

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20551

研究課題名(和文) エムドゲイン由来合成ペプチドの血管新生誘導能を利用した歯周組織再生療法の基盤構築

研究課題名(英文) Foundation of periodontal tissue regeneration using Emdogain-derived synthetic peptide from the view point of angiogenesis

研究代表者

高橋 宰達 (TAKAHASHI, Saitatsu)

大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤)

研究者番号：80734342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アメロジェニンエクソン5の部分配列をもつペプチドを人工的に合成し、歯周組織再生に対するそのペプチドの有効性をin vivoおよびin vitroで研究してきた。しかし、in vivoの実験でペプチドとEMDとの比較については未解明である。ラットの上顎臼歯部に人工的に歯周組織欠損を作製し、術後3、5日および7日目に同部の標本作製し、病理組織学的および抗型コラーゲン抗体を用いて免疫組織化学的に観察した。新規合成ペプチドはEMDと同様に歯周組織における早期の創傷治癒過程を促進し、再生を促す作用があることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Enamel Matrix Derivative(EMD), which is commonly used as a material for periodontal tissue regeneration, a substance consistent with the partial sequence of amelogenin exon 5 was identified. We compare the experiment has compared the peptide with EMD from the view point of angiogenesis. Periodontal tissue defects were artificially prepared in the maxillary molar region of rats, and a new synthetic peptide or EMD was applied to the site of defect. Specimens at this site were prepared 3, 5, and 7 days after surgery, and histopathologically and immunohistochemically examined using anti-type collagen antibody. Like EMD, novel synthetic peptide promoted the early wound healing process in the periodontal tissues compared to the control, suggesting that it has action accelerate periodontal regeneration.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 再生 血管新生

1. 研究開始当初の背景

- (1) 本研究は旧タイプの EMD をラット背部皮下に注入すると、骨・軟骨様組織と好酸性の円形小体 (ERB) が形成された。この ERB をタンパク解析すると、7 種のアミノ酸配列 (WYQNMIR) が含まれており、そのアミノ酸配列はブタのアメロジェニン 前駆物質であることを特定した。
- (2) このアメロジェニン 前駆物質が硬組織再生に重要な役割を果たすのではないかと考え、硬組織形成を促進する新規合成ペプチドとして作製した。
- (3) このペプチドをラット歯周組織欠損に注入すると、歯根表面にセメント質様組織が形成され、歯周組織再生に重要な役割を果たすとされるヒト歯根膜幹細胞においても硬組織形成能が促進することを発見した。
- (4) しかし、歯周組織由来細胞 (歯肉・歯根膜など) や動物組織での血管新生に対する新規合成ペプチドの効果はいまだ明らかにされていない。新規合成ペプチドが血管新生にどのような効果を及ぼすかは、再生した歯周組織への血管供給という観点から、歯周組織再生療法の成功のカギとなる重要な課題であると考えられる。

2. 研究の目的

そこで申請者はこの EMD 由来新規合成ペプチドが血管新生にも有用であるのか検討し、血管新生を標的とした新規硬組織再生創薬として臨床応用につなげることを目的としている。

3. 研究の方法

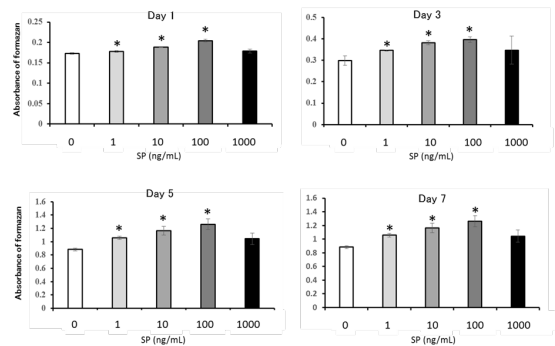
- (1) Somerman らの方法 (J Dent Res 1988; 67: 66-70.) を改変して使用し、歯根膜細胞・歯肉線維芽細胞の初代培養を確立し、細胞を増殖させ実験に必要な細胞数を確保する。
- (2) 新規合成ペプチドを各種の濃度 (0 ng/mL, 1 ng/mL 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1000 ng/mL) で培養液に溶解し細胞に作用させる。血管新生マーカーの遺伝子発現 (PCR アレイ・リアルタイム PCR)、タンパク産生量を検討する
- (3) この実験の目的は新規合成ペプチドが血管新生を促進させる最適な濃度を確認する目的も兼ねており、in vitro 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。

