

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861825

研究課題名(和文)新規合成ペプチドを用いた血管新生誘導による歯周組織再生療法の構築

研究課題名(英文) Foundation of periodontal tissue regeneration by induction of vascularization using new synthetic peptide

研究代表者

安井 菜津希 (YASUI, Natsuki)

大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤)

研究者番号：60642832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではEMD由来合成ペプチド(SP)を作製し、初期創傷治癒に重要なヒト歯肉線維芽細胞とSPを用いて影響を検討した。合成ペプチドを添加し培地でそれぞれ培養し、ヒト歯肉線維芽細胞の増殖能、接着能を検討した。ERK1/2は細胞の増殖や接着を制御する役割があり、SPがヒト歯肉線維芽細胞のERK 1/2リン酸化に及ぼす影響をウエスタンブロット法で検討した。

SPに対する増殖や接着は対照群に比べて有意に高い値を示した。またSPはERKシグナルのリン酸化を増強した。SPはヒト歯肉線維芽細胞の増殖能と接着能を促進することによって、創傷治癒を促進し、歯周外科治療に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Enamel matrix derivative (EMD) is used in periodontal tissue regeneration therapy. A synthetic oligopeptide (SP) derived from EMD which we produced in previous basic research of EMD was evaluated for whether it contributes to wound healing in periodontal tissue. The purpose of the present study is to investigate the efficacy of SP derived from EMD on the human gingival fibroblasts (hGFs). hGFs were treated with SP. We examined the effects of SP on the cell proliferation and the ability of cell attachment in hGFs. We also investigated the role of extracellular signal-related kinases (ERK) 1/2 induced by SP. Our results suggested that SP significantly promoted the cell proliferation and cell attachment in hGFs. Moreover, SP also induced the ERK 1/2 activation in hGFs. The results of the present study suggested that SP promote the cell proliferation and the activity of cell attachment in hGFs. Therefore, SP might contribute the promotion of wound healing in periodontal tissue.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織再生 エナメルマトリックスデリバティブ 歯根膜

1. 研究開始当初の背景

大学院生時の研究指導者の田中昭男らは、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 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は細胞分化を司る「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。申請者らは過去に、*in vitro* の研究でヒト歯根膜線維芽細胞の細胞増殖能を活性化し、骨芽細胞分化を促進させることを証明した。(Taguchi Y et al, *J Hard Tissue Biol* 2012; 4: 375-384., Taguchi Y et al, *日本歯科保存学会誌* 2012; 55: 227-235.) 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®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併用療法のほうが有意に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応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

- (1) 歯周組織構成細胞であるヒト歯根膜細胞と歯肉線維芽細胞を培養し、新規合成ペプチドを作用させ、血管新生マーカーの遺伝子発現やタンパク産生量などを検討する。この実験は *in vitro* での検索であり、*in vivo* 試験を行う前に細胞の反応を観察するために重要な過程である。
- (2) *in vivo* において歯周組織欠損に新規合成ペプチドを注入し、その治癒過程における組織反応を血管新生について検討する。また評価方法としては、免疫染色による免疫組織化学的検討、ウエスタンブロットでの血管新生関連のタンパク質の解析、そして、レーザーマイクロダイセクションを用いて、組織から mRNA を抽出

し、遺伝子レベルでの評価を行う。

3. 研究の方法

(1) 細胞の初代培養および *in vitro* での新規合成ペプチドによる血管新生マーカーの検討

Somerman らの方法 (*J Dent Res* 1988; 67: 66-70.) を改変して使用し、歯根膜細胞・歯肉線維芽細胞の初代培養を確立し、細胞を増殖させ実験に必要な細胞数を確保する。

新規合成ペプチドを各種の濃度 (0 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1000 ng/mL) で培養液に溶解し細胞に作用させる。血管新生マーカーの遺伝子発現 (PCR アレイ・リアルタイム PCR), タンパク産生量を検討する。

この実験の目的は新規合成ペプチドが血管新生を促進させる最適な濃度を確保する目的も兼ねており、*in vitro* 実験で最適な濃度を調べることにより、*in vivo* 実験で組織反応を事前に予測することができ、実験の効率化を図ることが可能になる。

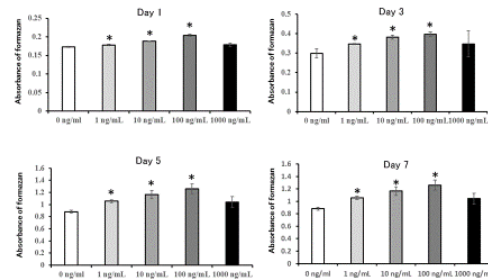
(2) 新規合成ペプチドの血管新生能について *in vivo* モデルでの評価

