

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05022

研究課題名(和文) 歯内疾患の再生治療剤としての再生3要素球状複合体の有用性

研究課題名(英文) Usefulness of the complex of the three regenerative elements as a therapeutic agent for regeneration against endodontic diseases

研究代表者

柴 秀樹 (Shiba, Hideki)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・教授

研究者番号：60260668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：再生3要素は細胞・担体・調節因子である。LL37は高い抗菌作用と血管新生能を持つことから、有用な調節因子候補と考えられる。しかしながら、LL37による宿主細胞傷害性の報告があり、臨床応用を阻んでいる。そこで、抗菌力を維持しつつ、宿主細胞傷害性を低減したLL37複合体の開発が望まれる。研究代表者らはグリコサミノグリカン、特にヘパリンのLL37結合性に着目し、ヘパリン-LL37複合体を作製した。ヘパリン-LL37複合体はLL37と同様の抗菌性と細胞機能制御能を保持しながらも細胞傷害作用を示さなかった。このように、ヘパリン-LL37複合体は、再生3要素複合体の調節因子として有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Cells, scaffolds and regulatory factors are the three key elements for tissue engineering. LL37 possesses broad-ranged bactericidal effects and angiogenesis ability, indicating LL37 is a candidate for a regulatory factor. However, LL37 is known to exhibit cytotoxic properties for host cells. Therefore, the development of LL37-complexes, by which the cytotoxicity for host cells is eliminated without antimicrobial abilities diminished, is essential for future clinical application. We demonstrated that LL37 (10 microM) premixed with heparin (2-8 microg/ml), one of glycosaminoglycans, did not show any cytotoxic effects but retained bactericidal effects. In addition, heparin-LL37 complex had cell-functioning ability. These findings suggest that the heparin-LL37 complex is a promising regulatory factor for regenerative therapy.

研究分野：歯内療法学

キーワード：歯内療法 再生3要素 細胞機能調節因子 宿主細胞傷害性 LL37 ヘパリン-LL37複合体 抗菌活性  
抗炎症作用

## 1. 研究開始当初の背景

歯内療法域において、根管充填の代わりに、根管に歯髄・象牙質を再生させることによって、生活歯に甦らせることは、歯の長期保存という観点からその意義は非常に高い。また、根尖部周囲の大規模な骨欠損（根尖部歯周組織欠損）において、広範囲に欠損した骨、根尖部歯周靭帯とセメント質を再生させ、正常な状態に戻す治療の確立が求められている。このように、歯髄・象牙質複合体や根尖部歯周組織の再構築には、生物学的観点からのアプローチ、すなわち、再生療法が有用である。組織再生においては、足場、調節因子、細胞の3要素が鍵となる。

研究代表者らはこれまでの研究において、再生3要素のうち足場と細胞を一体としてとらえた移植体を考案した。すなわち、移植体として間葉系幹細胞 (MSC) および MSC が産生した型コラーゲンを主成分とする細胞外基質で構成される球状複合体を作製し、ラット頭蓋骨の広範囲な骨欠損の再生におけるその球状複合体の有用性を報告してきた (Cytotherapy, 2015)。また、研究代表者らは再生療法における抗菌ペプチド LL37 の有用性について基礎的研究を行い、LL37 がヒト歯髄細胞のマイグレーションを促進すること (J. Endod., 2010)、また、LL37 がヒト歯髄細胞とヒト歯周靭帯細胞の血管内皮細胞増殖因子 (VEGF, 強力な血管新生因子) の発現を促進すること (J. Periodont. Res., 2013., Int. Endod. J., 2015.)、さらに、ラット頭蓋骨欠損の骨再生を促進すること (Peptide, 2013) を示してきた。

研究代表者は、足場と細胞に調節因子をさらに加えた再生3要素複合体が歯髄・象牙質複合体や根尖部歯周組織をより効果的に再構築すると考え、LL37 を最も優れた調節因子候補者とした。しかしながら、LL37 は特に高濃度においては、宿主細胞傷害性を示すことが、様々な細胞・組織で明らかになっており、LL37 を再生3要素の一つとして臨床応用を目指すには、宿主細胞に対する LL37 の細胞傷害性の評価と細胞傷害性の低減法の開発が必要と考えた。

## 2. 研究の目的

LL37 を臨床応用するために、LL37 の細胞傷害作用のメカニズムを明らかにするとともに、LL37 の高い抗菌作用・組織再生能 (例えば、マイグレーション促進能、骨形成促進作用、血管新生作用) を維持しつつ、宿主細胞傷害性を低減した LL37 の複合体の開発に

