

令和 5 年 4 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21089

研究課題名(和文) アメロジェニンとテプレノンの相乗的治癒促進効果の機序の解明と応用

研究課題名(英文) Elucidation and application of the mechanism of synergistic healing-promoting effects of amelogenin and teprenone.

研究代表者

大和 寛明 (Yamato, Hiroaki)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：50906336

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)：歯根膜細胞をテプレノンにて刺激したところ、血管新生作用のあるangpt14と上皮細胞成長因子ファミリーの一つであるアンフィレグリンの分泌が確認された。さらに、テプレノン単体刺激群と比較してテプレノン+アメロジェニン複合刺激群において、血管新生誘導因子であるIL-8、MCP-1、IL-6の産生が確認され、その分泌亢進によりヒト臍帯静脈内皮細胞の管腔形成が誘導された。つまり、テプレノンとアメロジェニンの複合刺激は歯根膜遊走を強力に促進し、さらに創傷治癒・血管新生を誘導する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりテプレノン・アメロジェニンによる組織再生のメカニズムが証明されることで、安価かつ安全な歯周組織再生薬によって医療福祉政策に大きく貢献する。さらに、血管新生薬や治癒促進剤等として医科領域まで適応範囲を広げることができれば、医療費の抑制にも繋がる。実際に、アメロジェニンは褥瘡性潰瘍治療薬(Xelma)として既に用いられているが、テプレノンによる増強作用が証明されれば、これにとって代わる難治性潰瘍治療薬となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：When periodontal ligament cells were stimulated with teprenone, the secretion of angpt14 which has angiogenic activity, and amphiregulin which is a member of the epidermal growth factor family was confirmed. In addition, the production of IL-8, MCP-1, and IL-6, which are angiogenesis-inducing factors, was confirmed in the teprenone + amelogenin combination stimulation group compared with the teprenone single stimulation group. tube formation was induced. In other words, it was suggested that combined stimulation of teprenone and amelogenin strongly promotes periodontal ligament migration, and further induces wound healing and angiogenesis.

研究分野：歯周病学分野

キーワード：アメロジェニン テプレノン GRP78 血管新生 創傷治癒

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

先行研究でアメロジェニン(rM180)が熱ショック蛋白質である glucose-related protein 78 (GRP78) と直接結合することを発見し、GRP78 を強発現させた歯根膜細胞株を rM180 で刺激すると細胞遊走が著しく亢進することを報告した。一方、ゲラニルゲラニルアセトン(GGA)は熱ショック蛋白質を誘導する胃粘膜保護薬である。本研究では、GGA による GRP78 の強発現とアメロジェニンが歯根膜機能に相乗的に作用すると考え、ヒト初代培養歯根膜細胞(hPDLCs)を用いてこれら複合刺激が歯周組織再生に応用可能かを検討した。

GRP78 は Hsp70 ファミリーの一つのタンパク質で小胞体ストレス応答に関連することが判明している。一方、ゲラニルゲラニルアセトンはテプレノンという名で知られている。これは非常に安全性の高い薬剤であり、胃炎や胃潰瘍の治療にすでに幅広く使用されている。

過去の報告より、ゲラニルゲラニルアセトン以下 GGA は、胃粘膜細胞における HSP70 の C 末端に直接結合することにより、胃粘膜細胞における HSP70 のシャペロン活性を不活性化し、これに応答して、ヒートショック転写因子-1 が細胞内で亢進され、HSP70 の活性を誘導させることが報告されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、ゲラニルゲラニルアセトン GGA、いわゆるテプレノンが GRP78 を誘導する薬剤であることに着目した。この GRP78 の誘導が歯根膜に好影響を与えると考え、GGA 単体または GGA とアメロジェニンの組み合わせが細胞移動、細胞増殖、創傷治癒などに相乗効果を発揮するのではないかと仮説を立て、プライマリーの歯根膜細胞を用いた *in vitro* の系でその可能性を検証した。

### 3. 研究の方法

ヒト歯根膜細胞において、200 $\mu$ M の GGA 刺激による Grp78 の発現の時間経過を調べた。リアルタイム PCR 法での結果、GRP78 遺伝子の発現は 15 時間後に最も強く誘導されたため、GRP78 タンパク質の発現時間経過をウエスタンブロット法にて検討した。GGA 刺激後 18 時間以降で Grp78 タンパク質の発現が強く誘導された。