申請者らの過去の報告 (Hida T et al, *Oral Sci Inter* 2010; 7: 26-33.) に従い対照群・実験群を設定し、ビーグル犬、ラットの上顎臼歯部の人工的歯周組織欠損に投与する。対照群は 1.5% に調整したプロピレングリコールアルジネート溶液に PBS を溶解させたもの、実験群は *in vitro* の結果をもとに新規合成ペプチドを 2 ~ 3 種の濃度に調整し、プロピレングリコールアルジネート溶液に溶解させたものとし、術後 7 および 14 日に屠殺し、欠損部を含む歯周組織を採取する。そして固定・脱灰・包埋し、試料切片を作製し、各種染色にて評価する。

4. 研究成果

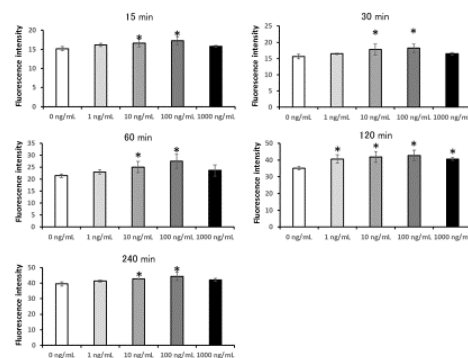
(1) ヒト歯肉線維芽細胞の細胞増殖に及ぼす新規合成ペプチドの影響

新規合成ペプチドに対するヒト歯肉線維芽細胞の増殖は 10, 100 ng/ml 濃度の新規合成ペプチド添加 1 日, 3 日, 5 日, 7 日の培養後の評価において、下図に示す通り新規合成ペプチド添加群で対照群と比較して有意に高い値を示した。



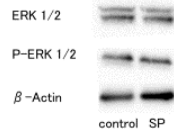
(2) ヒト歯肉線維芽細胞の細胞接着に及ぼす新規合成ペプチドの影響

新規合成ペプチドに対するヒト歯肉線維芽細胞の接着は 100 ng/ml 濃度の新規合成ペプチド添加 15 分, 60 分, 120 分, 240 分の培養後の評価において、下図に示す通り新規合成ペプチド添加群で対照群と比較して有意に高い値を示した。



(3) ヒト歯肉線維芽細胞の ERK リン酸化に及ぼす新規合成ペプチドの影響

我々はヒト歯肉線維芽細胞の ERK リン酸化に及ぼす新規合成ペプチドの影響についてウエスタンブロット法を用いて検討を行った。新規合成ペプチドは、下図に示す通りヒト歯肉線維芽細胞の ERK シグナルのリン酸化を增強した。



(4) 新規合成ペプチドについて in vivo モデルでの評価

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, トリイジンブルー染色, 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, 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 3 件)

(1) 木村大輔, 嘉藤弘仁, 富永和也, 野

口正皓, 山内伸浩, 橋本直季, 安井菜津希, 田口洋一郎, 田中昭男, 梅田誠. ヒト歯肉線維芽細胞の増殖, 接着および ERK1/2 シグナルに対するエムドゲイン由来合成ペプチドの影響. 歯科医学, 査読有, 2017; 80: 1-7.

(2) 田口洋一郎, 安井菜津希, 高橋宰達, 奥田麻貴子, 小石玲子, 山脇勲, 梅田誠. インプラントの表面制御と硬組織分化に対する影響. 日本歯周病学会会誌, 査読有, 2017; 56: 165-17.

(3) 田幡元, 田口洋一郎, 安井菜津希, 嘉藤弘仁, 高橋宰達, 木村大輔, 奥田麻貴子, 南堂百映, 小石玲子, 山脇勲, 中島幸市朗, 楠本哲次, 富永和也, 田中昭男, 梅田誠. エナメルマトリックスデリバティブと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ヒト歯根膜細胞に及ぼす影響の相違. 日本歯科保存学雑誌, 査読有, 2014; 57: 130-136.

[学会発表](計 3 件)

(1) 野口正皓, 田口洋一郎, 嘉藤弘仁, 安井菜津希, 野口三智子, 富永和也, 田中昭男, 梅田誠. ヒトの歯肉線維芽細胞および歯根膜幹細胞に対する EMD 由来合成ペプチドの影響. 日本歯周病学会会第 58 回秋季学術大会, 2015 年 9 月 13 日, アクトシティ浜松 (静岡県浜松市)

(2) 田口洋一郎, 小正聡, 小石玲子, 安井菜津希, 高橋宰達, 大塚健司, 嘉藤弘仁, 田中昭男, 梅田誠. チタンナノ表面上における Porphyromonas gingivalis LPS の骨髄間葉系幹細胞の骨形成に対する効果. 日本歯周病学会第 58 回春季学術大会, 2015 年 5 月 15 日,

幕張メッセ（千葉県千葉市）

- (3) 田口 洋一郎, 緒方 智壽子, 木村 大輔,
安井 菜津希, 高橋 宰達, 奥田 麻貴子,
小石 玲子, 山脇 勲, 梅田 誠. 慢性歯
周炎患者に CGF による歯周組織再生療法
を用いた一症例. 日本歯周病学会第 57
回春季学術大会, 2014 年 5 月 24 日, 長
良川国際会議場（岐阜県岐阜市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安井 菜津希 (YASUI Natsuki)

大阪歯科大学・歯学部・講師（非常勤）

研究者番号：60642832