

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06436

研究課題名(和文) アメロゲニン由来新規ペプチド固定バリアメンブレンの開発と骨再生誘導への応用

研究課題名(英文) Application to development of the barrier membrane immobilized amelogenin new peptide and bone tissue regeneration

研究代表者

粟田 哲也 (AWADA, TETSUYA)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：90758179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：アメロゲニン由来新規ペプチド(amgCP)は、MC3T3-E1およびMSCsの細胞増殖能や基質産性能に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、amgCPはLAMP1受容体を介してERK1/2を活性化し、MSCsの細胞増殖に影響を及ぼすことが示唆された。さらに、amgCPを固定化することにより、添加と同様にMSCsの細胞増殖能や骨基質産性能に影響を及ぼすことが明らかとなった。amgCP固定化の有効性が明らかとなったことより、amgCP固定バリアメンブレンを応用した骨再生治療の可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed that a new amelogenin peptide affects the metabolism of MC3T3-E1 and MSCs. In addition, amgCP activated ERK1/2 through LAMP1 receptor, and it was suggested that amgCP had an influence on the cell proliferation of MSCs. Furthermore, it was revealed that the metabolism of MSCs were influenced by amgCP immobilization as is the case with addition. The authors suggest a possible barrier membrane immobilized amelogenin new peptide application for bone tissue regenerative procedures.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：アメロゲニン ペプチド バリアメンブレン 骨再生

## 1. 研究開始当初の背景

歯科領域において、歯周病患者や口蓋裂患者などにおける骨欠損部の骨再生は待望される課題の1つである。現在では自家骨移植が最も確実な方法として用いられているが、骨採取部位への侵襲や、採取できる骨量に限界があるといった問題を有しており課題は多い。近年、ブタの幼若エナメル蛋白から抽出された Enamel matrix derivative (EMD) による歯周組織再生療法が行われ、良好な治療成績を挙げている。EMD は動物由来であるため、未知の病原微生物の混入による感染が否定できない。そこで、EMD 中の有効成分を明らかにし、そのリコンビナント蛋白を使用することが望ましいと考えられる。

これらの背景から、申請者は EMD の主成分であり、エナメル質形成に重要な役割を持つと考えられてきたアメロゲニンに着目し、アメロゲニンの歯周組織構成細胞に対する影響について検討を重ねてきた。その結果、培養ヒト MSCs の増殖能および基質産性能を亢進させること、培養ヒトセメント芽細胞に生理活性を有することを明らかにした。

しかしながら、アメロゲニンは生体内では強い極性を持ち、また酵素により容易に分解されるため、安定した効果が得られにくい。そこでアメロゲニンの活性部位を探索し、機能性ペプチドとして精製することにより、アメロゲニンの欠点が克服されることが考えた。これまでの研究により、アメロゲニンのアミノ酸配列を参考に、種々のペプチドを合成し、培養ヒトセメント芽細胞の代謝調節に及ぼす影響について検討した結果、C 末端ドメインに活性部位が存在することを解明した。さらに、アメロゲニンの活性部位に相当する 11 個のアミノ酸からなる amgCP をペプチド創薬として応用するために、特許出願を行った。

## 2. 研究の目的

我々は、骨造成用バリアメンブレンに amgCP を固定することを試みている。アメロ

ゲニンペプチドをバリアメンブレンに固定し、骨欠損部に応用することにより、骨再生のスペースを確保しつつ、MSCs や骨芽細胞の増殖や分化を誘導し、より効果的に骨の再生を促進できるものと推察される。

以上の背景より、新規アメロゲニンペプチド創薬を更なる効率的に臨床応用するため、アメロゲニンペプチド固定バリアメンブレンを用いた新規骨再生誘導治療法を目指す本研究を着想するに至った。

## 3. 研究の方法

本研究で使用するアメロゲニン C 末端ペプチド (amgCP) は、完全長アメロゲニンのアミノ酸配列を参考に合成した。また、細胞にはヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 (MSCs) およびマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を用いて、以下の検討を行った。

### (1) amgCP 添加が骨代謝関連細胞に及ぼす影響についての検討

各培養細胞に対して amgCP を添加し、細胞増殖能への影響について、ELISA BrdU assay および MTS assay を用いて解析を行った。また、amgCP 添加が骨代謝関連細胞の基質産生能に及ぼす影響について、骨代謝マーカーの遺伝子発現量および蛋白質発現量の解析を行った。MSCs に対する amgCP のシグナル伝達機構について検討を行った。

### (2) amgCP の生体材料への固定および定量方法の検討

In vitro で amgCP 固定の有効性を検討するため、金基板表面にカルボジイミド法を用いて amgCP を固定した。また、SPR 装置を用いて amgCP の結合量を定量・測定した。また、ラット骨欠損モデルにおける amgCP 固定バリアメンブレンの有効性を評価するため、吸収性 P(LA/GA)メンブレン (GC) への amgCP 固定方法を検討した。

