

令和元年6月12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：17K17330

研究課題名（和文）天然由来フラボノイドとアメロゲニンペプチド創薬を利用した歯根吸収予防治療への応用

研究課題名（英文）Application to prevent and treat root absorption using naturally derived flavonoids and amelogenin peptide drug discovery.

研究代表者

吉見 友希 (Yoshimi, Yuki)

広島大学・病院（歯）・病院助教

研究者番号：50707081

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、機能性アメロゲニンペプチドのセメント質誘導効果と、フラボノイド類化合物であるバイカリンのOPG発現効果に着目し、歯周組織の代謝調節機構に及ぼす影響について明らかにするとともに、アメロゲニンペプチドとバイカリンを併用することにより、矯正歯科治療中に生じる歯根吸収の発症を予防する新規治療法を確立することを最終的な目的とし、アメロゲニンペプチドおよびバイカリンの歯周組織構成細胞における影響、そのシグナル伝達経路と、歯根吸収抑制効果について動物実験による検討を行った。その結果、アメロゲニンペプチドおよびバイカリンは歯根吸収抑制に効果的であ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

歯根吸収は、矯正歯科治療における副作用のうち、最も高頻度に認められるにも関わらず、発症機序の詳細は未だ解明されていない。歯根吸収のリスク因子は報告されているものの、現在のところ効果的な予防法は存在しない。そこに、安全で安定的なアメロゲニンペプチドを日常歯科臨床で行われている方法で投与する点や、健康補助食品としても注目されているフラボノイド類化合物を用いる簡便さが本研究の特徴である。歯の移動における機能性アメロゲニンペプチドおよびフラボノイド類化合物の作用機序を解明することは、歯根吸収の発症機序の解明や、歯周組織構成細胞間の相互作用の鶏鳴に貢献するため学術的に高い意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the cementogenic effect of functional amelogenin peptide and the OPG expression effect of baicalin, which is a flavonoid compound. First, we examined the effects of amelogenin peptides and baicalin on periodontal tissue cells. We also verified the signal transduction pathway. Lastly, animal studies were conducted on the root resorption suppressing effect. As a result, it was suggested that amelogenin peptide and baicalin were effective in suppressing root resorption.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：アメロゲニン 歯根吸収

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

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療は、歯周組織の骨リモデリングを利用して歯を移動させる治療であるが、これに伴う副作用の一つに歯根吸収が挙げられる。歯根吸収は臨床症状を伴うことなく進行し、時に治療の中断を余儀なくされたり、矯正歯科治療後の安定性に大きな影響を及ぼす。歯根吸収の発症因子として、過度な矯正力や治療の長期化に加えて、不正咬合の状態、歯根の形態、および骨代謝疾患などの全身的要因が挙げられる。しかしながら、吸収した歯根を修復再生させる治療法はこれまでのところ確立されていない。もし、矯正歯科治療中に歯根吸収の予防処置を行うことができれば、より安全で安定した矯正歯科治療を行うことが可能となる。

アメロゲニンは、歯の発生過程においてエナメル芽細胞より分泌される細胞外基質の90%を占める蛋白質である。硬組織を無細胞性に誘導する働きを有しており、エナメル質やセメント質形成に関与している。近年、ブタの幼若エナメル蛋白抽出物であるエムドゲイン®が製品化され、組織再生療法の一つとして臨床的に有用であることが示唆されている。しかしながら、エムドゲイン®は多種のエナメル蛋白を含んでおり、どの構成成分が組織再生効果に関与しているのかは明確にされていない。また、動物由来蛋白を用いていることから抗原性や品質の安定性は定かでない。申請者らはこれまでに、エナメル蛋白の主成分であるアメロゲニンに着目し、ヒト完全長アメロゲニンを精製するとともに、歯周組織構成細胞への影響について検討を重ね、アメロゲニンがヒトセメント芽細胞および間葉系幹細胞における細胞増殖能および基質産生能を亢進させることを明らかにした。しかしながら、アメロゲニンは生体内では酵素により様々な断片に分解される。また、完全長アメロゲニンは、C末端側に親水性領域、N末端側に疎水性領域を持つため、強い極性を帯びており、生理的条件下では凝集して不溶性であり、十分な生理活性が発揮できない。そこで、申請者らは、アメロゲニンの安定した効果を引き出すために、その活性部位の探索を行ってきた。これまでの検討により、アメロゲニンの親水性領域であるC末端側に活性部位が存在することを明らかにした。さらに、アメロゲニンの活性部位を含む機能性アメロゲニンペプチドは、ヒト培養セメント芽細胞の増殖及び分化を亢進させることを解明した。しかしながら、機能性アメロゲニンペプチドの詳細な作用機序や生体内への有効性については未だ十分な検証がなされておらず、臨床応用に向けて更なるデータの構築と検証が必要である。

