1版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ５ 月 ３１ 日現在

機関番号：１５３０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ０９５７６

研究課題名（和文）幹細胞ニッチの制御を目指したインテグリンペプチド療法の開発

研究課題名（英文）Investigation of integrin peptide therapy regulating stem cell niche for periodontal regeneration

研究代表者

山本　直史（Yamamoto, Tadashi）

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：５０４３２６６２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：細胞外基質（ECM）とインテグリンが制御する微小環境に着目し，歯根膜細胞と間葉系幹細胞の遊走を促進するインテグリンα3阻害ペプチド（α325）の歯周組織再生効果を調べた。ペプチドをラットの骨欠損モデルとマウスの歯周病モデルに作用させたところ，増殖因子FGF-2と同等以上の歯槽骨再生効果を示した。再生部位の組織学的解析によって，抗炎症性サイトカインと幹細胞マーカーの遺伝子発現と，骨基質蛋白の増加が確認された。すなわち，α325は再生局所の炎症を抑制するとともにECMの再構成を介して組織再生に有利な微小環境を整えることによって，再生機序を促進すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義
増殖因子を用いた歯周組織再生治療は一定の成果を挙げつつあるが，その適応症や効果は未だ限定的で，依然としてこの治療を適応できない重症患者が多い。組織再生のためには，増殖因子とECMとの協調した相互作用によって規定される幹細胞の微小環境（幹細胞ニッチ）の構築が必須である。インテグリンペプチドは，ECMのみならず増殖因子のシグナリングをも活性化することによって，組織再生を誘導する幹細胞の微小環境を構築し得ると考えられ，ひいては現在の歯周組織再生療法の適応症拡大と有効性向上に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Extracellular matrix (ECM) and integrins-mediated microenvironments are important for the recruitment of tissue-resident stem cells. This study investigated the regenerative effects on periodontal tissue by integrin α3-blocking peptide (α325), previously identified as a migration factor of periodontal ligament cells and mesenchymal stem cells. In vivo study using rat horizontal bone defect model and mouse periodontitis model indicated that α325 induced alveolar bone regeneration, equal to or greater than FGF-2. Immunohistochemical analysis indicated that α325 induced mRNA expression of anti-inflammatory cytokines and stem cell marker genes and bone matrix proteins. This study concluded that α325 is a potent peptide-based drug, capable of anti-inflammatory effects and establishing local microenvironments for periodontal regeneration, defined by coordination between growth factors and ECM.

研究分野：歯周病学

キーワード：インテグリン　細胞外基質　増殖因子　微小環境　幹細胞　歯周組織再生

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

組織再生のための幹細胞の動員と分化調節には，増殖因子と細胞外基質（ECM）と隣接細胞とのネットワーク作用によって規定される微小環境（幹細胞ニッチ）の構築が必須である（Discher *et al*, Science, 2009 ; Yamamoto *et al*, J Cell Commun Signal, 2017）。これまでの歯周病研究において，増殖因子（FGF-2, PDGF-BB）による歯周組織への作用効果が概ね明らかになり，歯周組織再生療法は一定の成果を挙げつつあるが，依然としてこの治療を適応できない重症患者が多い。すなわち，再生療法の適応症拡大と有効性向上は喫緊の課題である。一方，ECM など他のネットワーク因子の制御は大きく立ち遅れており，これを目指した臨床的アプローチは皆無である。ECM は増殖因子の徐放・活性化に有効なスキャホールド（足場）としてだけでなく，それ自体が有効なリガンド（創薬）となり増殖因子との相乗効果を生み出す（Martino *et al*, Science, 2014）。すなわち，未だ適応症と効果が限定的である現在の歯周組織再生療法の更なるブレイクスルーが期待される中で，ECM 微小環境を積極的に制御する方法の開発が必要と考えられる。

ECM という巨大分子を特異的に効率的に制御するために，本研究では，歯周病という疾病の特性を鑑みて，高い安全性と保険適応が可能なコストパフォーマンスを備え持つペプチドを応用した創薬（ペプチド療法）が望ましいと考えた。すなわち，歯周組織再生を誘導する幹細胞ニッチの構築のために，ECM–インテグリンレセプターの結合部位を模倣したペプチド療法の開発を本研究の基本戦略とした。

