

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592324

研究課題名（和文） 新規合成ペプチドを用いた歯槽骨再生誘導治療戦略の構築

研究課題名（英文） Foundation of alveolar bone regenerative therapy strategy used new synthetic peptide

研究代表者

上田 雅俊（UEDA MASATOSHI）

大阪歯科大学・歯学部・名誉教授

研究者番号：00067117

研究成果の概要（和文）：

幼若ブタの歯胚から抽出されたエムドゲイン®は臨床応用されているが、生物由来のため患者からの拒否感も強く、生物に由来しない合成ペプチドの開発が望まれる。本研究では、新規合成ペプチドの至適濃度を策定し硬組織誘導能を明らかにすることである。

合成ペプチドの各細胞に対する影響は、細胞増殖、接着および遊走について検討し至適条件を策定した。その合成ペプチドを歯根膜細胞、骨髄細胞に応用し、ALP 活性、オステオカルシンの産生量、カルシウムの析出量などの硬組織誘導能について検討した。

実験の結果、合成ペプチドに対する各細胞の細胞増殖、接着および遊走は濃度依存的に比例しているのではなく、至適濃度が存在し、歯根膜細胞、骨髄細胞に応用すると硬組織への誘導を促進するものと示唆された。

研究成果の概要（英文）：

One method of treating periodontitis is to use Emdogain®, a material derived from the tooth germ of juvenile swine that promotes periodontal tissue regeneration, including the formation of hard tissue as cementum, alveolar bone. The use of Emdogain® is therefore established in the field of periodontal regenerative therapy. However, because of its swine origin, some patients choose not to be treated with Emdogain®. The active component of Emdogain® has been shown to be a peptide whose sequence corresponds to an amelogenin II precursor. As such, this peptide may function as a growth factor to stimulate cell differentiation and tissue regeneration. In this study, we characterized the effects of the synthetic Emdogain®-derived peptide on the proliferation, adhesion, migration and differentiation of periodontal ligament fibroblasts (HPdLFs), which display properties similar to mesenchymal stem cells, and Sprague-Dawley rat bone marrow (RBM) cells. Compared to cells not treated with the synthetic Emdogain®-derived peptide, treated cells showed increased proliferation, initial adhesion, and chemotactic activity. The optimum peptide concentration that stimulated these activities was determined to be 100 ng/ml. We next investigated the effects of the peptide at a concentration of 100 ng/ml on osteogenesis and cementogenesis in HPdLF cells by assaying alkaline phosphatase activity, osteocalcin production, and mineralization. Taken together, our data suggest that the Emdogain®-derived peptide stimulates periodontal hard tissue regeneration by stimulating the proliferation, adhesion, and migration of mesenchymal stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：エナメル基質タンパク・歯根膜細胞・歯周組織再生

1. 研究開始当初の背景

研究分担者の田中昭男・富永和也らは、旧タイプの EMD をラット背部皮下に注射して、好酸性の円形小体と軟骨様組織の形成を確認している。その円形小体を MALDI-TOF 解析で得たフラグメント中に同じ7種のアミノ酸シーケンスである WYQNML(I)R を含んでいることを見出し、データベース解析でウシのアメロジェニンⅡ前駆物質（LがIの場合、ブタのアメロジェニン前駆物質）であることを確認している。（*J Periodontol* 2005;76;1934-1941）また、そのシーケンスを元にペプチドを合成し、ラット背部皮下に接種したところ、2週程度で骨、軟骨、および軟骨内骨化が認められ、硬組織の誘導能があることを示唆している。（平成20年第51回日本歯周病学会春季学術大会にて発表）すなわち、この新規合成ペプチドを細胞分化を司る「増殖因子」としての機能を有している可能性があり、*in vitro*・*in vivo* 両面からの検索が必須である。また、田中昭男らのグループが、新規合成ペプチドを単独で用いることによる *in vivo* での歯周組織再生について現在検索中である。

エムドゲイン®（エムドゲイン®ゲル、以下エムドゲインと略す）が発売されてから約10年が経過し臨床成果が散見され始めている。欧米での臨床報告では、エムドゲイン単独応用と自家骨移植との併用療法との比較において有意に併用療法のほうが臨床的改善が認められるとの報告がある。（*J Periodontol* 2007;78;231-238, *J Clin Periodontol* 2006;33;69-75）自家骨には Tissue engineering の概念から考えると「細胞」と「足場」の両機能が期待される。

臨床的見地からは「細胞」は皮質骨直下に未分化間葉系幹細胞（MSC）が存在しトルフィンバーやボーンスクレーパーで自家骨を採取することによって得られる。「足場」の機能は実質的なスペースメイキングと増殖因子のキャリアー、そして「骨形成能」「骨誘導能」の有する移植材料として活用できるのは周知の事実である。その観点から、歯周組織の再生、特に歯槽骨の再生にはやはり再生の3つの輪を充実させるのが必要不可欠ではないかと考えられる。