Osteoprotegerin (OPG) は破歯細胞の分化誘導を阻害することで知られている。Zhaoらは、ラットへの局所的 OPG 遺伝子導入により、歯根吸収が抑制されることを報告している。また、菅原らは同処置により、セメント質の新規添加が生じることを報告している。これらの研究により、ラットのセメント質において、OPG の発現促進により歯根吸収を抑制させることが示唆されたが、矯正歯科臨床において遺伝子導入を併用することは、技術的および倫理的にも困難であり、より安全で簡便な方法の探索が求められる。

フラボノイド類化合物の一種であるバイカリンは、生薬の黄芩 (オウゴン) の主成分であり、抗菌、抗炎症作用および骨添加活性などの作用を有することが知られている。近年、バイカリンは骨芽細胞において Wnt/ β -カテニン経路を介して OPG の遺伝子発現を促進することが報告された。しかしながら、バイカリンがセメント芽細胞および歯周組織構成細胞に対してどのような影響を及ぼすのかは明らかにされていない。そこで申請者らは、バイカリンの OPG 発現亢進作用と、天然由来である安全性に着目し、バイカリンが歯周組織に与える影響について検証を重ねてきた。これまでの検討により、バイカリン添加によりヒト培養セメント芽細胞の石灰化能が亢進することを明らかにした。

以上の背景より、アメロゲニンペプチドを矯正歯科治療へ適用させることにより、セメント質の誘導が期待される。また、バイカリンにより矯正歯科治療中の歯周組織における OPG の代謝を調節することで、歯根吸収を抑制する効果が予想されることから、アメロゲニンペプチドとバイカリンを併用した歯根吸収を予防する新たな治療法の確立を目指す本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果を発展させ、機能性アメロゲニンペプチドとフラボノイド類化合物バイカリンにおける歯周組織の代謝調節機構に及ぼす影響を解明し、これらを利用した歯根吸収予防法を確立することを究極の目的とする。

歯根吸収は、矯正歯科治療における副作用のうち、最も高頻度に認められるにも関わらず、発症機序の詳細は未だ解明されていない。歯根吸収のリスク因子は報告されているものの、現在のところ効果的な予防法は存在しない。本研究では、歯根吸収リスクが高いと判定された場合の積極的な歯根吸収予防法の確立を目的としているところに独創性がある。また、安全で安定的なアメロゲニンペプチドを日常歯科臨床で行われている歯根膜内注射法を用いた方法で投与する点や、健康補助食品としても注目されているフラボノイド類化合物を用いる簡便さが特徴である。そして、動物を用いた実験的歯牙移動に対する機能性アメロゲニンペプチドおよびフラボノイド類化合物の効果を比較検討することにより、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る。さらに、歯の移動における機能性アメロゲニンペプチドおよびフラボノイド類化合物の作用機序を解明することは、歯根吸収の発症機序の解明や、歯周組織構成細胞間の相互作用の解明に貢献するため、学術的に高い意義があると考えられ、本研究が歯科医学の進歩にも大きな貢献を果たすと考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、歯周組織に対する機能性アメロゲンペプチドおよびフラボノイド類化合物の一種であるバイカリンの影響を解明し、歯根吸収を積極的に予防する治療法を確立することを目的とした計画を立案し、以下の研究を行った。in vitro 実験系では、歯周組織構成細胞として、ヒトセメント芽細胞 (HCEM)、ヒト歯根膜細胞株 (HPL) を用い、以下の検討を行った。機能性アメロゲンペプチドは、これまでの研究により明らかとなった配列で、医学生物学研究所に依頼し、工業的に作製したものをを用いた。