( 3 ) amgCP 固定が骨代謝関連細胞に及ぼす影響についての検討 (*in vitro*)

細胞培養プレートに amgCP 固定基板を設置し、各培養細胞の培養を行い、amgCP 固定の有効性を検討するため、( 1 ) と同様に細胞増殖能および基質産生能を評価した。

( 4 ) amgCP 固定がラット頭蓋骨欠損部の骨再生に及ぼす影響の検討 (*in vivo*)

ラット頭蓋骨に直径 6mm の骨欠損部を作製する。amgCP 固定メンブレンを骨欠損部に移植し、骨欠損部の形態学的変化について、マイクロ CT を用いて評価を行った。

#### 4 . 研究成果

( 1 ) amgCP の添加により、各培養細胞の細胞増殖能は有意な亢進が認められた。また、amgCP 添加により MC3T3-E1 においては基質産生能の変化は認められなかったものの、14 日目における MSC s の基質産生能は有意な亢進が認められた。さらに MSC s に対する amgCP のシグナル伝達機構について検討を行ったところ、amgCP は LAMP1 受容体を介して ERK1/2 を活性化し、MSCS の細胞増殖に影響を及ぼすことが明らかとなった。

( 2 ) 金基板表面にカルボジイミド法を用いて amgCP を固定した。SPR 装置を用いて測定した amgCP の結合量は 13ng/cm<sup>2</sup> であった。また、吸収性 P(LA/GA) メンブレン(GC) に紫外線グラフト重合により amgCP を固定した。

( 3 ) 細胞培養プレートに amgCP 固定基板を設置し、その上で各培養細胞の培養を行ったところ、細胞増殖能は有意な亢進が認められた。また、( 1 ) と同様に MC3T3-E1 の基質産生能については変化が認められなかったが、MSC s の基質産生能は亢進する傾向が認められた。

( 4 ) ラット頭蓋骨欠損部に amgCP 固定メン

ブレンを骨欠損部に移植し、骨再生部の形態学的変化について評価を行ったところ、移植 1 週から 24 週目において対照群と比較して、明らかな差は認められなかった。今後、amgCP をより効果的にメンブレンへ結合する方法等の検討を行い、検証を続けていく必要があると考えられる。

以上の結果より amgCP は骨代謝関連細胞に対する調節機構をもつことが明らかとなり、添加と同様に材料に固定して効果を得ることが明らかとなった。生体材料に対して amgCP を組み合わせることで、効率的に骨再生を誘導できる可能性が示唆された。

#### 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 ( 査読有り ) ] ( 計 4 件 )

1 . Kunimatsu R, Yoshimi Y, Hirose N, Awada T, Miyauchi M, Takata T, Li W, Zhu L, Denbesten PK, and Tanimoto K: The C-terminus of amelogenin enhances osteogenic differentiation of human cementoblast lineage cells. J Periodontal Res, 52(2):218-224, 2017. doi: 10.1111/jre.12384.

2 . Awada T, Kunimatsu R, Yoshimi Y, Hirose N, Mitsuyoshi T, Sumi K, and Tanimoto K: Effects of C-terminal amelogenin peptides on the metabolism of osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun, 482(4):1154-1159, 2017. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.003.

3 . Yoshimi Y, Kunimatsu R, Hirose N, Awada T, Miyauchi M, Takata T, Li W, Zhu L, Denbesten PK, Tanne K, and Tanimoto K: Effects of amelogenin peptides on proliferation of human cementoblast lineage cells. J Periodontol, 87(7): 820-7, 2016. 10.1902/jop.2016.150507.

4 . Asakawa-Tanne Y, Mitsuyoshi T, Kunimatsu R, Hirose N, Su S, Awada T, Tanne K, Tanimoto K: Hyaluronan enhances proteoglycan4 expression in synovial cells. Medical Research Archives, 2016, in press. journals.ke-i.org/index.php/mra/articl

〔学会発表〕(計 18 件)

1 . 中島健吾, 國松 亮, 鷺見圭輔, 小島俊逸, 角 明美, 粟田哲也, 沖 奈苗, 阿部崇晴, 安藤和代, 加来真人, 谷本幸太郎: 乳歯由来歯髓由来間葉系幹細胞を用いた骨再生技術と顎裂部閉鎖治療への応用. 第 40 回日本口蓋裂学会総会・学術集会, 大阪, 2016.

2 . 中島健吾, 國松 亮, 鷺見圭輔, 角 明美, 粟田哲也, 沖 奈苗, 阿部崇晴, 安藤和代, 加来真人, 谷本幸太郎: 乳歯由来歯髓間葉系幹細胞を用いた骨再生技術と顎裂部閉鎖治療への応用. 第 23 回日本歯科医学会総会, 福岡, 2016.

3 . 國松 亮, 柄 優至, 郡司秀美, 吉見友希, 粟田哲也, 中島健吾, 谷本幸太郎: ヒト歯髓由来間葉系幹細胞の代謝に対する低出力半導体レーザー照射の影響. 第 23 回日本歯科医学会総会, 福岡, 2016.

