

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11557

研究課題名(和文)天然生理活性ペプチドのヒト歯髄由来幹細胞培養・移植による骨再生能の解析

研究課題名(英文) Analysis of bone regeneration ability by human dental pulp-derived stem cell culture and transplantation using natural bioactive peptides.

研究代表者

山田 志津香 (YAMADA, Shizuka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：00363458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：培養幹細胞を骨芽細胞に分化させるためには石灰化誘導培地で培養するのが一般的であるがこれらの培地を作製するには手間がかかる上、一定の品質を保持する必要がある。それを克服するために、既製の培地を購入すると莫大な費用がかかる。研究代表者はこれまで、魚由来コラーゲンペプチド(FCP)が骨芽細胞細胞分化および石灰化を促進することを証明してきた。その結果に基づき、今回FCPを添加した培地を用いてヒト歯髄由来幹細胞(HDPSCs)の骨芽細胞への分化誘導能について生化学的に検討した。その結果、FCPは従来の石灰化誘導培地には及ばないもののHDPSCsを骨芽細胞に誘導する能力を有す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

HDPSCsを用いて、抽出したFCPが骨芽細胞への分化を促進することを分子生物学的に証明することにより、FCPの幹細胞に対する骨芽細胞誘導や骨再生の作用機序の解明に一石を投じると同時に、将来、FCPがヒトにおいても迅速、安全かつ安定的に骨芽細胞分化へ誘導する骨再生剤としての有用性を実証するEBMの一端になり得る。また、FCPは魚の骨や鱗を原料とするため、経済産業省の掲げる3R政策による資源の有効活用に貢献する上に、化学薬品と異なり、高齢者の体への負担が少なく、安価で安定した供給が得られるので、組織工学的に優秀な医用生理活性素材としてQOLの向上に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：In general, a cultured stem cell differentiates into an osteoblast using a mineralization-induced medium. However, it takes time and effort to prepare this medium. Furthermore, it is necessary to hold fixed quality. If a ready-made culture medium is purchased to overcome it, it involves enormous cost. Principal investigator has proved that a fish collagen peptide (FCP) promotes cell differentiation and mineralization in an osteoblast. On the basis of the evidence, an osteoblast differentiation potency of human dental pulp-derived stem cell (HDPSCs) using FCP-containing medium is biochemically investigated in this study. As a result, it was revealed that FCP had an osteoblast differentiation potency of HDPSCs although it was not good as the conventional mineralization-induced medium.

研究分野：歯科保存学

キーワード：魚コラーゲンペプチド 骨芽細胞 幹細胞 骨再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦では、2007年に65歳以上の人口の割合が21%を超え、諸外国に先駆けて超高齢社会に突入した。それに伴い、総人口の10%である約1,300万人が骨粗鬆症であると推定されている。日常生活に制限のない健康な生活を長く送るために、可及的に安全で安価な骨折の予防薬や治療薬の開発が急務となっている。当教室において、これまでのラットを用いた動物実験により、魚由来コラーゲンペプチド(Fish Collagen Peptide; FCP)が、一部欠損した顎骨の再生を促進させる作用を有することが判明しており、2007年に「骨再生剤及び骨を再生する方法」として特許登録を行った(特許第5229937号)。コラーゲンは石灰化における三次元的テンプレートとして重要な役割を果たしており、コラーゲンの質の変化を介してFCPの骨再生促進機構を解明することは、化学薬品と異なり、安全性が高く、安価で安定した供給の得られる医用活性素材の開発につながる。これまで、研究代表者は、FCPを用いて、前骨芽細胞(MC3T3-E1細胞)におけるコラーゲンの合成、コラーゲン翻訳後修飾関連酵素であるリシルヒドロキシラーゼ(LH)1~3、リシルオキシダーゼ(LOX)、LOXL1~4、グリコシルトランスフェラーゼ25ドメイン1(GLT25D1)に対する影響を生化学的手法により調査してきた。その結果、FCPは0.2%(w/v)の濃度で、最もコラーゲンの合成を増加させ、LH1~3、LOXL2~4およびGLT25D1の遺伝子発現増加を介してコラーゲン架橋を促進することが判明した。その後、さらなる研究により、多様な分子量を有するFCPの中で、1.8k~2.3kDaという低分子量のFCPが最もコラーゲン架橋に有益であることも明らかとなり、FCPの骨再生に対する有用性を証明した。これらのFCPの骨芽細胞に対する生理活性に着目し、従来の維持培地にデキサメタゾン、βグリセロリン酸、アスコルビン酸を添加した培地で培養間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させる手法よりも、簡便、且つ迅速に安定して骨芽細胞に分化させることができる方法を開発するためにFCPの利用を考案した。

