

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月21日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17328

研究課題名(和文) 歯髄、脂肪由来MSCsとアメロゲニン由来新規ペプチドの歯周組織再生への応用

研究課題名(英文) Application to periodontal tissue regeneration by a new amelogenin peptide combined with mesenchymal stem cells derived from dental pulp and adipose.

研究代表者

栗田 哲也(Awada, Tetsuya)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：90758179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト骨芽細胞株、ヒトセメント芽細胞株などの歯周組織構成細胞およびヒト脂肪由来MSCs、ヒト歯髄由来MSCsなどの間葉系幹細胞に対するアメロゲニンペプチドの影響についての検討を行った。アメロゲニンペプチドの添加によって、歯周組織構成細胞および歯髄、脂肪由来MSCsの細胞増殖や基質産生能などの代謝に影響を及ぼすことが明らかになった。また、アメロゲニンペプチドのシグナル伝達機構について検討を行った結果、アメロゲニンペプチド添加により、脂肪由来MSCsのERK1/2のリン酸化を介してMSCsの代謝に影響を及ぼしてい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

歯科領域でしばしば遭遇する骨欠損において、既存の自家骨移植に代わる骨再生治療法は未だ確立されておらず、本研究では生体内蛋白であるアメロゲニンを用いた骨再生療法の確立を目的としている。アメロゲニンの活性部位を安全で安定的な機能性ペプチド創薬として臨床応用を目指す点において新規性があり、生体材料と組み合わせる点において学術的な意義がある。さらにアメロゲニンペプチドが歯周組織細胞や間葉系幹細胞の代謝を調節する機能を有することが明らかとなり、歯周病患者などの歯周組織再生療法への臨床応用の実現につながる成果と考えられ、社会的にも貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of the amelogenin peptide on the metabolism of human MSCs and periodontal tissue cells. As a result, we identified amelogenin peptide regulates the proliferation and differentiation of these cells. Furthermore, an examination of the intracellular signaling pathway showed that amelogenin peptide increased the proliferation of MSCs via an interaction with LAMP1 and the MAPK-ERK signaling pathway.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：アメロゲニン バリアメンブレン 間葉系幹細胞 歯周組織再生

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

#### 1. 研究開始当初の背景

歯科領域において、骨欠損部の骨再生は待望される課題の1つである。歯周病は国民の8割が罹患する国民病とされ、重篤化すると歯槽骨吸収による骨欠損に続き、歯の動揺・脱落が生じ、咀嚼や嚥下機能の低下を招く。また、口蓋裂患者のように先天性に口腔内の骨欠損を有する場合においては、顎裂部の歯の萌出が妨げられたり、発音障害をきたすこともある。このような喪失した歯槽骨の回復や口蓋裂患者における顎裂閉鎖に対する治療として、現在では自家骨移植が最も確実な方法として広く用いられている。しかしながら、自家骨移植は骨採取部位への侵襲や採取できる骨量に限界があるといった問題を有しているため、バリアメンブレンを用いた骨再生誘導法(GBR法)や、ハイドロキシアパタイト、 $\beta$ -TCPなどの骨補填材を併用して移植する方法、そして骨誘導因子である BMP2、7 および塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、多血症血小板(PRP)などの生体内に存在する生理活性物質などの方法が検討されているが、未だ十分な治療結果は得られていない。近年、ブタの幼若エナメル蛋白から抽出された Enamel matrix derivative (EMD) による歯周組織再生療法が行われ、良好な治療成績が報告されている。申請者らは EMD の主成分であり、エナメル質形成に重要な役割を持つアメロゲニンに着目し、歯周組織構成細胞における生理活性について検討を重ねてきた。その結果、培養ヒト MSCs の増殖能および基質産性能を亢進させること(Tanimoto *et al.*, *J Periodontol* 83(5): 672-679, 2012)、培養ヒトセメント芽細胞に生理活性を有すること(Kunimatsu *et al.*, *J Periodontol* 82(11): 1632-1638, 2011)を明らかにした。さらにアメロゲニンの活性部位を機能性ペプチドとして精製して用いることにより、安全で安定的な効果が得られやすいと考えた。

