

令和元年6月11日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11790

研究課題名(和文)機能性アメロゲニンペプチド創薬とレーザーを応用した先進的歯根吸収予防治療法の確立

研究課題名(英文) Application to root resorption prevention and elucidation of periodontal tissue metabolic activity mechanism by functionality amelogenin peptide and laser.

研究代表者

國松 亮 (Kunimatsu, Ryo)

広島大学・病院(歯)・講師

研究者番号：40580915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アメロゲニンは、エナメル芽細胞より分泌される主要な蛋白質である。本研究は、アメロゲニンの活性部位を探索することとした。セメント芽細胞において、C末端側アメロゲニン添加することにより、細胞増殖能及び基質代謝能を亢進させることが解明された。アメロゲニンペプチドを応用した歯周組織再生の可能性が示唆された。一方、矯正学的歯の移動は、圧迫側の骨吸収と牽引側の骨添加による骨改造現象によって生じる。本研究は、半導体レーザーを用いて、実験的歯の移動中の歯周組織の変化について検討した。半導体レーザー照射は、実験的歯の移動モデルにおいて、歯周組織の代謝活性亢進をもたらし、歯の移動を促進させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

矯正歯科治療は、顎顔面・口腔組織の正常な成長発育を誘導し、良好な顎顔面と正常な口腔機能の獲得を達成する医療である。矯正歯科治療中の歯の移動は、圧迫側における骨吸収と牽引側における骨添加により生じる。この一連の骨リモデリングは、個人差がある上に、歯の移動が遅すぎたり、あるいは意図しない歯の移動が生じることにより、治療期間が長期に及ぶことがある。もし、矯正歯科治療中に特定の歯の移動のみを選択的に促進させることができれば、より安全で効率的な矯正歯科治療を行うことが可能となる。本研究では、機能性アメロゲニンペプチドとレーザーを用いた方法で歯周組織代謝活性を促進させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Amelogenins are known as a major constituent of the enamel matrix secreted by ameloblasts and play an important role in enamel formation. The purpose of this study was to explore the active site residues of amelogenin. C-terminal amelogenin variants increased the proliferation and osteogenic differentiation of HCEM cells, indicating the possible utility of C-terminal amelogenin peptide for periodontal tissue regeneration. Tooth movement during orthodontic treatment is associated with bone neoplasticity and bone resorption on the tension and pressure sides. In this study, we used high-frequency near-infrared diode laser with less generation of heat and examined the histological change of periodontal tissue during experimental tooth movement with laser irradiation. This study demonstrates that high-frequency near-infrared diode laser irradiation of periodontal tissue leads to metabolic activation, which ultimately increases the rate of tooth movement.

研究分野：矯正歯科

キーワード：ペプチド創薬 レーザー 歯の移動 代謝活性 シグナル伝達 歯周組織 歯根吸収

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療は、歯周組織の骨改造現象を利用して歯を移動させるが、生じる副作用の一つとして歯根吸収が挙げられる。しかしながら、吸収した歯根を修復・再生させる治療法はこれまでのところ確立されていない。もし、矯正歯科治療中に歯根吸収のリスクが高い歯に対して選択的に予防処置を行うことができれば、より安全で安定した矯正歯科治療を行うことが可能となる。アメロゲンは、歯の発生過程においてエナメル芽細胞より分泌される細胞外基質のうち約 90% を占める蛋白質である。硬組織を無細胞性に誘導する働きを有しており、エナメル質やセメント質形成に関与している。申請者は、アメロゲンの効果に着目し、ヒトリコンピナント完全長アメロゲンを精製するとともに、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、アメロゲンがヒトセメント芽細胞における細胞増殖能および基質産生能を亢進させることを明らかにした。蛋白質には、他の分子との相互作用に必要な活性部位が存在する。蛋白質の活性部位を探求することは、その蛋白質の構造や機能の解明に繋がる。そして、活性部位が明らかになれば、分子量の小さいペプチドを工業的に精製することが容易となり、安定した供給が可能となる。申請者は、アメロゲンの活性部位を探索してきた。予備的検証より、アメロゲンの親水性領域である C 末端側に活性部位が存在する可能性を明らかにした。一方、レーザーは励起状態にある物質の誘導放射により発生する特定の電磁波であり、その波長により様々な特徴を有するため、医療分野に広く応用されており、有効性が報告されてきた。現在、医療分野においては、Nd-YAG および半導体レーザーは生体親和性が高く、優れた組織浸透性を有するため、皮膚損傷や骨折の治癒促進等に应用されている。しかしながら、その作用機序には不明な点が多く、歯周組織の代謝や歯の移動に対するレーザー照射の影響について、詳細な検証や最適な条件の検討を行った報告は見られない。レーザー照射に適用することにより、歯周組織構成細胞の細胞増殖能や基質代謝能へ影響を及ぼすことが予想される。また、アメロゲンペプチドを併用することにより更なる歯周組織の代謝活性作用が期待される。以上の背景より、アメロゲンペプチドとレーザー照射を用いた歯根吸収予防し、組織の代謝活性させる新たな治療法の確立を目指す本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、活性部位を有する機能性アメロゲンペプチドに着目し、歯周組織の代謝調節機構に及ぼす影響について明らかにする。さらに、レーザーを併用することで、矯正歯科治療中の歯根吸収の発症を予防する新規治療法を確立することを最終的な目的とする。

