

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17080

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歯髄温存・石灰化療法の創製

研究課題名(英文) Creation of novel dental pulp preserving and calcification therapy using synthetic peptide derived from Emdogain

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：EMDを用いた基礎研究から硬組織誘導能を有する EMD由来合成ペプチド(SP)を作製した。本研究の目的は象牙質形成に重要な役割を果たすヒト歯髄幹細胞(HDPSC)と動物実験による覆髄試験を行い、SPが歯髄組織に与える影響について検討を行った。SPはHDPSCの象牙芽細胞分化能を誘導することが示唆された。また動物実験による覆髄試験では、SP塗布後ラット歯髄組織に象牙質様の硬組織を誘導することが示唆された。今後、得られた組織を各種染色法を用いて、病理組織学検討を行っていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Emdogainの基礎研究から作製した新規合成ペプチドの作用機序はいまだ明らかになっておらず、臨床応用に向けてそのメカニズムの解明が必要であると考えられる。本研究の実験結果より、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、歯髄組織に象牙質様の硬組織を形成させ、患部歯髄の長期保存を獲得することを可能にすることが示唆された。またウエスタンブロットなどを用いた分子生物学的検討により、新規合成ペプチドはMAPK経路を介して細胞増殖や硬組織分化能を制御することが示唆される。

研究成果の概要(英文)：A synthetic peptide (SP) derived from EMD, which has the ability to induce hard tissue, based on the basic research using EMD. The purpose of this study is to investigate human dental pulp stem cells (HDPSC) and animal experiments by pulp capping test for performed to examine the effect of SP on pulp tissue. It was suggested that SP induces the odontoblastic differentiation potential of HDPSC. In addition, the pulp capping test in animal experiments suggested that dentin-like hard tissue was induced in rat pulp tissue after SP application. In the future, we plan to investigate the histopathology of the obtained tissue using various staining methods.

研究分野：歯科保存治療系歯学

キーワード：エムドゲイン アメロジェニン 覆髄

1. 研究開始当初の背景

- (1) 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。
- (2) この EMD 由来新規合成ペプチドはエムドゲイン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。
- (3) 本研究で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、エムドゲイン (EMD) 由来新規合成ペプチドに着目した。

2. 研究の目的

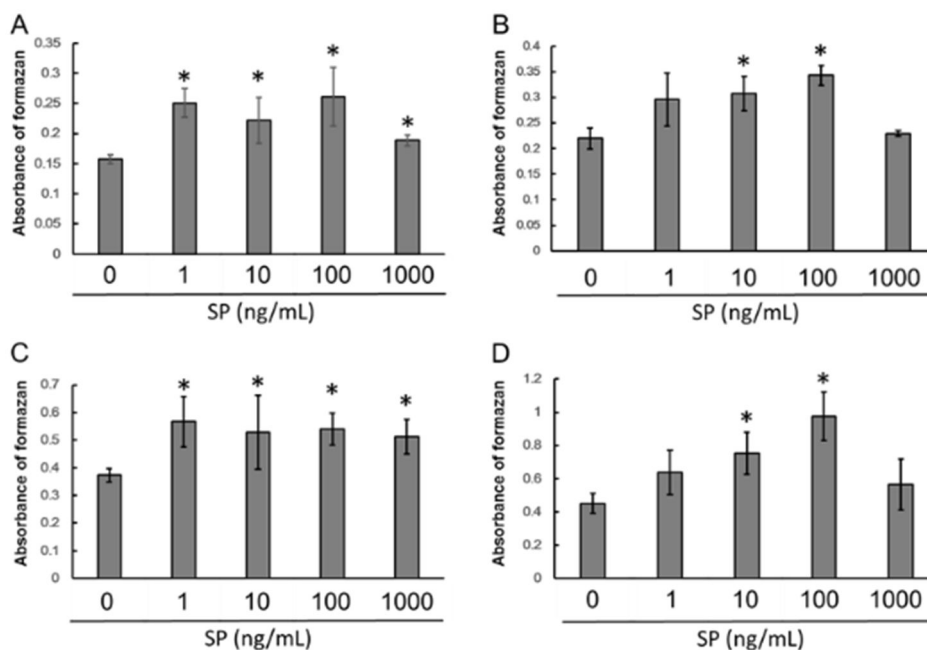
そこで申請者はこの EMD 由来新規合成ペプチドが象牙質再生にも有用であるのか、その作用機序を *in vitro*、*in vivo* ともに検討し、新規歯髄温存療法として臨床応用につなげることを目的としている。