近年、再生医療分野において、細胞、生理活性因子、足場となる生体材料を組み合わせる組織再生を誘導する生体組織工学 (tissue engineering) の研究が注目されている。細胞に種々の生体材料を組み合わせ、再生の場を構築することにより、再生過程の初期の適切な環境が設定でき、自己修復の機能を誘導することが可能となれば、自己組織中の幹細胞や前駆細胞等が増殖し、周辺の成熟細胞からの分化誘導によって正常組織や臓器が再生すると考えられる。歯周組織の再生においては、セメント芽細胞や骨芽細胞に分化しうる歯根膜由来間葉系幹細胞が歯根面に誘導されることが必要であると考えられているが、生体内の幹細胞は加齢とともに減少し、また歯周病患者では歯根膜組織の破壊により、歯根膜に内在する幹細胞のみでは、十分な再生効果を得ることが難しい。そこで、他の組織より採取した幹細胞を移植することにより、歯周組織再生を促す治療法の開発が進められ、その中でも採取が容易で患者への負担が少なく低侵襲性であることから、歯髄由来間葉系幹細胞および脂肪由来間葉系幹細胞が注目されている。しかしながら、口腔領域における骨再生のための歯髄由来間葉系幹細胞および脂肪由来間葉系幹細胞の応用については、これまでほとんど報告がみられない。申請者らは、アメロゲニンペプチドと間葉系幹細胞、生体材料を組み合わせる欠損部に移植することにより、これまで自己の細胞修復能を発揮しづらかった歯周病患者において、歯周組織再生効果の限界の克服と適応症の拡大が期待できると考えた。アメロゲニンペプチドをバリアメンブレンに固定し、間葉系幹細胞と一緒に喪失した歯周組織の歯根面に応用することにより、歯肉上皮や歯肉結合組織の増殖から組織再生のスペースを確保しつつ、幹細胞のセメント芽細胞および骨芽細胞への増殖や分化を誘導し、より効果的に歯周組織再生を促進できるものと予想される。

## 2. 研究の目的

歯科領域でしばしば遭遇する骨欠損において、既存の自家骨移植に代わる骨再生治療法は未だ確立されていない。申請者らは、これまで生体内蛋白であるアメロゲニンを用いた骨再生療法の確立を目的とし、様々な検討を行ってきた結果、アメロゲニンペプチドと間葉系幹細胞、生体材料を組み合わせることで欠損部に移植することにより、これまで自己の細胞修復能を発揮しづらかった歯周病患者において、歯周組織再生効果の限界の克服と適応症の拡大が期待できると考えた。アメロゲニンペプチドをバリアメンブレンに固定し、間葉系幹細胞と一緒に喪失した歯周組織の歯根面に応用することにより、歯肉上皮や歯肉結合組織の増殖から組織再生のスペースを確保しつつ、幹細胞のセメント芽細胞および骨芽細胞への増殖や分化を誘導し、より効果的に歯周組織再生を促進できるものと予想された。また、これまで口腔領域での骨再生に応用した報告が少なく、低侵襲で採取可能な歯髄由来間葉系幹細胞および脂肪由来間葉系幹細胞に対するアメロゲニンペプチドの影響を明らかにすることによって、アメロゲニンペプチドの作用機序の解明や、臨床応用の実現も視野に入れた重要な成果が得られるものと期待された。以上から、新規アメロゲニンペプチド創薬をさらに効率的に臨床応用するため、アメロゲニンペプチド、吸収性 GTR メンブレンと間葉系幹細胞の 3 つを組み合わせた新規歯周組織再生誘導治療法の確立を目指すことを目的とし、本研究を行った。

## 3. 研究の方法

ヒト骨芽細胞株、ヒトセメント芽細胞株、ヒト脂肪由来 MSCs、ヒト骨髄由来 MSCs を用いて以下の検討を行った。

### (1) アメロゲニンペプチド添加が各細胞に及ぼす影響についての検討

アメロゲニンペプチド添加が細胞増殖能に及ぼす影響について検討するため、ELISA BrdU assay および MTS assay を用いて解析した。また、アメロゲニンペプチド添加が基質産生能に及ぼす影響について検討するため、骨分化誘導培地にて培養を行い、アメロゲニンペプチドを添加し、骨分化誘導後のアルカリフォスファターゼ (ALP)、骨シアロ蛋白 (BSP) などの骨代謝マーカーの遺伝子発現について、定量 PCR 解析を行った。また、骨代謝マーカーの蛋白質発現レベルについて、定量 Western blot 解析を行った。

さらに、アメロゲニンペプチドのシグナル伝達機構について、MAPK 経路として知られている ERK1/2 および p38、JNK・SAPK と Wnt/ $\beta$ -catenin のリン酸化蛋白質発現量について定量 Western blot 解析を行った。また、アメロゲニンに対する細胞膜レセプターとして報告されている LAMP1 をブロックし、詳細なシグナル伝達経路の検討を行った。

### (2) アメロゲニンペプチドの生体材料への固定法とアメロゲニンペプチド固定が各細胞に及ぼす影響についての検討

金基板表面にアメロゲニンペプチドをカルボジイミド法を用いて固定し、アメロゲニンペプチドの結合量を SPR 法を用いて定量・測定した。また、アメロゲニンペプチド固定が各培養細胞に及ぼす影響について検討を行った。細胞培養プレートにアメロゲニンペプチド固定基板を設置し、固定基板上で各細胞の培養を行い、ELISA BrdU assay および MTS assay を用いて細胞増殖能の検討を行った。同様に、アメロゲニンペプチド固定基板上で各細胞の培養および骨分化誘導を行った後、ALP、BSP などの骨代謝マーカーの遺伝子発現について、定量 PCR 解析を行い、基質産生能への影響を検討した。