## 3. 研究の方法

### 実験 1 C 末端側アメロゲンペプチドが歯周組織細胞の増殖・基質産生能に及ぼす影響

本研究では、歯周組織構成細胞および間葉系幹細胞株を用いて、以下の検討を行った。また、C 末端側アメロゲンペプチドの配列は、特許申請 (ヒトアメロゲン部分ペプチド; 出願番号 2013-012019) した結果を参考に、医学生物学研究所に依頼し、ペプチドを作製した。歯周組織培養細胞における細胞増殖能の検討として、各培養細胞に対し、C 末端側アメロゲンペプチド添加を行った際の細胞増殖への影響について、ELISA BrdU assay を用いて解析した。歯周組織培養細胞における基質代謝能についての検討として、各細胞に C 末端側アメロゲンペプチド添加を行った際の骨代謝マーカーの発現レベルについて遺伝子解析および Western blot 解析を行った。また、アリザリンレッド染色を用いて石灰化能の検討を行った。

### 実験 2 レーザ照射が歯周組織構成細胞の代謝に及ぼす影響

本研究では、半導体、Nd-YAG および Er-YAG レーザーを使用した。また、実験 1 と同様

の研究実験方法を行った。

#### 実験3 アメロゲニンおよびレーザーの歯周組織構成細胞におけるシグナル経路の検討

アメロゲニンペプチドおよびレーザー照射が細胞内伝達物質に及ぼす変化について検討を行った。MARK/MEK シグナル伝達経路の中間経路として知られる MAPK/ERK 1/2、p38 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化について Western blot 解析を行った。また、下流の経路として細胞核内の ELK のリン酸化についても検討した。

#### 実験4 動物実験による検討

ラットに対するアメロゲニンペプチドおよびレーザー照射が実験的歯の移動に及ぼす影響について検討した。ラットの上顎門歯と第一臼歯間にクロズドコイルを装着し、門歯を固定源として第一臼歯を近心に移動させた。歯の移動や組織の経日的変化について、CT を用いて、三次元的な解析を行った。その後、組織切片を作製した。HE 染色を行うとともに、細胞活性因子である PCNA および骨代謝関連マーカーの免疫組織化学染色を用いて評価した。また、歯根吸収や歯槽骨退縮の状態を再現するため、ラット低機能咬合モデルを作製した。レーザー照射を行い、歯槽骨および歯根吸収の状態を評価した。

### 4. 研究成果

実験1では、ヒト培養セメント芽細胞および間葉系幹細胞に対して、C末端側アメロゲニンペプチド添加を行った際の細胞増殖への影響について検討を行った。C末端側アメロゲニンペプチドにより、各細胞株の細胞増殖能を亢進させた。基質代謝能に関する検討では、ヒト培養セメント芽細胞に対してC末端側アメロゲニンペプチドを添加することにより、基質産生能を亢進させた。実験2では、レーザー照射が歯周組織構成細胞の代謝に及ぼす影響について検討を行った。ヒト培養骨芽細胞株に対して、半導体レーザー、Nd-YAGレーザー照射を行うことにより、細胞増殖能が亢進することが明らかとなった。実験3では、アメロゲニンおよびレーザーの歯周組織構成細胞におけるシグナル伝達経路の検討を行った。アメロゲニンペプチドのシグナル伝達経路として、LAMP1/ERK/ELKのシグナル伝達経路を介して細胞増殖能に影響を及ぼすことが解明された。そして、ヒト培養骨芽細胞に対して、半導体レーザー照射を行うと、ATPの発現が亢進した。そのシグナル伝達経路として、MARK/ERK経路を介する可能性が示唆された。実験4では、動物実験による検討を行った。CT解析より、レーザー照射群では、非照射群と比較して、実験的歯の移動量が有意に増加した。免疫組織学による検証では、圧迫側において、レーザー照射群では、対照群と比較して、RANKLおよびTRAPの発現が亢進された。圧迫側においては、レーザー照射群では、対照群と比較してPCNAおよびALPの高発現が確認された。さらに、ラット低機能咬合モデルを用いて、歯根吸収や歯槽骨退縮を再現した。ラット低咬合機能モデルにおいて、半導体レーザー照射は、血管新生や組織修復に深く関与する因子であるbFGFおよびVEGF蛋白質の発現を亢進し、低咬合状態によって生じた歯槽骨幅の減少や歯根膜腔の狭窄、歯根吸収が回復することも解明した。