2. 研究の目的

培養幹細胞を骨芽細胞に分化させるためには、維持培地にデキサメタゾン、βグリセロリン酸ならびにアスコルビン酸を添加したもので培養するのが一般的である。しかし、これらの培地を作製するには手間がかかる上に、一定の品質を維持するためには厳密な操作が必要となる。それを克服するために、既製の培地を購入すると莫大な費用がかかる。

Chao Liuらは、以前、加水分解された魚コラーゲンペプチド添加培地により、ラットの骨髄間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させることができることを報告した。研究代表者はこれまでの研究で得た低分子量のFCPが骨芽細胞分化・石灰化促進作用に関する知見を活かし、ヒト歯髄由来間葉系幹細胞(Human Dental Pulp-derived Stem Cells; HDPPSCs)を用いて、FCPのHDPPSCsから骨芽細胞への分化誘導能について、生化学的に検討した。

3. 研究の方法

(1) MTT Assay

本研究では、株式会社ニッピより供与された分子量約2.8kDaのFCP粉末を使用した。智歯周囲炎により抜去された第三大臼歯中の歯髄から分離されたHDPPSCsは、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科の倫理委員会により使用が承認された(許可番号: 1286-5~8)。HDPPSCsに対するFCPの細胞生活力への影響を調査するためにMTT assayを行った。96穴皿にHDPPSCsを 1×10^4 個/well播種し、5%CO₂、37℃下、10%FBS含有DMEMで培養を行った。翌日細胞の生着を確認後、総濃度が2, 0.2, 0.02mg/mLとなるようにFCP含有DMEMと交換して培養を行った。DMEMのみで培養したものをネガティブコントロール、Osteoblast Inducer Reagent (TaKaRa Clontech; OI)含有DMEMで培養したものをポジティブコントロールとした。24時間培養後、MTT Assayを行った。

(2) RT-PCR 解析

HDPPSCsを6穴皿に 5×10^4 個/well播種後、上述の同条件下でDMEMを用いて培養し、サブコンフルエント後、培地を総濃度2, 0.2, 0.02mg/mL FCPと5mM βグリセロリン酸添加DMEMに交換し、培養を行った。FCP不含の5mM βグリセロリン酸添加DMEMで培養したHDPPSCsをネガティブコントロール、OIを添加したDMEMで培養したHDPPSCsをポジティブコントロールとした。培養3日目に細胞を回収し、AGPC法にてRNAを抽出、cDNA合成後、石灰化関連遺伝子であるアルカリフォスファターゼ(ALP)、RUNX2、オステオカルシン(OCN)、コラーゲン架橋関連遺伝子であるリシルヒドロキシラーゼ(LH)1, 2の遺伝子発現を検討した。Housekeeping 遺伝子にはGAPDHを用いた。上記の遺伝子発現が最も高い濃度をFCPの至適濃度と決定した。

(3) Alizarin Red S 染色

HDPPSCsを6穴皿に 5×10^4 個/well播種後、上述と同条件で3群の培養を行った。サブコンフルエント後、培地を至適濃度のFCP、5mM βグリセロリン酸および0.2mM アスコルビ

ン酸を添加した 10%FBS 含有 DMEM に交換し、培養した。3 日おきに培地を交換した。培養 28 日目にホルマリン溶液で細胞固定後、Alizarin Red S 染色を行った。

(4) Mineralization Assay

Von Kossa 染色や Alizarin Red S 染色と異なり、細胞により沈着された石灰化塊中のハイドロキシアパタイト部分に特異的に蛍光染色液が結合することで高感度に石灰化を評価できる OsteoImage™ Mineralization Assay (Lonza)を用いて、96 穴皿に HDPSCs を 1×10^4 個/well 播種後、上述と同条件で培養して、14 日目に上記 3 群の石灰化状況を確認した。

(5) 統計学的評価

MTT Assay、石灰化関連およびコラーゲン架橋関連酵素の遺伝子発現実験、Mineralization Assay は、one-way ANOVA で検討後、Fisher's PLSD テストにより多重比較検定を行った。有意水準は、0.05 および 0.01 とした。上記実験はいずれも各群、トリプリケートで実行した。