歯周組織再生の開始には，歯根膜幹細胞（PDL）の骨欠損部への遊走・増殖が重要である。これまで我々は，PDL の遊走を促進するインテグリン α3 阻害ペプチド（α325：PRHRHMGAVFLLSQEAG；Wei *et al*, Mol Biol Cell, 2001）の同定に成功した。α325 は，urokinase-type plasminogen activator（uPA）を活性化し，間接的にビトロネクチン–インテグリン α3 の解離とフィブロネクチン–インテグリン α5 の結合を誘導することによって PDL の遊走を促進する。その促進効果は α325 単独で PDGF-BB と同程度であり，歯肉上皮細胞（GE）の遊走には影響しない（再生スペース確保のため，GE の下方遊走の抑制が望ましい）（Kawamura *et al*, J Cell Mol Med, 2018）。さらに興味深いことに，uPA は FGF-2 や PDGF-BB を活性化に関与することが明らかになっている（Padró *et al*, J Cell Sci, 2002）。すなわち，α325 は，ECM のみならず増殖因子のシグナリングをも活性化することによって，組織再生を誘導する幹細胞ニッチを構築し得ると考えられる。

２．研究の目的

本研究では，

(1) インテグリンペプチド α325 と増殖因子との相乗効果によって誘導される幹細胞ニッチの変化を，*in vitro* での歯周組織幹細胞の遊走能と ECM 発現プロファイルを指標に調べること

(2) α325 と増殖因子からなる機能性ペプチドによる創傷治癒・組織再生促進効果を，*in vivo* 歯周病モデルを用いて調べること

を目的に以下の計画を立てた。

３．研究の方法

(1) 細胞遊走・増殖アッセイ

種々の濃度の α325 と増殖因子それぞれ単独と混合での間葉系幹細胞（MSC）の細胞遊走・増殖に対する作用を *in vitro* で調べた。MSC の遊走能解析は Oris^{TM} システムを用いて蛍光標識された遊走細胞数を定量解析した。

(2) ラット骨欠損モデルの組織解析

申請者らの既報（Nakamura *et al*, J Periodontol, 2019）に従いラット歯槽骨欠損モデルを作製し，担体として，コラーゲンパウダー（CP）を用いた。欠損部位に α325 と増殖因子を含有する CP を填入し，歯槽骨の再生効果を組織学的に調べた。

(3) マウス歯周炎モデルの組織解析

申請者らの既報（Yoshihara-Hirata *et al*, Infect Immun, 2018；Nagai, Ideguchi *et al*, FASEB J. 2020）に従いマウス歯周炎モデルを作製し，α325 と増殖因子を含有する試薬を乳頭歯肉に注入し，歯周組織の再生効果を調べた。また，再生組織中の mRNA・蛋白質の発現変動を調べた。

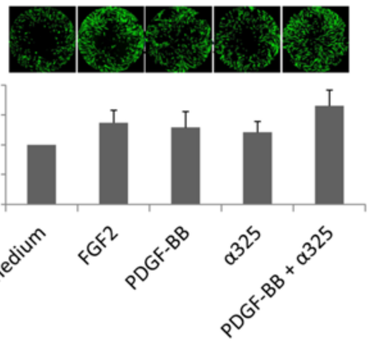
全ての動物実験は動物実験委員会での承認（OKU-2018800）を得て行った。

４．研究成果

(1) α325 と増殖因子との相乗効果による MSC 遊走

In vitro で MSC 遊走アッセイを行った結果，α325 は有意に MSC 遊走を促進した。それは増殖因子（FGF-2, PDGF-BB）による促進効果と同程度であった。さらに，α325 と PDGF-BB との混合刺激によって，MSC 遊走はさらに有意に促進された（図 1）。

（図1）MSC遊走アッセイ



(2) α325 によるラット水平性骨欠損モデルの再生効果

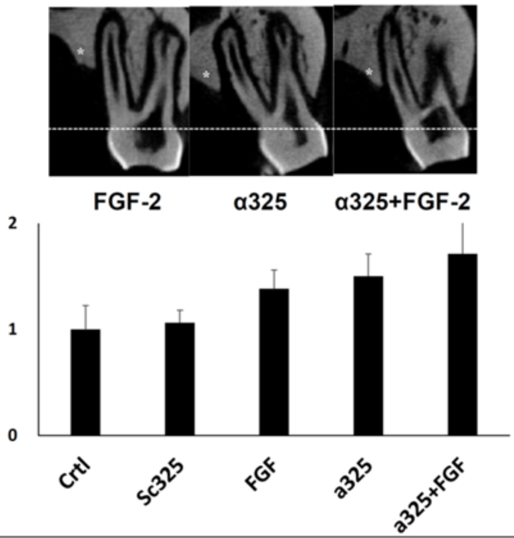
α325 の歯槽骨再生効果をラット歯槽骨欠損モデルで調べた。術後 8 週において，α325 は Control（担体コラーゲンパウダー）のみ）と比較して歯槽骨量を有意に増加し（1.50 倍），それは FGF-2 の効果（1.38 倍）と同程度であった。また，α325 と FGF-2 を混合添加すると，さらに骨量は増加した（1.71 倍：$p<0.05$ ANOVA/Tukey-Kramer test）（図 2）。

