

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659877

研究課題名(和文) 歯周組織再生のためのタンパク質性足場材料の設計

研究課題名(英文) Designing protein-incorporating scaffolds for periodontal tissue engineering

研究代表者

加藤 功一 (Kato, Koichi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・教授

研究者番号：50283875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞と生体分解性足場材料を用いた歯周組織の再生治療法において、骨の増成速度を向上させることが課題である。そこで、足場材料に組み込む最適な増殖因子を探索した。その結果、足場材料にBMP-2を単独で担持するのが有効であることがわかった。さらに、増殖因子をポリ乳酸系足場材料と複合化することを想定し、足場材料に親和性のあるペプチドを探索した。その結果、特定の配列をもつペプチドが足場材料に親和性を示すことがわかり、足場材料へ増殖因子を担持するためのアダプター分子として効果的であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Recently much attention has been paid to periodontal tissue regeneration using mesenchymal stem cells and biodegradable scaffolds. One of the most important challenges at this moment is to accelerate the formation of new bone tissues. In this study, we screened various growth factors and their combinations to identify the best factors to be incorporated into scaffolds for the enhanced bone formation. As a result, we found that incorporation of BMP-2 into scaffold materials is most effective for the preparing bone tissue scaffolds. Further study was carried out to identify peptides that have an affinity for biodegradable polymer scaffolds. As a result, it was found that the peptide having a specific sequence exhibited an affinity for poly(lactic acid). According to this result, we propose that, when fused with a growth factor, this peptide would be effective for constructing growth factor/scaffold composites.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：骨再生 歯周組織 タンパク質工学 細胞増殖因子 組織工学

1. 研究開始当初の背景

わが国における歯周病重症患者数は約700万人と見積もられており、超高齢化社会を迎えた我が国では、その治療法の確立が今後ますます重要になる。このような背景から、組織工学による歯周組織再生の取り組みが数多く行われてきた。近年では、間葉系幹細胞(MSC)を組み合わせた治療法に注目が集まっている。しかしながら、現在の治療技術は決して満足できるレベルではない。

MSCを利用した歯周組織の再生治療が十分な効果を得られない理由の一つとして、足場材料の性能不足が指摘されている。とくに、骨の増成速度を向上させることが最も重要であると考えられている。これまで、さまざまな吸収性素材をスペース確保や組織形態維持の目的だけに用いてきたが、細胞外マトリックス成分や増殖因子などの生体活性分子を組み込むことによって細胞の振る舞いを積極的に制御する必要があるものと思われる。

2. 研究の目的

歯周組織の再生治療法として、間葉系幹細胞(MSC)を組み合わせた組織工学的手法が注目されている。しかしながら、現在、その治療技術は決して満足できるレベルではない。とくに、MSCを用いる歯周組織再生では、骨の増成速度を向上させることが最も重要な課題である。

そこで本研究では、タンパク質工学の技術を利用して、MSCを用いた歯周組織の再生のための足場材料の設計に向けた検討を行うことを目的とした。とりわけ骨の増成速度向上にとって最も適した増殖因子を探索することを第一の主眼として研究を進めた。また、この情報を活用して、骨の造成速度を大幅に早めることのできる足場材料設計のための基礎検討を行った。

組織工学の研究分野では、生体吸収性高分子、天然高分子、リン酸カルシウム系セラミックスなどを素材とする足場材料に関する研究が盛んに行われた。近年では、増殖因子などを組み込んだ生体活性を有する足場材料も注目されるようになった。しかしながら、これまでのような天然由来のタンパク質を利用する方法では材料設計の自由度が低く、望むような治療効果を達成するのは難しかった。一方、本研究ではタンパク質工学にもとづく材料設計に取り組むが、目的とする足場材料の機能に応じて分子を合理的にデザインすることが可能であるため、足場材料の性能をさらに高めることができるものと期待される。

