発現プロファイル

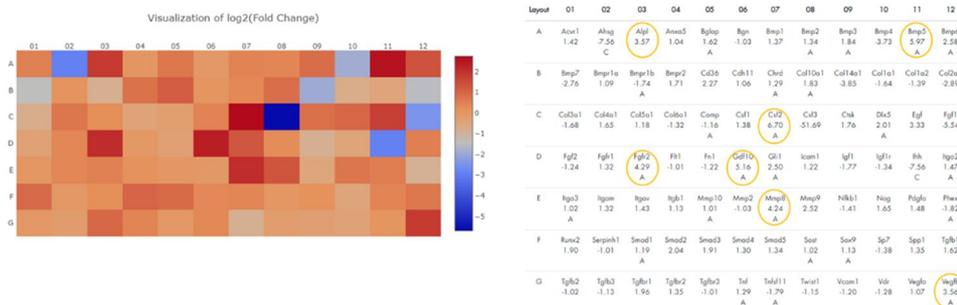


図 2. PRG の骨形成関連 84 遺伝子発現プロファイル

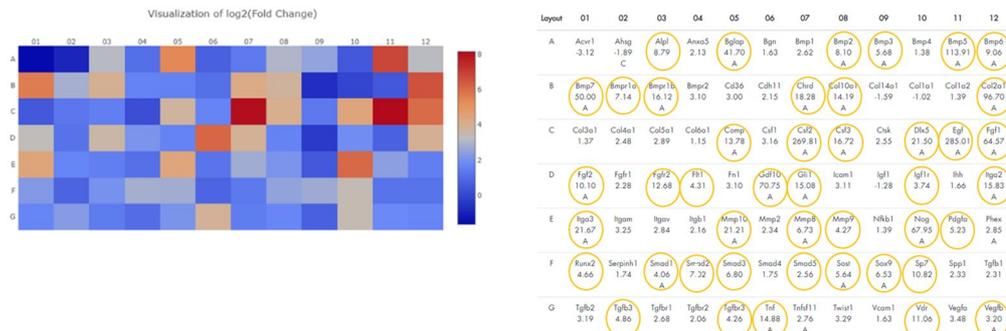
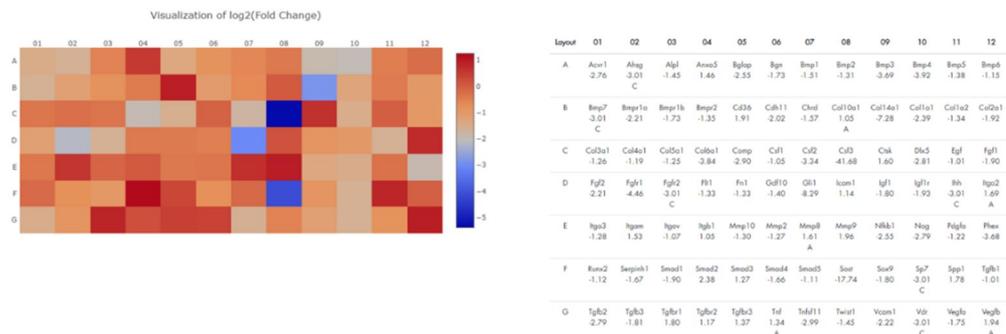


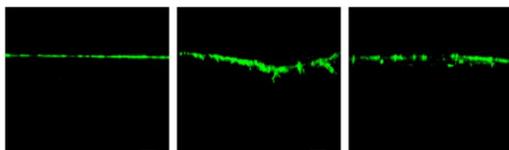
図 3. PDS の骨形成関連 84 遺伝子発現プロファイル



2) rPDL ゲル内への遊走・侵入

培養 7 日において，PRG のみ細胞侵入が認められた(図 4)。

図 4. CLSM × 100 bar=100



本研究の結果から PRG は骨形成や成長因子，細胞接着，血管新生への遺伝子発現上昇に加え，ゲル内への細胞侵入を認めた。以上より，足場材料としての PRG の細胞成長に有益な環境を呈していることが考えられた。

今後，両細胞の比較，組織 ゲルの接触面の接着について，免疫組織化学的に検索し，また，リアルタイム PCR にて，さらなる遺伝子発現解析を検討していく。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------