関する基礎的研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 合成 LL37 ペプチドの抗菌性の検討

カナマイシン耐性遺伝子を導入した大腸菌 (HST08) を用いてカナマイシン (50  $\mu\text{g/ml}$ ) 含有 LB 培地中で殺菌力試験を行った。10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (NaPi; pH 6.8) で  $1.0 \times 10^7$  cells/ml に調整した大腸菌を20倍のLB溶液で希釈した後に37 $^{\circ}\text{C}$  2時間振盪培養した。引き続き、溶液をLBプレートに播種し、24時間後にコロニー形成単位 (CFU) で評価した。大腸菌に加えて、う蝕関連細菌および歯周病原細菌 (*S. salivarius*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. actinomycetemcomitans*) も実験に供した。

### (2) 合成 LL37 ペプチドの宿主細胞傷害性の検討

ヒト歯髄細胞およびヒト骨肉腫細胞株 MG-63 を様々な濃度の LL37 で刺激した。細胞数を経時的に測定するために、クリスタルバイオレット染色ならびにテトラゾリウム塩の一種である MTT を用いた分析を行った。

### (3) 合成 LL37 ペプチドの細胞傷害性発現機序の解明

ヒト歯髄細胞および MG-63 を様々な濃度の合成 LL37 で刺激し、細胞傷害性の指標である乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定した。さらに、アポトーシスで活性化されるカスパーゼ 3/7 活性を調べた。

### (4) グリコサミノグリカン (GAGs) と合成 LL37 複合体の作製とその効果

GAGs として、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸を使用した。複合体は様々な濃度の各種 GAGs を合成 LL37 (10  $\mu\text{M}$ ) と室温で1時間混和することによって作成した。

### (5) 合成 LL37 ペプチド投与時の細胞局在の検討

合成 LL37 またはヘパリン-LL37 複合体投与後の合成 LL37 の局在ならびに細胞骨格形態を観察するために、抗 LL37 特異抗体ならびにアクチンファイバーに結合するファロイジンに反応させた。観察には、オールインワン蛍光顕微鏡を使用した。

### (6) リポ多糖への結合の定量的検討 (固相結合分析)

合成 LL37 またはヘパリンをコートした 96 ウェルマルチプレートに様々な濃度のビオチン標識されたリポ多糖を添加し、合成 LL37 またはヘパリンへのリポ多糖の結合をストレプトアビジン 西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)を用いて定量的に評価した。

(7) ヘパリンビーズを用いた免疫沈降法による合成 LL37 のリポ多糖依存性乖離の検討  
合成 LL37 をヘパリンビーズと混合し、LL37-ヘパリンビーズ複合体を作製した。その後、複合体を様々な濃度のリポ多糖と室温で 1 時間反応させ、ヘパリンビーズに結合している合成 LL37 の相対量をドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE) にて検討した。

(8) 腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 分泌を指標としたヘパリン-LL37 複合体によるリポ多糖中和能の検討

ホルボールミリスチンアセテート (PMA) でマクロファージ様細胞に分化させた単球由来細胞株 THP-1 細胞を合成 LL37 またはヘパリン-LL37 複合体存在下でリポ多糖によって刺激し、24 時間後に炎症性サイトカインである TNF $\alpha$  産生量をヒト TNF-alpha 定量キットを用いて測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 合成 LL37 ペプチドの抗菌性の検討

本研究計画で使用した合成 LL37 ペプチドは 0.1  $\mu$ M から抗菌性を示し、0.5 ~ 10  $\mu$ M 濃度では CFU が 0 であった。

(2) 合成 LL37 ペプチドの宿主細胞傷害性の検討

5  $\mu$ M 以上の高濃度合成 LL37 でヒト歯髄細胞および MG-63 を刺激するとコントロールと比べて有意な細胞傷害性が認められた。

(3) 合成 LL37 ペプチドの細胞為害性発現機序の解明

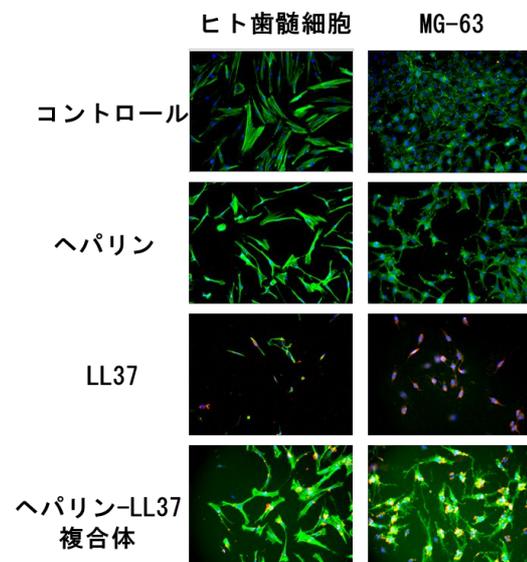
ヒト歯髄細胞および MG-63 を 2.5 ~ 40  $\mu$ M の比較的高濃度の合成 LL37 で刺激すると、LDH 活性は LL37 濃度依存的に上昇したが、カスパーゼ活性には変化はなかった。これらの結果から、LL37 の細胞傷害性はアポトーシスの誘導ではなく、細胞膜破壊によって細胞死が誘導されていることが示唆された。