これまでに代表者らは、パーキンソン病の再生治療を目的として、脳内に移植された神経前駆細胞の生存率を向上させるための細胞キャリアの設計を行ってきた。コラーゲンをういて移植直後のホスト炎症性細胞の浸潤をブロックし、それと同時に、ゲル内に組み込んだインテグリン結合性ポリペプチドや上皮増殖因子の働きで移植細胞のアポトーシスを抑えることによって、移植後にみられる急速な細胞数の減少を食い止めることに成功した。このようなキャリア材料の設計の鍵を握るのは、細胞の共存下でゲル内に機能性ポリペプチドを担持させるため、タンパク質工学の手法を駆使して、ゲルを構成するベース材料と親和性をもつポリペプチドを機能性因子に融合した点である。

このようなタンパク質工学の手法を活用した足場材料の設計は、国内外を見てもわずか数グループが行っているに過ぎない。いずれも個々の技術シーズにもとづき研究が行われてきており、医療への貢献という点では決して十分なレベルではない。それには、明確な治療対象を想定しながら、移植細胞の機能制御に必要な要件を十分に調べ、その情報をもとにさらに高度な機能をもつ足場材料

を合理的に設計する必要があるものと思われる。

また、これまでの多くの組織工学研究の中で、歯周組織の再生は最重要課題の一つであった。Guided Tissue Regeneration 法のような吸収性材料を用いた歯槽骨の再建に始まり、昨今では、サイトカインを組み込んで組織再生を迅速に進めようとする試みがみられる。しかしながら、組織工学によって歯周組織の構造的・機能的に再構築するにはMSCを併用した再生治療が効果的であると認識されるようになってきた。

本研究によって、足場材料の有用な設計指針が得られれば、MSCを用いた歯周組織再生の効果を格段に向上させることにつながるであろう。また、タンパク質工学に基づく材料設計では、材料組成や品質の管理が容易であると同時に、動物由来成分を含まない材料の提供が可能であるため、臨床応用にとって有利である。

3. 研究の方法

これまでの栗原らの研究によれば、MSC / 足場材料複合体移植後の早い時期から、宿主象牙質と足場材料の界面層において歯周靭帯やセメント質の再生が誘導され、それらの構造は天然の組織に類似したものとなる。一方、歯槽骨は再生速度がきわめて遅く、同時に進行する軟組織の増殖によって、完全な骨再生が妨げられる。そこで本研究では、MSCの骨芽細胞へ分化を促進し、分化した骨芽細胞による骨組織の形成を大幅に促進できる増殖因子を探索した。また、そのようにして同定された最適因子をポリ乳酸系高分子に組み込む方法について検討した。

(1) MSCの骨芽細胞分化にとって最適な増殖因子の選択

MSCの培養系を用いたバイオアッセイによって、MSCの骨分化を促進する最適な増殖因子に関する知見を得るため、代表者らが

これまでに開発してきたタンパク質チップ分析法を活用することを試みた。すなわち、BMP-2、bFGF、IGF-1、BDNF、PDGF、TGF- β 、EGFなどの増殖因子、あるいはCXCL12、IL-6のようなサイトカインを単独あるいはコンビネーションとして一枚の微小なチップ上に配列固定し、MSCのオンチップ培養を行う。一定期間の培養後、分化マーカーの発現やカルシウム沈着量についてパラレル分析を行い、細胞の骨分化をもっとも強力に促進する因子の組み合わせを見出す。

また同時に、MSCの骨分化培養系に液性因子として増殖因子を添加する実験系も採用した。

MSCとして、マウス間葉系幹細胞(CH10T1/2、理研細胞バンク)および不死化間葉系幹細胞株(UE6E7R-3、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンク)を用いた。UE6E7R-3細胞を種々の増殖因子をディスプレイしたタンパクチップ上あるいはそれらを添加した分化培地中(-MEM, 10% fetal bovine serum, 1×10^{-8} M dexamethasone, 50 μ g/mL ascorbic acid, 10 mM β -glycero-phosphate, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin)で、2週間培養した。その後、骨分化に伴うカルシウムの沈着を調べるためアリザリンレッド染色を行うとともに、骨分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)、オステオポンチン(OPN)、オステオカルシン(OCN)のメッセンジャーRNA(mRNA)の発現をリアルタイム RT-PCR法により分析した。

