

令和元年6月10日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20476

研究課題名(和文) エムドゲイン由来合成ペプチドを応用した新規覆髄材料の創製

研究課題名(英文) Thr creation of newly dental pulp capping reagent applied by EMD peptide

研究代表者

嘉藤 弘仁 (Kato, Hirohito)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70745348

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)： エムドゲイン(EMD)を用いた基礎研究からアメロジェニンexon5が硬組織誘導能を有することを発見した。本研究の目的は歯髄組織の恒常性に重要な役割を果たすヒト歯髄幹細胞(DPSC)に対するエムドゲイン由来合成ペプチド(SP)の影響について検討を行った。

SPはDPSCの細胞増殖能と硬組織分化能を促進することが示唆された。またSP添加群ではカルシウム・リン比の上昇が認められたことからSPは早期に成熟した硬組織形成を誘導することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喪失歯の70%以上が無髄歯である。したがって、歯髄を保存することによって、患歯を長期間機能させることは非常に重要な意義を有する。現在、歯髄保存療法で用いる覆髄材として水酸化カルシウム製剤やMTAセメント等が臨床で応用されている。

しかしながら、それら旧来の覆髄材はその長期安定性が乏しいこと、象牙質の再生に長期間を要するという問題があり、現在もその問題点は解決されていない。そこで、本研究ではこの新規合成ペプチドの高い硬組織形成能力を利用することによって、早期に露髄面に象牙質を再生させ、より迅速に、より確実に、患部歯髄の長期保存を獲得することが可能になると考えている。

研究成果の概要(英文)： We designed a synthetic amelogenin exon 5 encoded peptide (SP), which was based on a protein produced by cells in response to enamel matrix derivative (EMD). In the present study, we investigated the effect of the SP on potentiation of cell proliferation and osteogenesis in dental pulp stem cells (DPSCs), which play a critical role in dental pulp homeostasis. The SP significantly promoted cell proliferation and cell migration in DPSCs. Treatment with SP enhanced the expression levels of markers of osteogenic differentiation and mineralization. These results suggest that amelogenin exon 5 could contribute to dental pulp tissue repair and mineralization.

研究分野： 歯科保存治療系歯学

キーワード： エムドゲイン 覆髄

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

1. 研究開始当初の背景

エムドゲイン(EMD)は歯周組織の再生治療を目的に応用されている製剤であり、現在に至るまで10数年間広く臨床応用され、著しい再生効果を示している。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。

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。

EMDを歯髄組織に作用させると、象牙質の再生が誘導されることが明らかになっている。またEMDをヒト歯髄細胞に作用させると、細胞増殖能、硬組織分化能が促進することが明らかになっている。

したがって、EMD由来の新規合成ペプチドにおいても同様に、ヒト歯髄幹細胞の細胞増殖と硬組織分化誘導が促進することによって、象牙質様硬組織の再生が誘導されることが予想される。また組織学的・分子生物学的レベルで、その作用機序の解明が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は歯髄温存療法における象牙質再生に有用な新規覆髄材料の開発を目的として、EMD由来新規合成ペプチドに着目した。このEMD由来新規合成ペプチドはEMDを用いた基礎研究から得られた本研究チームのオリジナルの硬組織形成を促進するペプチドである。申請者はこの合成ペプチドが硬組織再生に重要な役割を果たす歯根膜幹細胞と間葉系幹細胞の硬組織形成能を早期に促進する作用があることを発見した。そこでこのEMD由来新規合成ペプチドが象牙質再生にも有用であるのか、その作用機序をin vitro、in vivoともに検討し、新規歯髄温存療法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)【in vitro 実験での検討】

Lonza社よりヒト歯髄幹細胞(DPSC)の提供を受け、実験に必要な細胞数を確保する。九州歯科大学北村教授よりラット象牙芽細胞株(KN-3)の提供を受け、実験に供試した。新規合成ペプチドをDPSCに作用させ、遺伝子・タンパクを抽出する。

マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析、ウエスタンブロット法によるシグナルタンパクの発現を検討し、新規合成ペプチドの作用機序を分子生物学的に明らかにする。

(2)【in vivo 実験での検討】

組織標本の作製(覆髄試験)を行う。ラウンドバー#1にて、ラット歯人工露髄面(上顎第一大臼歯)を形成する。形成した露髄面に新規合成ペプチドを応用し、象牙質が再生されるか検討する。また覆髄材料として頻繁に使用される水酸化カルシウム製剤(カルシックペクス®)とMTAセメント(Pro Root®)を用いて、旧来の覆髄材料との比較実験も実施する。

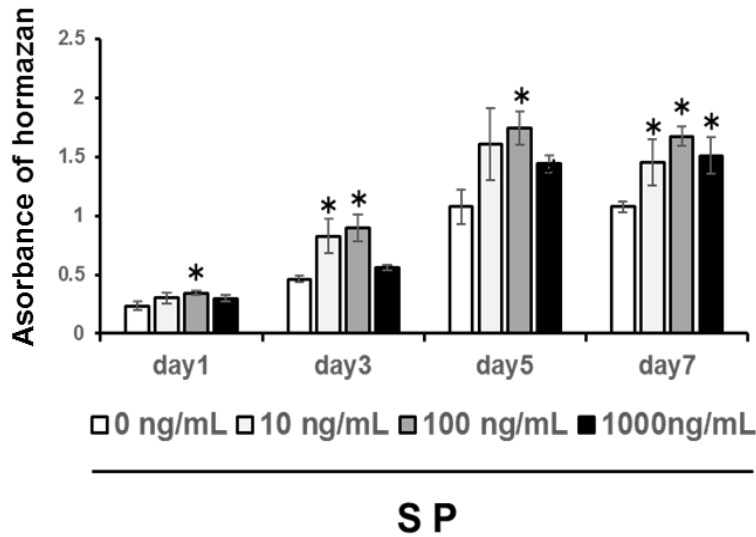
組織学的評価(再生象牙質の病理組織学的評価と三次元構造解析)を行う。覆髄後(7日、14日後)に麻酔薬過剰投与によりラットを安楽死させ、組織を採取する。そして固定・脱灰・パラフィン包埋し、組織標本作製する。

組織学的検索として、(H-E染色、免疫染色)を検討する。H-E染色で、再生された象牙質の二次元的構造の評価を行う。また免疫染色では、象牙質再生マーカーである象牙質シアルタンパク、ホスホフォリンの抗体を用いて病理組織学的に象牙質再生を評価する。