### (3) アメロゲニンペプチド固定メンブレンと MSCs 移植が免疫不全ラット頭蓋骨欠損部の骨再生に及ぼす影響の検討

アメロゲニンペプチド固定メンブレンを成形した後、細胞培養ディッシュ中でヒト脂肪由来 MSCs、ヒト骨髄由来 MSCs を播種し、24 時間細胞を定着させる。免疫不全ラット頭蓋骨に直径 6mm の骨欠損を作製し、骨再生の経日的変化について X 線写真を用いた経時的検討を行う。また、マイクロ CT を用いて三次元的に解析を行い、骨再生が達成されるか否かを評価する。さらに、ラットを灌流固定し、頭頂骨を摘出・脱灰した後、組織切片を作製する。ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行うとともに、骨代謝関連マーカーの免疫組織化学染色を用いて評価する。

#### 4 . 研究成果

( 1 ) アメロゲニンペプチドの添加により、歯周組織細胞および歯髄、脂肪由来 MSCs の細胞増殖能は 4 日目または 6 日目の生細胞数の有意な増加、DNA 合成量の増加が認められた。また、アメロゲニンペプチド添加により、ヒト骨芽細胞、ヒト骨髄由来 MSC s などの培養細胞は、ALP や BSP などの骨代謝マーカーの遺伝子発現量や蛋白質発現量の増加をもたらす、基質産生能に影響を及ぼすことが明らかになった。また、アメロゲニンペプチド添加時の脂肪由来 MSCs の細胞増殖におけるシグナル伝達機構について検討を行った結果、脂肪由来 MSCs の ERK1/2 のリン酸化蛋白質発現の増加と、ERK1/2 のプロッキングによりこれらの減少が認められたことから、アメロゲニンは MAPK-ERK 経路を介して MSCs の代謝に影響を及ぼしていることが示唆された。

( 2 ) 金基板表面にカルボジイミド法を用いてアメロゲニンペプチドを固定し、SPR 装置を用いて測定したアメロゲニンペプチドの結合量は 13ng/cm<sup>2</sup>であった。また、細胞培養プレートにアメロゲニンペプチド固定基板を設置し、その上でヒト骨髄由来 MSCs の培養を行ったところ、生細胞数や DNA 合成量は増加し、細胞増殖能は有意な亢進が認められた。また、ヒト骨髄由来 MSC s において ALP などの骨代謝関連遺伝子発現量は増加を認め、MSC s の基質産生能は亢進する傾向が認められた。吸収性 P(LA/GA)メンブレン表面に紫外線グラフト重合を用いてアメロゲニンペプチドを固定・定量する方法については、固定について安定した結果が得られなかったため今後さらに検討を行う予定である。

( 3 ) アメロゲニン固定メンブレンと MSCs 移植が免疫不全ラット頭蓋骨欠損部の骨再生に及ぼす影響の検討については進捗が遅れ未実施であるため、今後吸収性 P(LA/GA)メンブレンに対するアメロゲニンペプチドの固定・定量方法について再検討を行い、確定した後に実施予定である。

以上の結果より、アメロゲニンペプチドは歯周組織細胞や脂肪由来、骨髄由来 MSCs に対して細胞増殖や基質産生を介して代謝調節機構をもつことが明らかとなり、またアメロゲニンペプチドの添加と同様に生体材料に固定しても効果を発揮できることが明らかとなった。これらのことから吸収性バリアメンブレンなどの生体材料に対してアメロゲニンペプチド、間葉系幹細胞を組み合わせることで、自己の細胞修復能を発揮しづらかった歯周病患者においても効率的に骨再生を誘導できる可能性が示唆された。

#### 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 4 件 )

Ando K., Kunimatsu R., Awada T., Yoshimi Y., Tsuka Y., Sumi K., Horie K., Abe T., Nakajima K., 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. ( 査読有 )  
DOI:10.2174/1381612824666180816093227

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*, 501 (1), 193-198, 2018.

DOI:10.1016/j.bbrc.2018.04.213 (査読有)

Oki N., Abe T., Kunimatsu R., Sumi K., Awada T., Tsuka Y., Nakajima K., Ando K., Tanimoto K. The role of vascular endothelial growth factor and mesenchymal stem cells during angiogenesis. *Biomedical Research* 2018(29), Issue 15, 2018. (査読有)

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*. 501(1): 193-198, 2018. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

Awada T., Kunimatsu R., Tsuka Y., Tanimoto K. The C-terminus of the amelogenin peptide influences the proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. 2018 Taiwan International Orthodontic Forum (Taipei), 2018.

〔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：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。