以上の結果より、アメロゲニンの活性部位はC末端側であることが明らかとなった。歯周組織構成細胞および間葉系幹細胞に対して、細胞増殖能や基質代謝能へ影響を及ぼすことが明らかとなった。その作用機序として、LAMP1/ERK/ELKのシグナル伝達経路が示唆された。以上よりアメロゲニンペプチドを応用した組織修復の可能性が強く示唆された。そして、レーザー照射を行うことで歯周組織の代謝活性が亢進し、歯の移動が促進される可能性が明らかとなった。矯正歯科治療の効率化を達成しうる手段として、レーザーの応用の可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

- 1 Tsuka Y, Kunimatsu R, Gunji H, Nakajima K, Kimura A, Hiraki T, Nakatani A, Tanimoto K. Effects of Nd:YAG low-level laser irradiation on cultured human osteoblasts migration and ATP production: in vitro study. *Lasers Med Sci*. 34(1), 30-35, 2019.
- 2 Tsuka Y, Kunimatsu R, Gunji H, Nakajima K, Hiraki T, Nakatani A, Tanimoto K. Molecular biological and histological effects of Er:YAG laser irradiation on tooth movement. *J Oral Sci*, 2019, 61(1), 67-72. (査読有)
- 3 Ando K, Kunimatsu R, Awada T, Yoshimi Y, Tsuka Y, Sumi K, Horie K, Abe T, Tanimoto K. Effects of human full-length amelogenin and C-terminal amelogenin peptide on the proliferation of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. *Curr Pharm Des*, 24(25), 2993-3001, 2018.
- 4 Gunji H, Kunimatsu R, Tsuka Y, Yoshimi Y, Sumi K, Awada T, Nakajima K, Kimura A, Hiraki T, Hirose N, Yanoshita M, Tanimoto K. Effect of high-frequency near-Infrared diode laser irradiation on periodontal tissues during experimental tooth movement in rats. *Laser Surg Med*, 2018 in press. doi: 10.1002/lsm.22797. (査読有)
- 5 Kunimatsu R, Awada T, Yoshimi Y, Ando K, Hirose N, Asakawa-Tanne Y, Sumi K, Tanimoto K. The C-terminus of the amelogenin peptide influences the proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol*, 89(4), 496-505, 2018. (査読有)
- 6 Kunimatsu R, Gunji H, Tsuka Y, Yoshimi Y, Awada T, Sumi K, Nakajima K, Kimura K, Hiraki T, Abe T, Hirose N, Yanoshita M, Tanimoto K. Effects of high-frequency near-infrared diode laser irradiation on the proliferation and migration of mouse calvarial osteoblasts. *Laser Med Sci*, 33(5), 959-966, 2018. (査読有)
- 7 Nakajima K, Kunimatsu R, Ando K, Ando T, Hayashi Y, Kihara T, Hiraki T, Tsuka Y, Abe T, Kaku M, Nikawa H, Takata T, Tanne K, Tanimoto K. Comparison of the bone regeneration ability between stem cells from human exfoliated deciduous teeth, human dental pulp stem cells and human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 497(3), 876-882, 2018. (査読有)
- 8 Kunimatsu R, Nakajima K, Awada T, Tsuka Y, Abe T, Ando K, Hiraki T, Kimura A, Tanimoto K. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 18;501(1), 193-198, 2018. (査読有)
- 9 Kunimatsu R, Yoshimi Y, Awada T, Tanimoto K. Effects of human full-length amelogenin on the proliferation of human osteoblasts. *Biomedical research (India)*, 29(12), 2609-14, 2018. (査読有)
- 10 Kunimatsu R, Yoshimi Y, Hirose N, Awada T, Miyauchi M, Takata T, Wu L, Zhu L, Denbesten PK, Tanimoto K. The C-terminus of amelogenin enhances osteogenic differentiation of human cementoblast-lineage cells. *J Periodontal Res*, 52(2); 218-224, 2017. (査読有)
- 11 Awada T, Kunimatsu R, Yoshimi Y, Hirose N, Mitsuyoshi T, Sumi K, Tanimoto K. Effects of C-terminal amelogenin peptides on the metabolism of osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 482(4), 1154-9, 2017. (査読有)
- 12 Yoshimi Y, Kunimatsu R, Hirose N, Awada T, Miyauchi M, Takata T, Wu L, Zhu L, Denbesten PK, Tanne K, Tanimoto K. Effects of C-Terminal amelogenin peptide on proliferation of human

cementoblast lineage cells. J Periodontol, 87(7), 820-7, 2016. (査読有)