(1) 機能性アメロゲンペプチドおよびフラボノイド類化合物バイカリンの歯周組織構成細胞における影響について

各培養細胞に対し、機能性アメロゲンペプチドおよびバイカリン添加による細胞増殖への影響について MTS assay、ELISA RedU assay を用いて解析を子なした。さらに生細胞イメージングシステムを用いてリアルタイムに解析を行った。

各細胞の基質代謝能の検討では、アメロゲンペプチドおよびバイカリン添加を行った際の骨代謝マーカー {アルカリフォスファターゼ (ALP)、I 型コラーゲン、Bone sialoprotein (BSP) など}、骨吸収マーカー {receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)、OPG など} およびセメント質特異的マーカー (CEMP1、CP-23 など) の発現レベルについて遺伝子解析および western blot 解析を行った。また、ALP 活性および培養液中の Ca レベルを定量評価し、アリザリンレッドおよびバンコッサ染色法を用いて石灰化能の検討を行った。

(2) 機能性アメロゲンペプチドおよびフラボノイド類化合物バイカリンの歯周組織構成細胞におけるシグナル伝達経路と歯根吸収抑制効果について

シグナル伝達経路について

近年、アメロゲンおよびバイカリンが Wnt/ カテニン経路を介して分化に影響を及ぼすことが示唆されている。そのため、本研究では各歯周組織構成細胞におけるアメロゲンおよびバイカリンのシグナル伝達経路を探索するため、各歯周組織構成細胞に機能性アメロゲンペプチドおよびバイカリンを添加したときの、カテニンの活性について western blot 解析を行った。また、受容体阻害剤である DKK-1 や中流産物である GSK-3 の阻害剤 SB216763 を用いて、同様の実験を行った。

歯根吸収抑制効果について

Nakajima らの in vitro 歯根吸収モデルを参考に、OPG の発現変化及び基質産生能の変化、シグナル伝達経路阻害時、機能性アメロゲンペプチドおよびバイカリン添加時の OPG 発現変化および基質産生能の変化について、検討を行うことで、歯根吸収への抑制効果に対して検討を行った。

(3) 動物実験による検討

ラット歯根吸収モデルを使用した。12 週齢 Wister 系雄性ラットの上顎前歯部に矯正用アンカースクリューを植立し、これを固定源として、第一大臼歯をコイルスプリングで前方へ牽引する。過度な矯正力を負荷することで、牽引開始より数日後に上顎臼歯遠心根近心側に歯根吸収窩が形成される。強制力を負荷したラット臼歯の歯根膜内に機能性アメロゲンペプチドを投与するとともに、ラットに経口摂取にてバイカリンを投与し、歯根吸収の予防効果について組織学的な検討を行った。

4. 研究成果

(1) 機能性アメロゲンペプチドの作用により、セメント芽細胞の増殖能は亢進することが明らかとなった。また、機能性アメロゲンペプチドの作用により、セメント芽細胞の基質合成期における ALP、OCN、BSP の遺伝子発現量の亢進が認められた。その結果は誌上に掲載された。一方で、バイカリンはセメント芽細胞の増殖能には影響を与えなかったが、基質産生能の評価においては、基質合成期の RUNX2、OPG 遺伝子発現および蛋白質発現を亢進し、RANKL 遺伝子発現および蛋白質発現を抑制した。その結果は誌上に掲載された。機能性アメロゲンペプチドおよびバイカリンを併用した際の効果については、現在も検討中である。

(2) 機能性アメロゲンペプチドは MAPK-ERK 経路を介して、セメント芽細胞の増殖能を亢進させることが明らかとなった。その結果は誌上に掲載された。また、基質産生には Wnt/ カテニン経路を介することが明らかとなった。バイカリンも同様に Wnt/ カテニン経路を介してセメント芽細胞の基質産生能を亢進させることが明らかとなった。この結果は、誌上に掲載された。また、歯根吸収抑制効果については、現在も検討中であるためデータを割愛する。