(3) α325 によるマウス歯周病モデルの再生効果

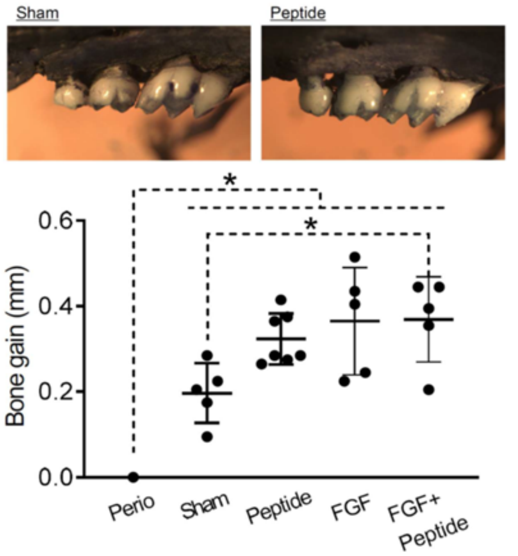
① 歯周病によって破壊された歯周組織の再生

α325 の歯槽骨再生効果をマウス歯周病モデルで調べた。試薬注入後 3 日において，α325 は Sham（スクランブルペプチド注入群）と比較して歯槽骨量を有意に増加した（1.62 倍）。また，α325 と FGF-2 を混合添加すると，さらに骨量は増加した（1.71 倍：$p<0.05$ ANOVA/Tukey-Kramer test）（図 3）。