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 國松 亮, 超短パルス半導体レーザーによる歯の移動時の歯周組織誘導能の探索. 第 30 回日本レーザー治療学会 (東京), 2018.
2. 超短パルス半導体レーザー照射はラットにおける実験的歯の移動を促進させる. 郡司 秀美, 國松 亮, 柄 優至, 吉見 友希, 粟田 哲也, 阿部 崇晴, 木村 綾, 中島 健吾, 山田 桜, 平木 智香, 中谷 文香, 谷本 幸太郎. 第 77 回日本矯正歯科学術大会 (横浜), 2018
3. Effect of Nd: YAG laser irradiation and mechanical force on osteoblast-like cells. Tsuka Y, Kunimatsu R, Awada T, Tanimoto K. 2018 Taiwan International Orthodontic Forum (Taipei), 2018.
4. Effects of high-frequency near-infrared diode laser irradiation on the proliferation and migration of mouse calvarial osteoblasts. Kunimatsu R, Tsuka Y, Awada T, Tanimoto K. 2018 Taiwan International Orthodontic Forum (Taipei), 2018.
5. The C-terminus of the amelogenin peptide influences the proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. Awada T, Kunimatsu R, Tsuka Y, Tanimoto K. 2018 Taiwan International Orthodontic Forum (Taipei), 2018.
6. 國松 亮. レーザーによる歯の移動時の歯周組織誘導能の探索 と新規矯正用レーザー機器の開発. 2017 年ビジネスマッチング交流会 (広島), 2017.
7. アメロゲニン由来新規ペプチドと骨髄由来間葉系幹細胞を用いた骨再生療法への展開. 粟田 哲也, 國松 亮, 吉見 友希, 廣瀬 尚人, 安藤 和代, 麻川 由起, 柄 優至, 平田 伊佐雄, 加藤 功一, 丹根 一夫, 谷本 幸太郎. 第 41 回日本口蓋裂学会総会・学術集会(東京), 2017.
8. アメロゲニンの活性部位の探索とペプチド創薬開発. 國松 亮, 吉見 友希, 粟田 哲也, 安藤 和代, 谷本幸太郎. 広島大学新技術説明会 (広島), 2017.
9. 國松 亮. レーザーによる歯の移動時の歯周組織誘導能の探索と新規矯正用レーザー機器の開発. 2017 年ビジネスマッチング交流会 (広島), 2017.
10. 國松 亮. 全人的医療を目指した先天性疾患および顎変形症患者に対する矯正歯科医療の現状と展望. 第 60 回中四国矯正歯科学会 (徳島), 2017.
11. 國松 亮. 矯正歯科治療における治療技術の現状とレーザーによる歯の移動時の歯周組織誘導能の探索 -半導体レーザー機器の開発を目指して-. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 (松本), 2017.
12. Effect of Nd:YAG laser irradiation on the osteoblasts : Tsuka Y, Kunimatsu R, Gunji H, Nakajima K, Tanimoto K. The 49 Korean Association Orthodontists (Seoul), 2016.
13. アメロゲニ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. 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. 第 76 回日本矯正歯科学会学術大会 (徳島), 2016.

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

名称: ヒトアメロゲニン部分ペプチド

発明者: 谷本 幸太郎, 丹根 一夫, 國松 亮, 吉見 友希.

権利者: 国立大学法人広島大学

種類: 特許公報 (B2)

番号: 6134146

出願年: 2017/4/28

国内外の別： 国内および国際

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：谷本 幸太郎

ローマ字氏名： Kotaro Tanimoto

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科(歯)

職名：教授

研究者番号(8桁): 20322240

研究分担者氏名：廣瀬 尚人

ローマ字氏名： Naoto Hirose

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科(歯)

職名：助教

研究者番号(8桁): 50611935

研究分担者氏名：吉見 友希

ローマ字氏名： Yuki Yoshimi

所属研究機関名：広島大学

部局名：病院 (歯)

職名：病院助教

研究者番号(8桁): 50707081

研究分担者氏名：柄 優至

ローマ字氏名： Yuji Tsuka

所属研究機関名：広島大学

部局名：病院 (歯)

職名：助教

研究者番号(8桁): 50737682

研究分担者氏名：鷺見 圭輔

ローマ字氏名： Keisuke Sumi

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科(歯)

職名：助教

研究者番号(8桁): 00707078

研究分担者氏名：加来 真人

ローマ字氏名： Masato Kaku

所属研究機関名：広島大学

部局名：病院 (歯)

職名：講師

研究者番号(8桁): 10325194