4. 研究成果

(1) MTT Assay

24 時間培養後、吸光度測定を行った結果を図 1 に示す。ネガティブコントロールに対する 2, 0.2, 0.02mg/mL FCP 添加群および OI 添加群の吸光度比はそれぞれ 1.1 ± 0.1 , 1.1 ± 0.1 , 1.2 ± 0.0 , 1.3 ± 0.1 (平均 \pm 標準誤差)であった。OI 添加群はネガティブコントロール群と比較して有意に高い細胞生活力を示したが ($p < 0.05$)、各 FCP 添加群に関しては有意差がなかった。

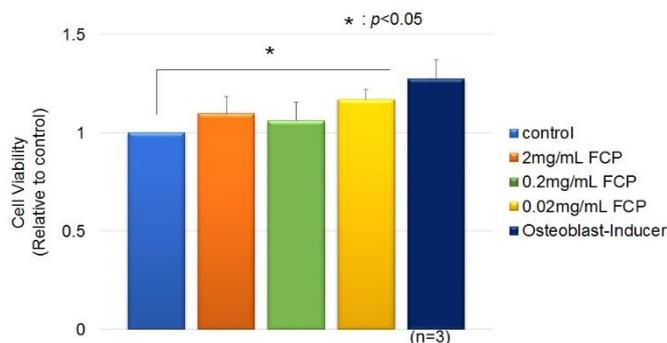


図 1 MTT Assay 結果

(2) RT-PCR 解析

培養 3 日目の RT-PCR 解析結果を図 2 に示す。

ネガティブコントロールに対する 2, 0.2, 0.02mg/mL FCP 添加群および OI 添加群の ALP における遺伝子発現比は、それぞれ、0.5, 2.1, 0.4, 1.4 倍であった。OCN の遺伝子発現比はそれぞれ 0.5, 2.2, 0.4, 1.6 倍、RUNX2 の発現比はそれぞれ 1.0, 1.1, 0.8, 1.2 倍であった。LH1 の遺伝子発現比はそれぞれ 0.5, 1, 0.2, 5.3 倍、LH2 は 1.2, 4.2, 2.2, 1.3 倍であった。これらの結果から FCP の至適濃度を 0.2mg/mL と決定し、以後の実験はこの濃度の FCP で行った。

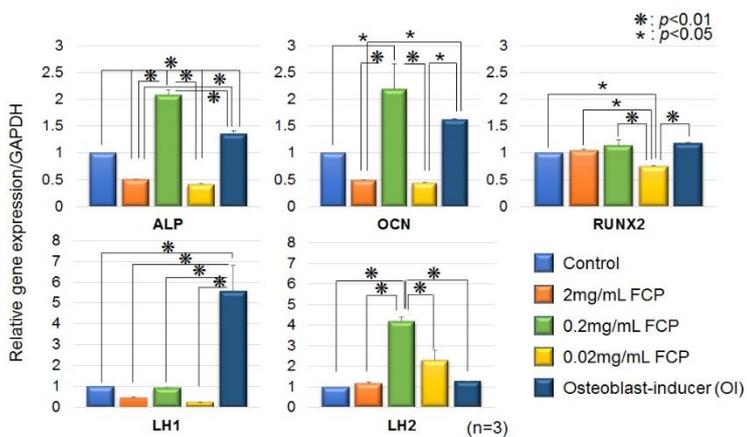


図 2 RT-PCR 解析結果

(3) Alizarin Red S 染色

培養 28 日目に行った Alizarin Red S 染色結果を図 3 に示す。(a), (b), (c) はそれぞれネガティブコントロール、0.2mg/mL FCP 添加群、OI 添加群の結果を示す。3 群全てで石灰化塊の形成が認められた。しかし、OI 添加群の石灰化塊の形成が最も多くみられ、次いで FCP 添加群、ネガティブコントロールと続いた。

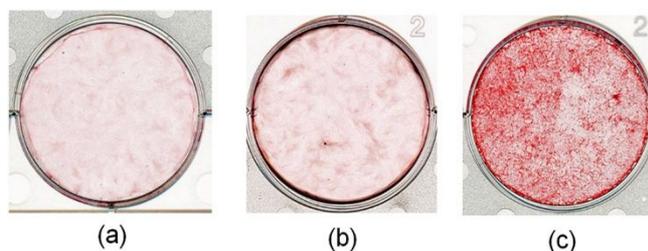


図 3 Alizarin Red S 染色結果

(4) Mineralization Assay

培養 14 日目に測定した OsteoImage™ Mineralization Assay 結果を図 4 に示す。Alizarin Red S 染色結果同様、OI 添加群が最も高い石灰化度を示し、次いで FCP 添加群、ネガティブコントロールと続いた。しかし、3 群間に統計学的有意差は認められなかった。