そこで今回、合成した新規ペプチドと骨髄からの未分化間葉系幹細胞の併用療法を確立すべく、*in vitro*・*in vivo* 両面から基礎研究を立案した。

新規リコンビナントペプチドの「増殖因子」としての硬組織分化誘導能を *in vitro* から

検索し、新規リコンビナントペプチドと骨髄からの MSC を併用して生体内に应用することによる組織反応について免疫組織化学的に検索することとした。

2. 研究の目的

本研究の明らかにする課題については主に2つに分類される。

(1) 新規合成ペプチドの「増殖因子」としての硬組織分化誘導能の *in vitro* による検索

(2) 新規合成ペプチドと骨髄からの MSC を併用して生体内に应用することによる組織反応

(1) については未分化間葉系幹細胞が骨芽細胞へと分化する過程、特に新規合成ペプチドの至適濃度を確認する。細胞の増殖と分化という相反する事象の中で至適濃度は進めていく研究計画の中で非常に重要な位置づけである。市販されている EMD や臨床応用されている PRP においても MSC の増殖と分化の中で至適濃度について興味深い知見が報告されている。（*J Periodontol* 2007;78;2190-2196, *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33:60-70）

(2) については歯周組織欠損に対する再生を検証する前段階となる基礎研究である。今回の新規合成ペプチドに関しても、市販されている EMD の生体の反応から得られたものであり、非常に重要な研究行程であると考えている。なお、新規リコンビナントペプチド単独での生体内への移植についての成果の一部は前頁に示すとおり報告しているが、細胞と同時の移植についての *in vivo* での検索そして細胞分化程度による移植時期について免疫組織化学的に明らかにしたいと考えている。

3. 研究の方法

平成22年度は新規合成ペプチドの MSC に対する骨分化能を中心として *in vitro* による検索を中心に網羅的に行なう。平成23、24年度は平成22年度分での *in vitro* による検索の再検討と生体内での反応、*in vivo* による検索を各種染色法を用いて行う。

新規合成ペプチドの数種類の濃度と同時に、過去の報告で骨分化誘導が認められている β -glycerophosphate と ascorvin acid と dexamethasone 含有の場合との比較を元に細胞増殖能・ALP 活性・骨芽細胞の分化への方向性を制御する転写因子である Cbfa1 を指標に新規合成ペプチドの MSC に対する至適濃度を絞り込んだ上での解析を予定している。また同時に培養上清に含まれる骨分化誘導を示すタンパクの ELISA 法による検索を行う。

実験動物には免疫反応がない Sprague-Dawley 系ラットを用いて行い、*in vivo*での組織反応の観察の際に過去の標本と比較できるように行う。

4. 研究成果

市販の歯根膜線維芽細胞と生後7週齢のSD系雄性ラットの両側大腿骨から骨髓細胞を採取し実験に供した。細胞増殖・接着・遊走については5種の濃度で測定し至適条件を策定した。その至適濃度の合成ペプチドを培地に懸濁させ骨髓細胞に応用した。対照として合成ペプチドを含まない培地を用い2週応用後のALP活性をELISA法で測定した。また合成ペプチド1, 3日応用後のTotal RNAを回収し、Real-time PCR法を用いてRunx2 mRNAの発現を測定し、硬組織誘導能について検討した。

歯根膜線維芽細胞と骨髓細胞共に、5種の濃度のうち細胞増殖、接着および遊走能は100 ng/mLの合成ペプチドの刺激時に最も高い値を示し、その濃度が至適でありまた、2週応用後の実験群のALP活性の発現も対照群と比較して有意に高かった。合成ペプチド1, 3日応用後のRunx2 mRNAの発現は3日の方が有意に高かった。

*in vivo*における検索では、1.5%プロピレングリコールアルジネート溶液で合成ペプチドを15.0mg/mLの濃度に調整しSD系ラットの上顎第一大臼歯欠損部に貼付し7, 14日後の歯周組織を採取し切片を作製しHE染色、トルイジンブルー染色、PAS染色、マッソン・トリクローム染色の各染色と抗I型コラーゲン抗体および抗オステオポンチン抗体を用いた免疫組織化学的染色を行い、検鏡した。術後7日に欠損部の象牙質表面にコラーゲン線維が増生したが、オステオポンチンは陰性であった。術後14日では欠損部の象牙質表面に多糖類を含有する硬組織が形成され、その周囲軟組織ではI型コラーゲンとオステオポンチンは陽性であった。新生硬組織は、PAS染色で象牙質より濃く染色されて、I型コラーゲンに陽性の線維が新生硬組織の縁に垂直的に入り込んでいたが、対照群には硬組織形成自体認められなかった。

以上により、合成ペプチドはラット歯周組織欠損部に貼付するとセメント質類似の硬組織を誘導することが示唆された。

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5件)

- ① Yoichiro Taguchi, Saitatsu Takahashi, Kazuya Tominaga, Hirohito Kato, Satoshi Komasa, Natsuki Yasui,

Muneyasu Shida, Hiroyuki Hayashi, Akio Tanaka and Makoto Umeda. Hard Tissue Formation by Human Periodontal Ligament Fibroblast Cells Treated With an Emdogain®-derived Oligopeptides *in vitro*. Journal of Hard Tissue Biology, 査読有 2012;21 : 375-384.