3. 研究の方法

- (1) 大阪歯科大学口腔外科より抜去歯の提供を受け、歯髄幹細胞を分離し、実験に必要な細胞数を確保した。
- (2) また九州歯科大学・北村教授よりラット象牙芽細胞 (KN-3) の提供を受け、EMD 由来合成ペプチドが象牙芽細胞に与える影響についても検討を行った。
- (3) 新規合成ペプチドを各種の濃度 (0, 1, 10, 100, 1000 ng/mL) で培養液に溶解し細胞に作用させる。新規合成ペプチドをヒト歯髄幹細胞に作用させ、遺伝子・タンパクの抽出を行った。
- (4) ウェ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検討した。

4. 研究成果

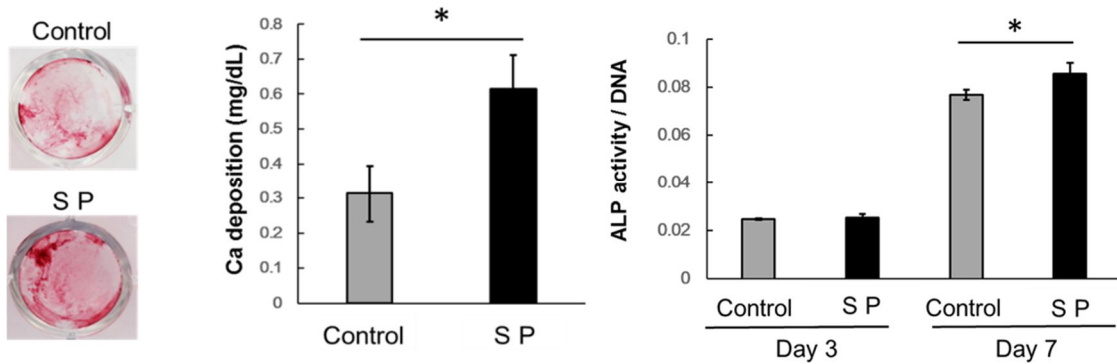
- (1) 細胞増殖試験 新規合成ペプチドを各種の濃度 (0, 1, 10, 100, 1000 ng/mL) で培養液に溶解しラット象牙芽細胞に作用させ、ナカライ社製 Cell Count Reagent SF にて検討を行った。新規合成ペプチド添加群では対照群と比べて有意に細胞増殖能が促進され、100 ng/mL 濃度で最も細胞増殖能が促進されることがわかった。



様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

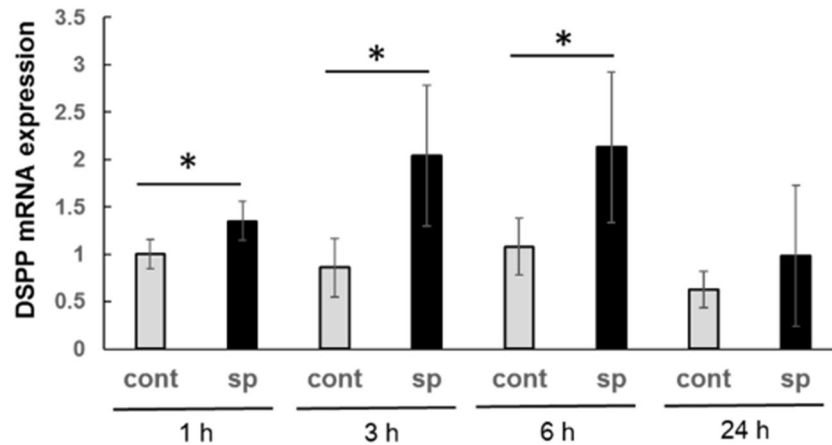
(2) 硬組織形成能の評価 (象牙芽細胞)

新規合成ペプチドに対するラット象牙芽細胞の象牙芽細胞分化能 (ALP 活性、石灰化物形成量) に及ぼす影響は 100 ng/ml 濃度の SP 添加群で対照群と比較して有意に高い値を示した。