(2) 最適な増殖因子を生分解性材料に組み込むための方法に関する検討

上記のスクリーニングによって選択された増殖因子をポリ乳酸系足場材料と複合することを想定し、足場材料親和性ペプチドを増殖因子に融合したキメラタンパク質を設

計することとした。そこで、本研究では、足場材料に親和性を持つペプチドの設計とその評価を行った。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞への分化を促進する因子の同定

タンパクアレイの作製には、これまでに我々のグループによって確立した方法を採用した。すなわち、まず、金薄膜を蒸着したガラス基板上に、カルボン酸を末端にもつアルカンチオールを自己組織化単分子膜を形成させた。次に、このカルボン酸をヒドロキシスクシンイミドを用いて活性化し、ニトリロ三酢酸誘導体を結合させた。これによって導入された三つのカルボン酸に Ni イオンをキレートさせた後、末端にヒスジンタグをもつ各種のサイトカインをキレート結合により固定した。ヒスチジンタグを融合したサイトカインには、12種類の現有試料を用いた (EGF-His、bFGF-His、CCL2-His、BDNF-His、GDNF-His、SCF-His、IGF1-His、NGF-His、NT3-His、NT4-His、PDGF α -His、CNTF-His)、このようにして作製されたサイトカインアレイ上でマウス間葉系幹細胞を2週間培養した後、アルカリフォスファターゼ染色によって分化の程度を評価することを試みた。しかしながら、骨分化促進効果に関して十分に再現性の高いデータを得ることができなかった。

そこで次に、増殖因子を液性因子として培養系に添加する実験系にて評価した。実験にはヒト不死化間葉系幹細胞株を用いた。その結果、BMP-2あるいはBMP-2とNT-4をコンビネーションとして添加した場合にカルシウムの沈着がとくに亢進することがわかった。一方、ALP、OPN、OCNのmRNAの発現は、BMP-2/NT-4を混合した場合より、BMP-2単独で加えたほうが多かった。

以上の結果から、機能性スキャホールド開

発においては、骨分化を促進したい部位へBMP-2を担持するのが適当であると考えた。

(2) 生分解性足場材料への親和性をもつペプチドの探索

増殖因子をベース材料に担持するためのアダプター分子(足場材料親和性ペプチド)について検討した。

ここでは、これまでに我々のグループにおいて疎水性高分子に対して親和性をもつペプチドとして検討してきた特定の配列をもつペプチドに着目し、そのペプチドが乳酸系ポリマーに親和性を示すかについて調べた。評価には表面プラズモン共鳴分析法を用いた。

モデル増殖因子として、上皮増殖因子を取り上げた。EGFのC末端にペプチドを融合したキメラ分子を大腸菌発現系を利用して合成した。一方、SPRセンサーチップ表面にポリ乳酸の薄膜をスピニング法によって形成させ、その表面におけるEGF-ペプチドの吸着について調べた。比較のため、ペプチドをもたないEGFについても同様に評価した。

その結果、ポリ乳酸表面に多量のEGF-ペプチドが吸着し(図中の赤線)、リン酸緩衝液(PBS)で洗浄した後も安定に吸着した。一方、ペプチドをもたないEGFでは吸着が認められなかった。以上の結果から、同ペプチドを融合することによってEGFにポリ乳酸親和性を付与できることがわかった。また、その吸着はペプチドとポリ乳酸との相互作用に基づくことが示唆された。

以上のように、ポリ乳酸系足場材料へ増殖因子を担持するため、同ペプチドの融合が有効であることがわかった。

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〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 功一 (Koichi Kato)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：50283875

(2)研究分担者

栗原 英見 (Hidemi Kurihara)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：40161765