

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K24096

研究課題名(和文)低宿主細胞障害性ヘパリン・LL37 複合体を用いた新規歯内療法の実証

研究課題名(英文)Study on the novel endodontic therapy using heparin-LL37 hybrid

研究代表者

吉田 和真(Kazuma, Yoshida)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：60846856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ヘパリン・LL37 複合体が細胞機能調節能を有する歯内疾患治療薬のシーズ候補であるかを検討し、歯内疾患治療薬としての有用性を評価することである。
in vitro 実験において、歯髄細胞に対して、ヘパリン・LL37 複合体は骨誘導能をもたなかったが、骨芽細胞様細胞にはmRNAレベルで骨関連遺伝子発現の上昇を認めた。根尖性歯周炎において、歯周組織に対して細胞障害性をもたないヘパリン・LL37 複合体は、新規歯内治療薬として有用な可能性が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

LL37 は組織再生に有用な細胞機能調節能を有しているため、このペプチド利用し、歯内疾患治療薬のシーズ候補であるかを検討した報告である。in vitro 実験において、歯髄細胞に対して、ヘパリン・LL37 複合体は骨誘導能をもたなかったが、骨芽細胞様細胞にはmRNAレベルで骨関連遺伝子発現の上昇を認めた。歯周組織に対して細胞障害性をもたないヘパリン・LL37 複合体は、新規歯内治療薬として有用な可能性があることが示唆された。

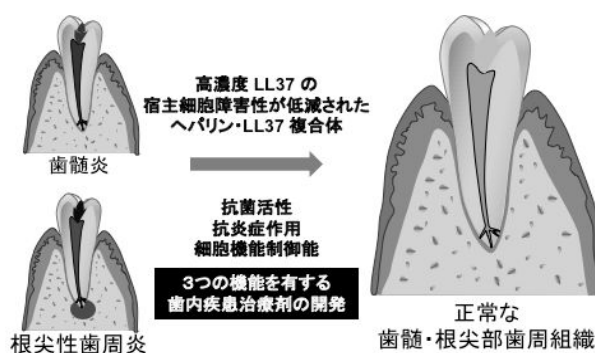
研究成果の概要(英文)：In this study, I investigated if the Heparin-LL37 hybrid has the potential effects to the endodontic therapy. Heparin-LL37 hybrid increases the hard tissue-related cellular marker expression in osteoblast-like cells, not in dental pulp cells. Heparin-LL37 hybrid has the angiogenic effect in endothelial cells. These results indicate that heparin-LL37 hybrid is a potential drug in the endodontic therapy of apical periodontitis.

研究分野：保存系歯科学

キーワード：組織再生 炎症制御

1. 研究開始当初の背景

近年、歯科用顕微鏡、歯科用 CT および Ni-Ti ファイルの導入によって、歯内疾患の診断および治療は格段に進歩したと考えられるが、生物学的活性タンパク質を用いた歯髓組織および根尖歯周組織に存在する細胞の機能制御による歯内療法は存在しない。歯髓炎および根尖性歯周炎など歯内疾患の主原因は、歯髓組織および根管



象牙質への口腔内細菌の感染である(Kakehashi et al., 1965.)。細菌感染によって歯髓組織または根尖歯周組織での炎症が惹起され、引き続き、根尖部歯周組織が破壊される。

抗菌ペプチド LL37 は抗菌活性、LPS 中和能および細胞機能調節能を有することから、歯内疾患治療剤の候補因子である。しかしながら、高濃度 LL37 は宿主細胞障害性を示す。このような背景から、LL37 の抗菌活性等を維持しつつ細胞障害性を改善する試みがなされてきたが、臨床応用に至るまでの成果は未だ得られていない。申請者は抗菌活性および LPS 中和活性を減弱することなく、細胞障害性のない LL37 をすでに開発している。すなわち、ヘパリンと可逆的に結合した LL37 の細胞障害性は低減し、抗菌活性と LPS 中和活性は抑制していないことを示した。この細胞障害性が低減された複合体は、LL37 に代わる有力な新規歯内疾患治療剤候補と考えた。

2. 研究の目的

Cathelicidin family に属する抗菌ペプチド LL37 は、抗菌活性に加えて、リポ多糖 (LPS) 中和能および細胞機能調節能 (血管新生作用、骨形成作用等) を有する。しかしながら、高濃度 LL37 は宿主細胞障害性を示すことから、臨床応用するためには、LL37 の抗菌活性、LPS 中和能および細胞機能制御能を維持しつつ、細胞障害性を改善する必要がある。そこで、申請者らは、LL37 をヘパリンと複合させることによって、LL37 の抗菌活性および LPS 中和能を維持し、細胞障害性を低減できることを見出した (Yoshida et al., Int. Endod. J., 2019.)。本研究では、ヘパリン・LL37 複合体が抗菌活性、抗炎症作用に加えて細胞機能調節能を有する歯内疾患治療薬のシーズ候補であるかどうかを検討するために、ヘパリン・LL37 複合体による細胞機能制御能を調べ、ヘパリン・LL37 複合体の歯内疾患治療薬としての有用性を評価する。