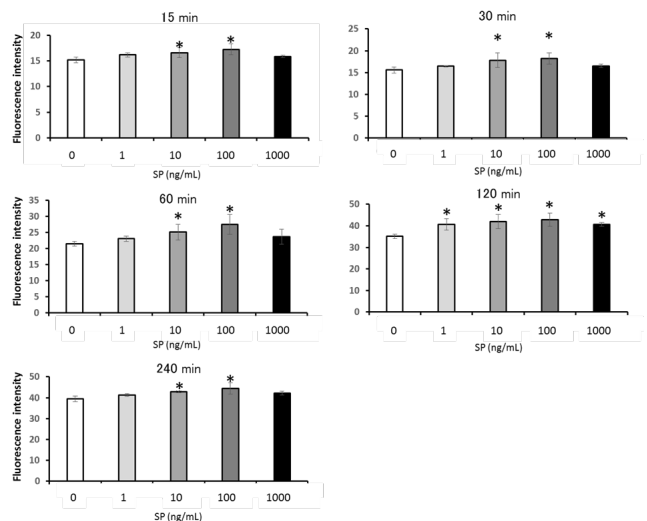
- (4) In vivo 実験として、ビーグル犬、ラットの歯周組織欠損に新規合成ペプチドを注入し、その治癒過程における組織反応を血管新生について検討する。
- (5) また評価方法としては、免疫染色による免疫組織化学的検討、ウエスタンブロットでの血管新生関連のタンパク質の解析、そして、レーザーマイクロダイセクションを用いて、組織から mRNA を抽出し、遺伝子レベルでの評価を行う。

4. 研究成果

- (1) 細胞増殖
新規合成ペプチドを各種の濃度 (0, 1, 10, 100, 1000 ng/mL) で培養液に溶解しヒト歯肉線維芽細胞に作用させ、ナカライ社製 Cell Count Reagent SF にて検討を行った。新規合成ペプチド添加群では対照群と比べて有意に細胞増殖能が促進され、100 ng/mL 濃度で最も細胞増殖能が促進されることがわかった。

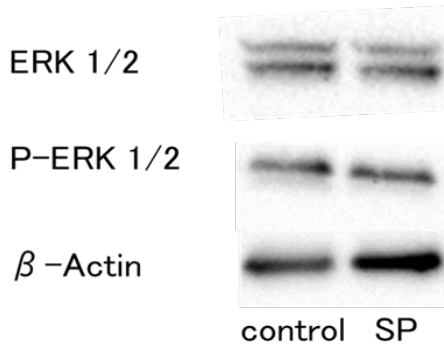


- (2) 接着試験
新規合成ペプチドに対するヒト歯肉線維芽細胞の接着は 100 ng/ml 濃度の SP 添加 15 分, 60 分, 120 分, 240 分の培養後の評価において、SP 添加群で対照群と比較して有意に高い値を示した。

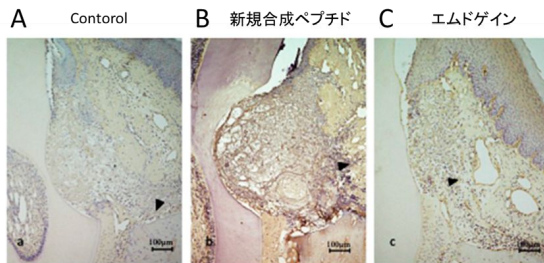


(3) ERK 経路活性化への影響

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ヒト歯肉線維芽細胞の ERK シグナルのリン酸化を増強した。