GGA 刺激の 18 時間後に GRP78 タンパク質の発現が確認されたことを踏まえ、この時点で培地を交換し、PBS で細胞を洗浄した後、アメロジェニン刺激を開始した。同様に、他の処理群においても、各刺激の 18 時間後に培地を交換し、それぞれの単独処理群に各々刺激を添加して、条件を統一し、その後細胞機能を解析した。

### 4. 研究成果

初めに、各刺激群における細胞増殖活性を WST-8 アッセイで測定した。その結果、両群間に増殖能の有意差は認められなかった。

次に、各刺激群で歯根膜細胞の骨形成能をリアルタイム PCR にて調べた。その結果、骨シアルタンパクやオステオカルシンの遺伝子発現には変化は認められなかったが、GGA 処理群では、1 型コラーゲン、アルカリホスファターゼ、またこれらの上流に当たる転写因子である、Runx2 遺伝子の発現が対照群と比較して有意に低下することが明らかになった。また歯根膜細胞を 21 日間培養したアリザリン染色による結果もこれらの現象と沿うように GGA 刺激関連群で石灰化結節を抑制していることが明らかになった。

GGA 単独で刺激した細胞では、刺激していない細胞群と比較して有意に遊走能が亢進した。さらに、刺激後 36 時間後に GGA+アメロジェニンで刺激した細胞では、GGA 単独で刺激した細胞と比較して、より遊走能が確認されました。GGA とアメロジェニンが細胞遊走において相乗的な効果を示したことが示唆された。

次に、これまでに観察された現象に関わる遺伝子、GGA を加えた際に GRP78 以外で発現が上昇する遺伝子群を特定するために、マイクロアレイ解析を行なった。18 種類の遺伝子が抽出され、そのうち Angptl4 とアンフィレグリンの 2 つの遺伝子に着目した。Angptl4 は血管新生や創傷治癒に関与していると報告されている。アンフィレグリンは内皮成長因子受容体リガンドであるサイトカインであり、血管新生を刺激し、組織修復に関与していると言われている。

GGA 刺激で遺伝子高発現であったこの 2 つの分子が実際にタンパク質レベルで発現するかを確認した結果、angptl4 は GRP78 が強発現する 18 時間の時点で GGA 刺激によってタンパク

質発現の増強が認められた。一方、アンフィレグリンも同様に無刺激群と比べて GGA 刺激群で産生の増強が確認できた。次に GRP78 との関連を検討するにあたり、GRP78 強発現ベクターと GRP78RNA 干渉によるトランスフェクションでのタンパク質発現の増減を確認した。ポジティブコントロール、ネガティブコントロールいずれも問題がないことを確認した上で、これらの遺伝子群の発現と GRP78 との関連を調べた。過剰発現された Grp78 発現により、Angptl4 およびアンフィレグリンの発現量を増加させた。反対に、Grp78 のノックダウンでは Angptl4 とアンフィレグリンの両方の発現を有意に抑制した。以上のことから、GGA 刺激による GRP78 の高発現が起点となり、angptl4 とアンフィレグリンの産生を増加させる可能性が示された。

過去の文献より Angptl4 や areg を発現させる因子には以下のような報告がある。Angptl4 は低酸素環境下により更新するとされている PPAR ピーパーや HIF1a などにより誘導されるといわれている。またアンフィレグリンはやプロテインキナーゼ a、CREB のリン酸化より誘導されるという報告もある。そこでまた、Angptl4 の発現誘導には、低酸素誘導因子 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) と PPAR の活性を介している可能性が過去に報告されている。HIF-1 $\alpha$  と PPAR $\delta$  は共に Angptl4 を活性化し、血管新生に関与しているとされている。そこで、GGA によって発現誘導された HIF-1 $\alpha$  と PPAR 高発現が GRP78 によって媒介されているかどうかを調べるために、再び Grp78 強発現プラスミドおよび GRP78siRNA を用いた。GRP78 を抑制すると、GGA によって誘導された HIF-1 $\alpha$  および PPAR $\delta$  の発現が減少したのに対し、Grp78 の過剰発現は hPDLC において GGA 刺激なしで HIF-1 $\alpha$  および PPAR $\delta$  を強く促進した。一方でアンフィレグリンの産生は、CREB と PKA のリン酸化によって活性化されることが報告されている。先ほどの結果と同様に、CREB と PKA のリン酸化は Grp78 強発現プラスミドを導入した細胞では増加し、GRP78siRNA を導入した細胞では減少していることが判明した。