3. 研究の方法

(1). ヘパリン・LL37 複合体が炎症に与える影響 (in vitro)

ヘパリン・LL37 複合体の存在下あるいは非存在下において、免疫担当細胞であるマクロファージを細菌構成成分によって刺激する。各種サイトカイン発現 (TNF- α 、IL-1、IL-8 等) を PCR 法および ELISA 法によって調べる。

ヘパリン・LL37 複合体によるサイトカイン発現調節メカニズムの解析: 細胞内シグナル分子 (NF- κ B および MAPKs (p38, ERK, JNK)) の阻害剤を用いた解析を行うとともに、各シグナル分子発現を western blot 法によって調べる。

(2). LL37 が組織修復・再生に与える影響 (in vitro)

ヘパリン・LL37 複合体がヒト歯周靭帯細胞およびマウス骨芽細胞に及ぼす影響：骨関連タンパク質発現および石灰化能を、それぞれ RT-PCR 法およびアリザリンレッド染色 S によって評価する。

ヘパリン・LL37 複合体が血管新生に及ぼす影響：

- a. 血管新生関連因子産生：ELISA キット
- b. 管腔形成能：in vitro 血管新生テストキット
- c. 血管内皮細胞への分化，KDR，CD34 などの発現：免疫染色

4．研究成果

in vitro 実験において、歯髓細胞に対して、ヘパリン・LL37 複合体は骨誘導能をもたなかったが、骨芽細胞様細胞には mRNA レベルで骨関連遺伝子発現の上昇を認めた。ヘパリン-LL37 複合体は、骨芽細胞様細胞に対して石灰化結節の発達を促進する傾向にあったが、有意な差は認められなかった。ヘパリン・LL37 複合体は作製の過程で遊離したヘパリンおよび LL37 が存在すると考えられる。これまでに LL37 は骨芽細胞に対して骨形成誘導能を有していると多数の報告がある一方、ヘパリンは heparin-binding protein である osteoprotegerin と binding することが報告されている。歯髓細胞および骨芽細胞が産生する osteoprotegerin とヘパリンが結合すると、LL37 の遊離が起こると考えられ、短期培養における骨関連遺伝子発現上昇と、長期培養において石灰化結節の発達を促進させないという結果の違いに起因する可能性がある。以上のことから、根尖性歯周炎において、歯周組織に対して細胞障害性を排除したヘパリン・LL37 複合体は、新規歯内治療薬として有用な可能性があることが示唆された。

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 Suzuki Shigeki, Fukuda Takao, Nagayasu Shintaro, Nakanishi Jun, Yoshida Kazuma, Hirata-Tsuchiya Shizu, Nakao Yuki, Sano Tomomi, Yamashita Akiko, Yamada Satoru, Ohta Kouji, Shiba Hideki, Nishimura Fusanori | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Dental pulp cell-derived powerful inducer of TNF- comprises PKR containing stress granule rich microvesicles | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40046-2 | 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 Nakanishi Jun, Suzuki Shigeki, Yoshida Kazuma, Hirata-Tsuchiya Shizu, Haruyama Naoto, Yamada Satoru, Shiba Hideki | 4. 巻 110 |
| 2. 論文標題 Dentin phosphoprotein inhibits lipopolysaccharide-induced macrophage activation independent of its serine/aspartic acid-rich repeats | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Archives of Oral Biology | 6. 最初と最後の頁 104634 ~ 104634 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2019.104634 | 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 Suzuki Shigeki, Yuan Hang, Hirata-Tsuchiya Shizu, Yoshida Kazuma, Sato Akiko, Nemoto Eiji, Shiba Hideki, Yamada Satoru | 4. 巻 476 |
| 2. 論文標題 DMP-1 promoter-associated antisense strand non-coding RNA, panRNA-DMP-1, physically associates with EGFR to repress EGF-induced squamous cell carcinoma migration | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biochemistry | 6. 最初と最後の頁 1673 ~ 1690 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-020-04046-5 | 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 吉田 和真, 鈴木 茂樹, 中西 惇, 平田-土屋 志津, 山田 聡, 柴 秀樹 |
| 2. 発表標題 Heparin との可逆的な結合は抗菌活性および LPS 中和能を減弱することなく, 高濃度 LL37 の細胞障害性を改善する |
| 3. 学会等名 2019年度春期日本歯科保存学会 |
| 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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|