4 . 角 千佳子, 廣瀬尚人, 光吉智美, 岡本友希, 粟田哲也, 矢野下 真, 高野真実, 谷本幸太郎: 下顎頭軟骨における Semaphorin3A の役割について. 第 29 回日本顎関節学会総会・学術大会, 箱根, 2016.

5 . 矢野下 真, 廣瀬尚人, 光吉智美, 粟田哲也, 岡本友希, 角 千佳子, 高野真実, 谷本幸太郎: 軟骨細胞への過度な機械的負荷受容時の FAK 阻害剤 Defactinib の影響. 第 29 回日本顎関節学会総会・学術大会, 箱根, 2016.

6 . 木村 綾, 國松 亮, 吉見友希, 柄 優至, 粟田哲也, 郡司秀美, 中島健吾, 宮内睦美, 高田 隆, 谷本幸太郎: ヒトセメント芽細胞の代謝に対するフラボノイド類化合物バイカリンの影響. 第 75 回日本矯正歯科学会大会, 徳島, 2016.

7 . 安藤和代, 鷺見圭輔, 國松 亮, 吉見友希, 粟田哲也, 中島健吾, 阿部崇晴, 谷本幸太郎: アメロゲンペプチドが由来の異なる間葉系幹細胞に及ぼす影響について. 第 75 回日本矯正歯科学会大会, 徳島, 2016.

8 . Gunji H, Kunimatsu R, Tsuka Y, Awada T, Okamoto Y, and Tanimoto K: High-frequency low-level diode laser irradiation enhances the proliferation of cementoblast lineage cells. American association of orthodontists meeting, San Francisco, USA, 2015.

9 . Kunimatsu R, Yoshimi Y, Awada T, and Tanimoto K: Amelogenin enhances the proliferation of cementoblast lineage

cells. American association of orthodontists meeting, San Francisco, USA, 2015.

10 . 光吉智美, 麻川由起, 廣瀬尚人, 粟田哲也, 岡本友希, 矢野下 真, 谷本幸太郎: ヒアルロン酸が滑膜細胞における CD44 受容体を介した superficial zone protein 発現に及ぼす影響. 第 28 回日本顎関節学会総会・学術大会, 名古屋, 2015.

11 . Yoshimi Y, Kunimatsu R, Awada T, Hirose N, Mitsuyoshi T, Sumi K, Gunji H, Nakajima K, Kimura A, Miyuchi M, Takata T, and Tanimoto K: Amelogenin variants increased the proliferation of HCEM through the MAPK-ERK signaling pathway. The 74<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society, Fukuoka, 2015.

12 . Kunimatsu R, Yoshimi Y, Awada T, Asakawa Y, Hirose N, Mitsuyoshi T, Sumi K, Gunji H, Tsuka Y, Tanne K, and Tanimoto K: Effects of human full length amelogenin on the proliferation of human osteoblasts. The 74<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society, Fukuoka, 2015.

13 . 粟田哲也, 國松 亮, 吉見友希, 廣瀬尚人, 平田伊佐雄, 加藤功一, 谷本幸太郎: アメロゲン由来新規ペプチドを用いた骨再生療法への展開. 第 74 回日本矯正歯科学会大会, 福岡, 2015.

14 . 郡司秀美, 國松 亮, 柄 優至, 吉見友希, 鷺見圭輔, 粟田哲也, 廣瀬尚人, 光吉智美, 谷本幸太郎: 半導体レーザー照射は骨芽細胞の細胞増殖・修復能を亢進し、実験的歯の移動を促進させる. 第 74 回日本矯正歯科学会大会, 福岡, 2015.

15 . Kunimatsu R, Yoshimi Y, Awada T, and Tanimoto K: Amelogenin enhances the proliferation of cementoblast lineage cells. American association of orthodontists meeting, San Francisco, USA, 2015.

16 . Yoshimi Y, Kunimatsu R, Hirose N, Awada T, Mitsuyoshi T, Gunji H, Takata T, Tanne K, and Tanimoto K: Amelogenin isoforms effect the proliferation in human periodontal tissue cells. 8th International Orthodontic Congress, London, UK, 2015.

17 . Gunji H, Kunimatsu R, Tsuka Y, Awada T, Okamoto Y, and Tanimoto K: High-frequency low-level diode laser irradiation enhances the proliferation of

cementoblast lineage cells. American association of orthodontists meeting, San Francisco, USA, 2015.

18 . Horie K, Watanabe M, Awada T, Kunimatsu R, Murasaki K, Takata T, Uchida T, and Tanimoto K.: Effects of bovine lactoferrin on extra-territorial facial pathological pain following a trigeminal nerve injury. The XII international conference on Lactoferrin, Structure, Function, and Applications, Nagoya, 2015.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

粟田 哲也 (AWADA TETSUYA)

広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号：90758179