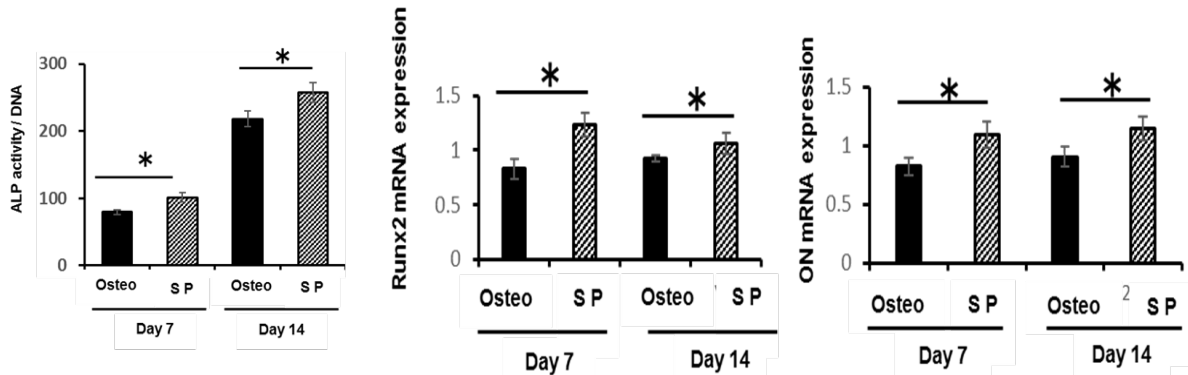
4. 研究成果

【in vitro 実験での検討】

SPのHDPSCに対する細胞増殖能への影響はSP添加1日、3日、5日、7日の培養後の評価において、SP添加群では対照群と比較して有意に高い値を示し、100 ng/ml濃度のSP添加群が最も有意に高い値を示した。(下図参照)

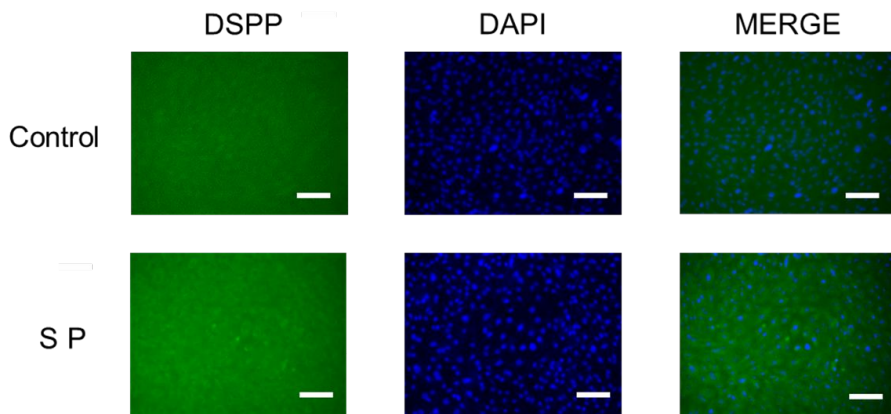


HDPSC に対する EMD 由来合成ペプチドの硬組織分化への影響は培養開始 7 日, 14 日において ALP 活性, カルシウム析出量, 石灰化物形成能を有意に促進し, 培養開始 7 日において SP 添加群で有意にカルシウム・リン比の上昇が認められた。



SP 添加群において ERK1/2, JNK, p-38 タンパク発現のリン酸化が誘導されることが明らかになった。

SP は KN-3 の細胞増殖能, ALP 活性, 石灰化物形成能, DSPP mRNA 発現を有意に促進した。



したがって, SP は歯髓細胞と象牙芽細胞の硬組織形成能を促進し, 歯髓保存療法における覆髓材料として有用である可能性が示唆された。

【in vivo 実験での検討】

ラット臼歯に露髓面を作成し組織標本を作製した。現在, H-E 染色, 免疫染色による組織学的検索を行っており, 近日中に成果報告を歯科保存学会などの関連学会で発表する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

The Enhancing Effects of Amelogenin Exon 5-Encoded Peptide from Enamel Matrix Derivative on Odontoblast-Like KN-3 Cells

Hirohito Kato, Yoichiro Taguchi, Kazutaka Imai, Yaru Ruan, Yu-Wei Tsai, Yi-Chie Chen, Muneyasu Shida, Reiko, Taguchi, Kazuya Tominaga and Makoto Umeda
App Sci 2018; 8: 1890.

<https://doi.org/10.3390/app8101890> [査読有]

〔学会発表〕(計 1 件)

ヒト歯髄幹細胞に対するアメロジェニンペプチドの影響

嘉藤弘仁, 田口洋一郎, 今井一貴, Ruan Yaru, 野口正皓, 山内伸浩, 山脇 勲, 富永和也, 田中 昭男, 梅田 誠

第 148 回日本歯科保存学会学術大会

2019 年 6 月 14 日 横浜みなとみらいホール (神奈川県、横浜市)

6 . 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：今井 一貴

ローマ字氏名：(IMAI, Kazutaka)

研究協力者氏名：RUAN, Yaru

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。