(3) DSPP mRNA への影響

新規合成ペプチドによるラット象牙芽細胞に対する DSPP mRNA への影響は 100 ng/ml 濃度の SP 添加群で対照群と比較して有意に高い値を示した。

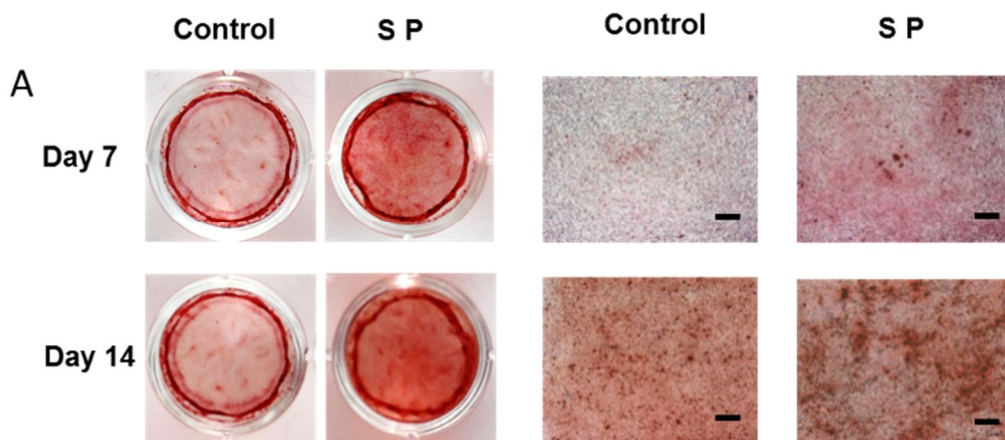


(4) 合成ペプチドの作用機序の検討

合成ペプチドによるヒト歯髄細胞に対する作用機序への影響は 100 ng/ml 濃度の SP 添加群で対照群と比較し、ウエスタンブロッティングを用いて検討を行った。その結果、SP 添加群に p-ERK の発現が増強することが示唆された。

(5) 硬組織形成能の評価 (ヒト歯髄細胞)

新規合成ペプチドに対するヒト歯髄細胞の硬組織形成能に及ぼす影響は 100 ng/ml 濃度の SP 添加群で対照群と比較して有意に石灰化物形成能を促進した。



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 Hirohito Kato, Yoichiro Taguchi, Kazutaka Imai, Yaru Ruan, Yu-Wei Tsai, Yi-Chie Chen, Muneyasu Shida, Reiko Taguchi, Kazuya Tominaga and Makoto Umeda.	4. 巻 8
2. 論文標題 The Enhancing Effects of Amelogenin Exon 5-Encoded Peptide from Enamel Matrix Derivative on Odontoblast-Like KN-3 Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 1890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3390/app8101890	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 Hirohito Kato, Yoichiro Taguchi, Isao Yamawaki, Yaru Ruan, Qingchao Wu, Yuji Nakano, Norimasa Tsumori, Takaya Nakata, Masahiro Noguchi and Makoto Umeda	4. 巻 9
2. 論文標題 Amelogenin Exon 5 Peptide Promotes Cell Proliferation and Osteogenic Differentiation in Human Dental Pulp Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 4425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3390/app9204425	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 Kazutaka Imai, Hirohito Kato, Yoichiro Taguchi, and Makoto Umeda	4. 巻 24
2. 論文標題 Biological Effects of Shikonin in Human Gingival Fibroblasts via ERK 1/2 Signaling Pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3390/molecules24193542	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本歯科保存学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嘉藤弘仁
2. 発表標題 「アメリジェニンペプチドによる硬組織形成～Emdogain 発売から20年の時を経て～」
3. 学会等名 日本歯周病学会第5回近畿地区臨床研修会（教育講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阮 亜如, 嘉藤 弘仁, 田口 洋一郎, 山内 伸浩, 梅田 誠
2. 発表標題 高出力赤色LED照射はWnt/ β -catenin経路を介してヒト骨髄間葉系細胞の硬組織分化および石灰化形成を促進する
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井一貴, 嘉藤弘仁, 田口洋一郎, 梅田 誠
2. 発表標題 抗炎症作用を有するShikoninのヒト歯肉線維芽細胞に対する生物学的影響
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会
4. 発表年 2019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
研究協力者	田口 洋一郎 (TAGUCHI Yoichiro)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	梅田 誠 (UMEDA Makoto)		