まとめると、GGA 刺激による Grp78 の高発現は、HIF-1 $\alpha$  や PPAR $\delta$  の活性化、CREB や PKA のリン酸化を介して Angptl4 や Areg の産生を誘導することが明らかになった。

次に GGA のみで刺激した群と GGA+rM180 で刺激した群での hPDLC の上昇発現遺伝子を比較するために、再びマイクロアレイ解析を行なった。その結果、22 種類の遺伝子が抽出され、血管新生活性を示すことで知られるサイトカイン IL-8、MCP-1、IL-6 に着目した。タンパク質分泌能を ELISA にて検証したところ、アメロジェニン刺激後 30~42 時間では、アメロジェニン単独刺激でもサイトカインの分泌の亢進を認めたが、GGA+アメロジェニン複合刺激群でさらなる分泌亢進を認めた。

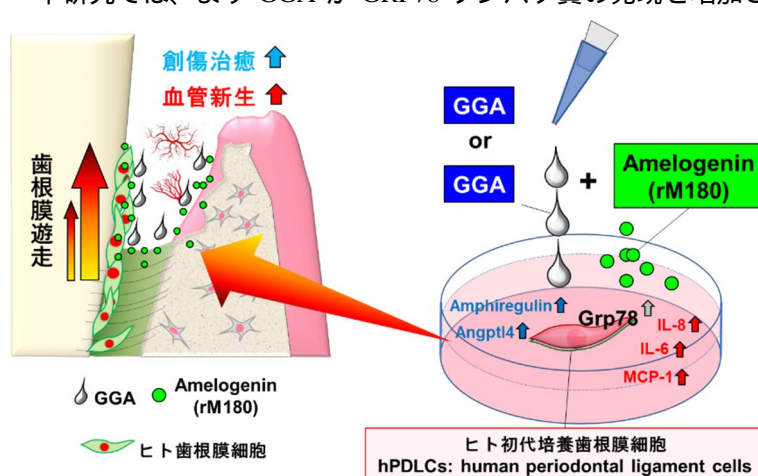
さらに、これまでに確認された因子が実際に管腔形成に関わるかを検討した。GGA または rM180、GGA+アメロジェニン刺激下で培養した歯根膜細胞の培養上清は GGA+アメロジェニン群で最も顕著に HUVEC の管腔形成能を促進させた。ケモカインが管腔形成にどの程度関わっているかを検証するため、培養上清にアンフィレグリン、IL-8、MCP-1、IL-6 に対する中和抗体を添加したところ、血管新生は完全ではないが有意に抑制された。

つまり、GGA、アメロジェニン、GGA+アメロジェニン刺激で産生されたサイトカインによって、血管新生が部分的に誘導されることを示唆している。

以上のことから、以下の結果が導き出された。

1. ヒト歯根膜細胞において GGA 刺激後 15 時間で GRP78 の遺伝子発現が、また 18 時間でタンパク質発現が最も強く誘導された。
2. GGA 刺激は歯根膜細胞の増殖能に影響を与えないが、骨分化能を抑制させた。一方で、細胞遊走能は有意に促進され、GGA+rM180 刺激ではさらに増強された。
3. GGA 刺激による GRP78 の強発現が起点となり HIF-1 $\alpha$  や PPAR $\delta$  の発現の亢進により Angptl4 の発現が、また、PKA と CREB のリン酸化の亢進によりアンフィレグリンの産生が促進された。
4. GGA 刺激後にアメロジェニンを追加すると、IL-8、MCP-1 および IL-6 の産生が誘導され、それらサイトカインの分泌亢進によると考えられるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の管腔形成が誘導された。

本研究では、まず GGA が GRP78 タンパク質の発現を増加させ、細胞の遊走を促進することを明らかにした。



を明らかにした。マイクロアレイ解析の結果、GGA による GRP78 発現が起点となり、血管新生や創傷治癒に関与する angptl4 とアンフィレグリンの産生が HIF1a や PPAR の発現、CREB や PKA のリン酸化を介して促進することが明らかになった。さらに、アメロジェニンは、GRP78 と会合することにより、hPDLCs 細胞遊走能をさらに亢進させた。また GRP78 とアメロジェニンとの結合は、血管新生誘導因子として知られている IL-8、