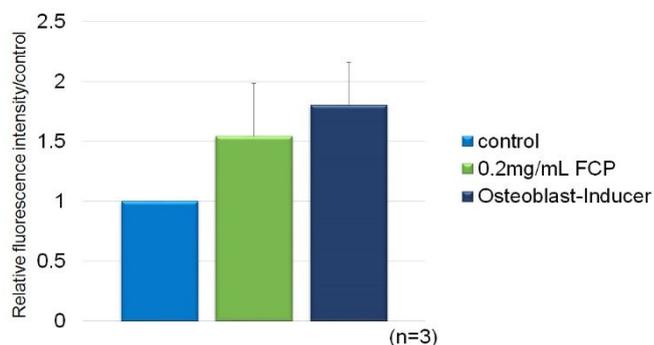


図 4 In vitro Mineralization Assay 結果

以上の結果から、0.2mg/mL という低濃度の FCP は、ヒト歯髄由来間葉系幹細胞において、石灰化関連遺伝子である ALP、OCN、RUNX2 ならびにコラーゲン架橋に関連する酵素である LH2 の遺伝子発現を増強させることが明らかとなり、さらに石灰化も促進したことからデキサメタゾンや β グリセロリン酸と同様に、FCP 単独でも幹細胞を骨芽細胞に誘導する能力を有する可能性が示唆された。

< 引用文献 >

Chao Liu, Jiao Sun: Potential application of hydrolyzed fish collagen for inducing the multidirectional differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomacromolecules*. 15(1): 436-443, 2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 Sugimoto K., Matsuura T., Nakazono A., Igawa K., Yamada S., Hayashi Y. | 4. 巻 2018 |
| 2. 論文標題 Effects of hypoxia inducible factors on pluripotency in human iPS cells | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Microsc Res Tech | 6. 最初と最後の頁 1-6 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jemt.23032 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Matsuura T., Sugimoto K., Kawata-Matsuura VKS., Yanagiguchi K., Yamada S., Hayashi Y. | 4. 巻 60 |
| 2. 論文標題 Cell migration capability of vascular endothelial growth factor into the root apex of a root canal model in vivo | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 J Oral Sci | 6. 最初と最後の頁 634-637 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.17-0456 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 山田志津香, 池田 毅, 山本耕平, 柳口嘉治郎, 林 善彦 | 4. 巻 59(5) |
| 2. 論文標題 魚コラーゲンペプチドの骨欠損部再生への有用性 | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌 | 6. 最初と最後の頁 425-431 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） http://doi.org/10.11471/shikahozon.59.425 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 山田 志津香, Mark Luigi F. Capati, 中園 史子 |
| 2. 発表標題 分子量の相違による魚由来コラーゲンペプチドの骨芽細胞培養系におけるコラーゲン翻訳後修飾関連酵素に対する影響 |
| 3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中園 史子, Mark Luigi F. Capati, 山本 耕平, 山田 志津香 |
| 2. 発表標題 ヒト歯髄由来幹細胞における魚コラーゲンペプチドのコラーゲン翻訳後修飾酵素への影響 |
| 3. 学会等名 第148回日本歯科保存学会春季学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 杉本 浩司, 松裏 貴史, 中園 史子, 山田 志津香, 林 善彦 |
| 2. 発表標題 STAT3を介したヒトiPS細胞の低酸素培養における多能性維持 |
| 3. 学会等名 第149回日本歯科保存学会秋季学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山田 志津香, 山本 耕平, 柳口 嘉治郎, 林 善彦, 庵原 耕一郎, 中島 美砂子 |
| 2. 発表標題 魚コラーゲンを足場材としたイヌにおける歯髄再生療法 |
| 3. 学会等名 第146回日本歯科保存学会春季学術大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yamada S., Yamamoto K., Matsuura T., Mark Luigi F. Capati, Nakazono A., Nakashima M., Hayashi Y. |
| 2. 発表標題 Fish Collagen Peptide Induces Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells to Osteoblasts |
| 3. 学会等名 International Association for Dental Research (IADR) Pulp Biology Regeneration Group (PBRG) Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山田 志津香、池田 毅、柳口 嘉治郎、山本 耕平、林 善彦 |
| 2. 発表標題 魚コラーゲンペプチドの骨再生への有用性 |
| 3. 学会等名 第144回日本歯科保存学会春季学術大会 |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山田 志津香 |
| 2. 発表標題 魚コラーゲンペプチドの骨芽細胞への分化と石灰化の促進作用 |
| 3. 学会等名 第14回日本再生歯科医学会学術大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
| | | | |