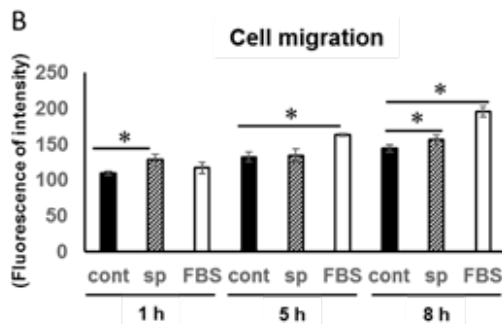


(4) ラット歯周組織欠損の血管新生に対する新規合成ペプチドの影響：新規合成ペプチド群はコントロール群と比較して、優位に血管新生を促進する可能性が示唆された。

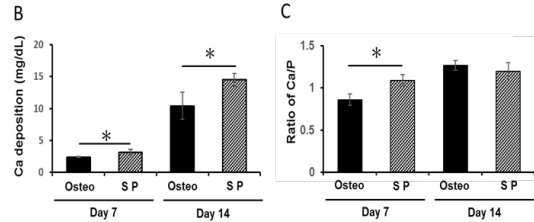


(5) その他の研究成果

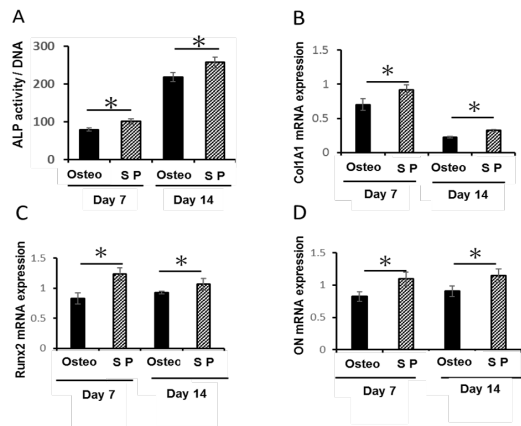
新規合成ペプチドはヒト歯髄幹細胞 (HDPSC) の細胞増殖能と細胞遊走能を促進することが示唆された。以下に、細胞遊走能の結果を示す。



また新規合成ペプチドは HDPSC の ALP 活性, カルシウム析出量を有意に促進することが示唆された。以下に、ALP 活性, カルシウム析出量の結果を示す。



さらに新規合成ペプチドは HDPSC の COL1A1 mRNA、Osteonectin mRNA、Runx2 mRNA の遺伝子発現を有意に促進することが示唆された。以下に、上記の遺伝子発現の結果を示す。



したがって、エムドゲインと同様に、新規合成ペプチドは MAPK 経路を介して、ヒト歯髄幹細胞の細胞増殖、硬組織分化を促進する可能性が示唆された。

(6) 研究成果のまとめ

- 新規合成ペプチドは歯肉線維芽細胞の増殖能、接着能を促進することが示唆された。
- またラット歯周組織欠損において新規合成ペプチドは毛細血管の新生を促進することが示唆された。
- これらの結果により、新規合成ペプチドは歯周組織の創傷治癒を促進す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)

[論文発表](計2件)

1. Masahiro Noguchi, Isao Yamawaki, Saitatsu Takahashi, Yoichiro Taguchi, Makoto Umeda

Effects of α -tocopherol on bone marrow mesenchymal cells derived from type diabetes mellitus rats

Journal of Oral Science. 2018; in press. [査読有]

2. 嘉藤 弘仁, 田口 洋一郎, 山脇 勲, 奥田 麻貴子, 小石 玲子, 野口 正皓, 山内 伸浩, 今井 一貴, 高橋 宰達, 田中 昭男, 梅田 誠

高血糖状態が骨髄由来幹細胞や歯根膜幹細胞の硬組織形成に与える影響

日本歯周病学会誌. 2017; 59: 118-124. [査読有]

[学会発表](計1件)

1. 野口正皓、田口洋一郎、山脇 勲、片山 暢仁、高橋宰達、梅田 誠

高グルコース環境と *Porphyromonas gingivalis* 刺激におけるヒト骨髄間葉系細胞に対する vitamin E の影響
第

第 146 回日本歯科保存学会学術大会
2017 年 6 月 10 日 リンクステーション
青森 (青森県、青森市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 宰達 (TAKAHASHI, Saitatsu)
大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤)
研究者番号: 80734342

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

山脇 勲 (YAMAWAKI, Isao)

大阪歯科大学・歯学部・助教

田口 洋一郎 (TAGUCHI, Yoichiro)
大阪歯科大学・歯学部・准教授

梅田 誠 (UMEDA, Makoto)
大阪歯科大学・歯学部・教授