- ② 田口洋一郎, 高橋幸達, 富永和也, 小正聡, 至田宗泰, 林宏行, 田中昭男, 梅田誠. ヒト培養歯根膜細胞の増殖, 接着, 遊走に及ぼすエナメルマトリックスデリバティブ誘導体由来合成ペプチドの影響. 日本歯科保存学雑誌, 査読有 2012 ; 55 : 227-235.
- ③ Natsuki Yasui, Yoichiro Taguchi, Akio Tanaka, Masatoshi Ueda and Makoto Umeda. Biological Effects of Emdogain®-derived Oligopeptides on Rat Bone Marrow Cells *in Vitro*. Journal of Oral Tissue Engineering, 査読有 2012;9:126-135.
- ④ Naoko Yoshikawa, Yoshio Kotsu, Chizuko Ogata, Yoichiro Taguchi, Toshikatsu Koike, Yukiko Tomii, Shoichiro Terada, Mika Ueda, Michiko Noguchi, Kazuki Ogiso and Masatoshi Ueda. Effects of enamel matrix derivatives on periodontal tissue regeneration; focusing on radiographic observation. Journal of Osaka Dental University, 査読有 2011 ; 45 : 265-268.
- ⑤ 田口 洋一郎, 安井 菜津希, 富永 和也, 橋本 典也, 至田 宗泰, 玉置 敏夫, 北條 博一, 武田 昭二, 林 宏行, 田中 昭男, 上田 雅俊. ヒト歯肉上皮細胞に及ぼす影響から考えるエナメルマトリックスデリバティブ由来合成ペプチドの有用性. 日本歯科保存学雑誌, 査読有 2010 ; 53 : 449-456.

[学会発表] (計6件)

- ① Yoichiro Taguchi, Saitatsu Takahashi, Kazuya Tominaga, Satoshi Komasa, Natsuki Yasui, Akio Tanaka, Makoto Umeda. Fibroblast Cells Treated With an Emdogain derived Oligopeptide *in vitro*. 91th Annual Meeting of International Association for Dental Research, 2013年3月23日, Seattle, USA.
- ② 高橋幸達, 田口洋一郎, 小正聡, 奥田麻貴子, 安井菜津希, 田中昭男, 梅田

誠. ヒト歯根膜細胞の増殖, 接着, 遊走能に対する EMD 由来合成ペプチドの影響. 日本歯科保存学会 2012 年度春季学術大会 (第 136 回), 2012 年 6 月 29 日, 那覇市.

- ③ 安井菜津希, 田口洋一郎, 富永和也, 高橋幸達, 奥田麻貴子, 木村大輔, 片山暢仁, 南堂百映, 田中昭男, 上田雅俊. ラット骨髄細胞に対するエナメル基質タンパク由来合成ペプチドの初期硬組織分化誘導. 第 54 回日本歯周病学会秋季学術大会, 2011 年 9 月 24 日, 下関市.
- ④ Natsuki Yasui, Yoichiro Taguchi, Kazuya Tominaga, Yoshiya Hashimoto, Shoichiro Terada, Nobuhiro Shigematsu, Shoji Terada, Akio Tanaka, Masatoshi Ueda. In vitro effects of EMD-derived oligopeptides on human epithelial cells. 89th Annual Meeting of International Association for Dental Research, 2011 年 3 月 16 日, San Diego, USA.
- ⑤ 安井 菜津希, 田口 洋一郎, 富永 和也, 高橋 幸達, 田中 昭男, 上田 雅俊. ラット骨髄細胞に対する EMD 由来合成ペプチドの有用性. 第 53 回日本歯周病学会秋季学術大会, 2010 年 9 月 19 日, 高松市.
- ⑥ 田口洋一郎, 安井菜津希, 富永和也, 寺田昌一郎, 田中昭男, 上田雅俊. EMD 由来合成ペプチドのヒト歯肉上皮細胞に及ぼす影響から考える至適濃度. 特定非営利活動法人 日本歯科保存学会 2010 年度 春季学術大会 (第 132 回), 2010 年 6 月 4 日, 熊本市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 雅俊 (UEDA MASATOSHI)
大阪歯科大学・歯学部・名誉教授
研究者番号: 00067117

(2) 研究分担者

田中 昭男 (TANAKA AKIO)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 10121823

田口洋一郎 (TAGUCHI YOICHIRO)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 60434792

富永 和也 (TOMINAGA KAZUYA)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 80278572