（図2）α325によるラット水平性骨欠損の再生効果



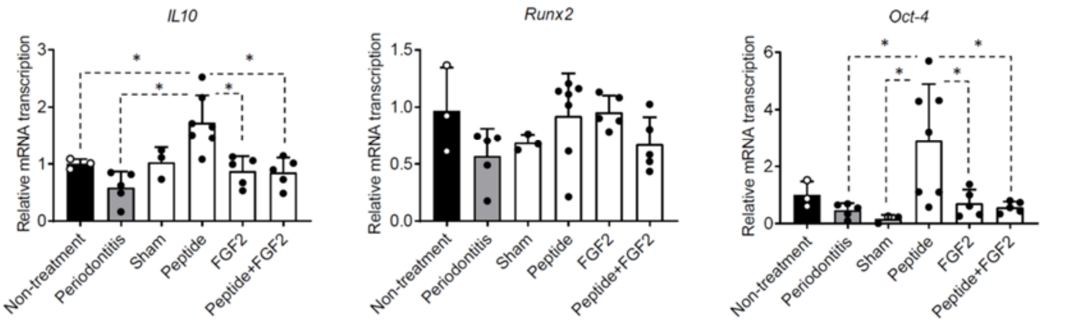
（図3）α325によるマウス歯周病モデルの再生効果



② α325 による歯周組織再生時の遺伝子発現

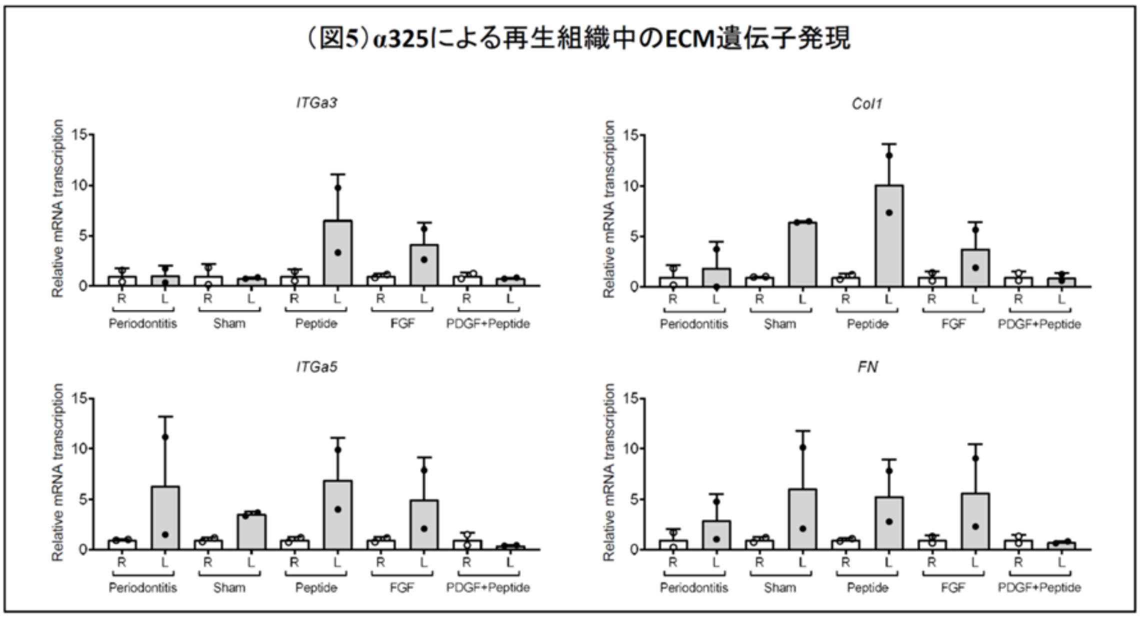
α325 注入後に再生した組織（歯肉組織と骨膜組織）を回収し，抗炎症，骨マーカー，および幹細胞マーカーの遺伝子発現を調べた。試薬注入後 3 日において，α325 は Sham および歯周病群（再生試薬注入なし）と比較して，抗炎症遺伝子 IL-10 と幹細胞マーカー遺伝子 Oct-4 の発現が有意に増加した（$p<0.05$ ANOVA/Tukey-Kramer test）（図 4）。

（図4）α325による再生組織中の遺伝子発現



③ α325 による歯周組織再生時の遺伝子発現

上記と同様に，インテグリン－ECM 関連の遺伝子発現を調べた。試薬注入後 3 日において，α325 は Sham および歯周病群と比較して，Integrin α3 と α5，および Collagen-I 遺伝子の発現が増加した（図 5)。



④ α325 による再生歯周組織の免疫組織解析

α325 注入 3 日後に顎骨組織を回収し，免疫蛍光染色を行った。α325 投与群の歯根膜組織中ではコラーゲン I と間葉系幹細胞マーカーの CD146 が，そして骨再生部位ではオステオカルシンが強く発現した。

(4) 考察

歯根膜細胞と間葉系幹細胞の遊走促進作用を有するインテグリン α3 阻害ペプチド・α325 は，再生局所の炎症を抑制するとともにコラーゲン I を中心とした ECM 再構成を介して組織再生に有利な微小環境を整えることによって，再生機転を促進すると考えられる。すなわち，インテグリン α3 の選択的阻害は，コラーゲンの再構成を伴う微小環境の構築と組織再生に有効である。加えて, FGF-2 や PDGF-BB などの増殖因子との併用は, さらに理想的な幹細胞ニッチを構築し，薬剤の安定性と滞留性の向上，さらには活性の相乗効果という既存治療に対して大きな優位性を発揮する。今後，大型動物を用いた前臨床試験を行い，歯周組織再生治療の適応症拡大と有効性向上を目指す。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

1．著者名 Kawamura M, Yamamoto T, Yamashiro K, Kochi S, Yoshihara-Hirata C, Ideguchi H, Aoyagi H, Omori K, Takashiba S.	4．巻 23(2)
2．論文標題 Induction of migration of periodontal ligament cells by selective regulation of integrin subunits.	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6．最初と最後の頁 1211-1223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcmm.14023	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1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 森彩乃，山本直史，河村麻理，井手口英隆，青柳浩明，中村心，岡本憲太郎，平井杏奈，山城圭介，大森一弘，高柴正悟
2．発表標題 インテグリンα3の選択的阻害による微小環境の構築と歯槽骨再生
3．学会等名 日本歯科保存学会
4．発表年 2020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
研究分担者	小林　寛也 (Kobayashi Hiroya) (20710651)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	
研究分担者	山城　圭介 (Yamashiro Keisuke) (30581087)	岡山大学・大学病院・講師 (15301)	
研究分担者	高柴　正悟 (Takashiba Shogo) (50226768)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関