(3) ラット歯根吸収モデルに機能性アメロゲンペプチドの局所投与およびバイカリンの経口摂取を行い、歯根吸収抑制効果についての検討を行ったところ、機能性アメロゲンペプチド単独投与では有意差が認められなかった。バイカリン単独摂取群およびアメロゲンペプチドおよびバイカリン併用群では優位に歯根吸収が抑制された。機能性アメロゲンペプチドの投

与濃度等の検討を行い、検証を続けていく必要があると考えられる。

以上の結果より、機能性アメロゲンペプチドとバイカリンは、セメント芽細胞の細胞活性に有効であることが明らかとなった。両者の相互作用について、未だ明らかとなっていないことも多く、今後も検討を続けていく必要がある。また、他の歯周組織構成細胞における効果についても引き続き検討していく予定である。

歯根吸収は過度なセメント質の吸収により引き起こされる病態であり、セメント芽細胞の細胞活性を向上させる機能性アメロゲンペプチドとバイカリンを用いた新規の歯根吸収予防法の開発の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Kimura A, Kunimatsu R, Yoshimi Y, Tsuka Y, Awada T, Horie K, Gunji H, Abe T, Nakajima K, Kitagawa M, Miyauchi M, Takata T, Tanimoto K. Baicalin Promotes Osteogenic Differentiation of Human Cementoblast Lineage Cells Via the Wnt/ β Catenin Signaling Pathway. *Curr Pharm Des.* 2018;24(33):3980-3987. doi: 10.2174/1381612824666181116103514. 査読有
2. Kunimatsu R, Awada T, Yoshimi Y, Ando K, Hirose N, Tanne Y, Sumi K, Tanimoto K. The C-terminus of the amelogenin peptide influences the proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol.* 2018 Apr;89(4):496-505. doi: 10.1002/JPER.17-0087. 査読有
3. 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.* 2018;24(25):2993-3001. doi: 10.2174/1381612824666180816093227. 査読有
4. Kunimatsu R, Yoshimi Y, Awada T, Tanimoto K. Effects of human full-length amelogenin on the proliferation of human osteoblasts. *Biomedical research (India)*, 29(12), 2609-14, 2018. 査読有
5. Kunimatsu R, Yoshimi Y, Hirose N, Awada T, Miyauchi M, Takata T, Wu L, Zhu L, Denbesten PK, Tanimoto K. The C-terminus of amelogenin enhances osteogenic differentiation of human cementoblast-lineage cells. *J Periodontal Res*, 52(2); 218-224, 2017. 査読有
6. Awada T, Kunimatsu R, Yoshimi Y, Hirose N, Mitsuyoshi T, Sumi K, Tanimoto K. Effects of C-terminal amelogenin peptides on the metabolism of osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Jan 22;482(4):1154-1159. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.003. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. ヒト培養セメント芽細胞の代謝に対するフラボノイド類化合物バイカリンの影響：木村綾，國松亮，吉見友希，柄優至，粟田哲也，堀江佳代，郡司秀美，中島健吾，高田隆，谷本幸太郎：第 77 回日本矯正歯科学会（横浜），2018。
2. アメロゲン由来新規ペプチドと骨髄由来間葉系幹細胞を用いた骨再生療法への展開：粟田哲也，國松亮，吉見友希，廣瀬尚人，安藤和代，麻川由起，柄優至，平田伊佐雄，加藤功一，丹根一夫，谷本幸太郎：第 41 回日本口蓋裂学会総会・学術集会（東京），2017。
3. アメロゲンの活性部位の探索とペプチド創薬開発。國松 亮，吉見 友希，粟田 哲也，安藤和代，谷本幸太郎。広島大学新技術説明会（広島），2017

〔産業財産権〕

○取得状況（計 1 件）

名称：ヒトアメロゲン部分ペプチド

発明者：谷本 幸太郎、丹根 一夫、國松 亮、吉見 友希

権利者：国立大学法人広島大学

種類：特許

番号：特許第 6134146 号

取得年：2017 年 4 月 28 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：國松 亮

ローマ字氏名：Kunimatsu Ryo

研究協力者氏名：粟田 哲也

ローマ字氏名：Awada Tetsuya

研究協力者氏名：木村 綾

ローマ字氏名：Kimura Aya

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。