(4) グリコサミノグリカン (GAGs) と合成 LL37 複合体の作製とその効果

ヘパリン (2~8  $\mu$ g/ml) を合成 LL37 (10  $\mu$ M) と混合し作製された複合体は、大腸菌、*S. salivarius*、*S. mutans*、*S. sobrinus* および *A. actinomycetemcomitans* に対する抗菌作用を維持したまま宿主細胞傷害性を顕著に低減した。

(5) 合成 LL37 ペプチド投与時の細胞局在の検討

合成 LL37 単体で刺激したヒト歯髄細胞および MG-63 においては、LL37 によって細胞死が誘導され、アクチンの染色がほとんど観察されなかった。一方、ヘパリン-LL37 複合体で刺激されたこれらの細胞は、無刺激群およびヘパリン単体で刺激した群と同様に明瞭なアクチンファイバーの伸展が認められた。投与したヘパリン-LL37 複合体中の LL37 は細胞膜近傍で陽性であったことから、ヘパリンによって細胞への取り込みや細胞膜破壊が著しく抑制されていることが明らかとなった (下図)。



(6) リポ多糖への結合の定量的検討 (固相結合分析)

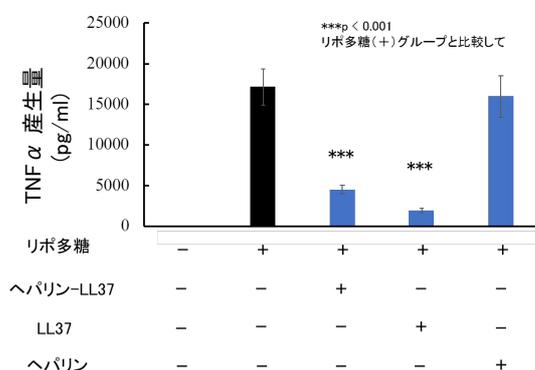
合成 LL37 を固相化したプレートでは、リポ多糖の濃度依存的な結合量増加を認められたが、ヘパリンを固相化したプレートに対してはリポ多糖への結合を認めなかった。これらの結果から、ヘパリン-LL37 複合体において、ヘパリンでなく LL37 がリポ多糖と結合することが示唆された。

(7) ヘパリンビーズを用いた免疫沈降法による LL37 のリポ多糖依存性乖離の検討

添加したリポ多糖量依存的にLL37-ヘパリンビーズ複合体中のLL37は減少したことから、リポ多糖はLL37と結合することで、LL37のヘパリンからの乖離を促進していることが示唆された。

(8) TNF $\alpha$ 分泌を指標としたヘパリン-LL37複合体によるリポ多糖中和能の検討

分化THP-1細胞において、リポ多糖刺激下では無刺激時と比較して著明なTNF $\alpha$ 分泌を認めた。ヘパリン-LL37複合体は合成LL37と同様に、リポ多糖刺激によって増加したTNF $\alpha$ 分泌量を減少させた。ヘパリン単体は、リポ多糖刺激によって促進したTNF $\alpha$ 分泌に影響を及ぼさなかった(下図)。



これらの得られた結果から、ヘパリン-LL37複合体は抗菌性およびリポ多糖中和能という点において合成LL37と同等の効果があつながら、合成LL37の細胞為害性は著しく低減されていた。このように、ヘパリン-LL37複合体は、再生3要素複合体の調節因子として有用であることが示された。今後は、再生3要素複合体中の調節因子としての有用性をさらに実証するために、ヘパリン-LL37複合体の血管新生能や骨再生能の検討が必要である。

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0件)

[学会発表](計2件)

Antimicrobial ability of Heparin-LL37 hybrid:

吉田和真, 鈴木茂樹, 中西 惇, 永安慎太郎, 小武家誠司, 柴 秀樹.

第145回日本歯科保存学会秋季学術大会

(松本市), 2016.

抗菌ペプチドLL37の宿主細胞傷害性低減を目指した複合体の開発:

吉田 和真, 鈴木 茂樹, 中西 惇, 小武家 誠司, 本山 直世, 永安 慎太郎, 平田-土屋 志津, 柴 秀樹.

第147回日本歯科保存学会秋季学術大会(盛岡市), 2017.

[図書](計0件)

[産業財産権] 出願状況(計0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0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
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

柴 秀樹 (Shiba, Hideki)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科(歯)・教授

研究者番号: 60260668

(2) 研究分担者

鈴木 茂樹 (Suzuki, Shigeki)

広島大学・病院・講師

研究者番号: 30549762

永安 慎太郎 (Nagayasu, Shintaro)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科(歯)・助教

研究者番号: 60635192

本山 直世 (Motoyama, Naoyo)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科(歯)・

助教

研究者番号：70509661

小武家 誠司 (Kobuke, Seiji)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科(歯)・

助教

研究者番号：50744794