MCP-1、IL-6 の産生を促進させ、HUVEC の管腔形成を促進させた。

今回の *in vitro* の結果から、ヒト歯根膜において GGA は GRP78 の発現を増強し、細胞遊走を亢進させることが示唆された。また、GGA 刺激による GRP78 の強発現が起点となり *angptl4* やアンフィレグリンの産生が促進されることを見出しました。さらに、アメロジェニンが添加されると歯根膜の遊走がさらに活性化を増すのと同時に IL-8 や IL-6、MCP-1 による強力な血管新生が誘導される可能性が示唆された。

臨床応用に向けて、GGA とアメロジェニンの複合刺激は創傷治癒に適した環境を創出する可能性があることから、新しい歯周組織再生療法の開発に対して一助を担うことが期待される(図参照)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamato H, Sanui T, Yotsumoto K, Nakao Y, Watanabe Y, Hayashi C, Aihara R, Iwashita M, Tanaka U, Taketomi T, Fukuda T, Nishimura F.	4. 巻 122(7)
2. 論文標題 Combined application of geranylgeranylacetone and amelogenin promotes angiogenesis and wound healing in human periodontal ligament cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cell Biochem	6. 最初と最後の頁 716-730
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcb.29903.	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 該当する

1. 著者名 Nakao Y, Fukuda T, Zhang Q, Sanui T, Shinjo T, Kou X, Chen C, Liu D, Watanabe Y, Hayashi C, Yamato H, Yotsumoto K, Tanaka T, Taketomi T, Uchiumi T, Le Anh D, Shi S, Nishimura F.	4. 巻 122
2. 論文標題 Exosomes from TNF- $\alpha$ -treated human gingiva-derived MSCs enhance M2 macrophage polarization and inhibit periodontal bone loss.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Biomater	6. 最初と最後の頁 306-324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2020.12.046.	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 該当する

1. 著者名 Hayashi M, Iwashita M, Nishimura Y, Shinjo T, Sano T, Yamashita A, Fukuda T, Sanui T, Asano T, Nishimura F.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Adipose-specific C-C motif chemokine ligand (CCL) 19 overexpression drives the mice to both insulin resistance and weight gain.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Res Care	6. 最初と最後の頁 e001871.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bmjdr-2020-001871.	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 林千華子、福田隆男、渡邊ゆかり、川上賢太郎、豊田真頭、中尾雄紀、四本かれん、大和寛明、新城尊徳、讃井彰一、西村英紀。
2. 発表標題 歯肉幹細胞由来エクソソーム内包miR-1260bによる小胞体ストレス応答制御を介した抗炎症作用。
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 大和寛明、讃井彰一、四本かれん、中尾雄紀、渡邊ゆかり、林千華子、相原良亮、岩下未咲、田中麗、福田隆男、西村英紀
2. 発表標題 ガラニルゲラニルアセトンとアメロジェニンの歯周組織再生への複合的効果
3. 学会等名 2021年度日本歯科保存学会春季学術大会(第154回)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林千華子、福田隆男、渡邊ゆかり、川上賢太郎、豊田真顕、中尾雄紀、四本かれん、大和寛明、新城尊徳、讃井彰一、西村英紀.
2. 発表標題 歯肉幹細胞由来エクソソーム内包miR-1260bによる小胞体ストレス応答制御を介した歯槽骨吸収抑制作用.
3. 学会等名 2021年度日本歯科保存学会秋季学術大会(第155回)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Nakao, Yukari Watanabe, Chikako Hayashi, Hiroaki Yamato, Karen Yotsumoto, Terukazu Sanui, Takanori Shinjo, Takao Fukuda, Fusanori Nishimura.
2. 発表標題 Exosomes from TNF- $\alpha$ -treated human gingiva-derived MSCs enhance M2 macrophage polarization and inhibit periodontal bone loss.
3. 学会等名 Kyudai Oral Bioscience & OBT Research Center 5th Joint International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chikako Hayashi, Takao Fukuda, Yukari Watanabe, Kentaro Kawakami, Masaaki Toyoda, Yuki Nakao, Karen Yotsumoto, Hiroaki Yamato, Takanori Shinjo, Terukazu Sanui, Fusanori Nishimura
2. 発表標題 Exosomal miR-1260b derived from TNF- $\alpha$ -treated hGMSCs inhibits periodontal bone loss by targeting ATF6 $\beta$ -mediated regulation of ER stress.
3. 学会等名 Kyudai Oral Bioscience & OBT Research Center 5th Joint International Symposium (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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