

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月1日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791882

研究課題名（和文）機能性ペプチド SVVYGLR の抗炎症作用に着目した新規骨組織再生促進材料の開発

研究課題名（英文）Development of an osteogenesis-inducible material using possible inflammation control of SVVYGLR functional peptide

研究代表者

金田 善俊（KANEDA YOSHITOSHI）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70448124

研究成果の概要（和文）：本研究計画は、炎症を制御する可能性のある骨組織再生促進ペプチド材料の開発を目的として、機能性ペプチド SVVYGLR が骨組織再生の過程で骨芽細胞・破骨細胞に及ぼす影響を検討した。その結果、SVVYGLR 合成ペプチド（1-10 $\mu\text{g}/\text{site}$ ）は、ラット頭蓋骨骨欠損部あるいは大腿骨インプラント埋入部位における骨組織再生において、明らかな抗炎症作用は示さなかったが、破骨細胞の活性を著明に抑制することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Effects of the functional peptide SVVYGLR on osteoblasts and osteoclasts during bone regeneration was investigated aiming at development of an osteogenesis-inducible peptide material by its possible inflammation control. The synthetic SVVYGLR peptide (1-10 $\mu\text{g}/\text{site}$) did not show apparent anti-inflammatory effects on the rat calvaria bone regeneration and on the implant osseointegration in the rat femurs. On the other hand, significant inhibitory effects of the peptide on osteoclast activities during bone regeneration were revealed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：歯科補綴学一般・SVVYGLR・骨芽細胞・破骨細胞・炎症

1. 研究開始当初の背景

補綴歯科臨床において、吸収された顎堤はインプラントあるいは義歯の治療を困難にすることが問題となっている。顎骨を獲得するために、自家骨、骨補填材等を用いた GBR 等の骨再生誘導療法が行われているが、外科処置を伴うため術部では少なからず炎症反応が引き起こされ、骨免疫学的応答によってその後の骨吸収を惹起すると考えられる。

本研究代表者は、手術部において炎症反応および破骨細胞の機能を抑制することの重要性に着目した。手術部において炎症反応が強く起これば骨の吸収が促進されることが考えられるため、手術部での炎症反応を抑制し、破骨細胞の活性化を抑制することは治療の成功に大きく関わってくる可能性がある。すなわち、手術部での炎症反応および破骨細胞活性を抑制することは、骨再生誘導療法を

成功に導くために非常に重要である。

本研究代表者が着目した機能性ペプチド SVVYGLR は、オステオポンチン上に存在するわずか7つのアミノ酸配列である (図1)。

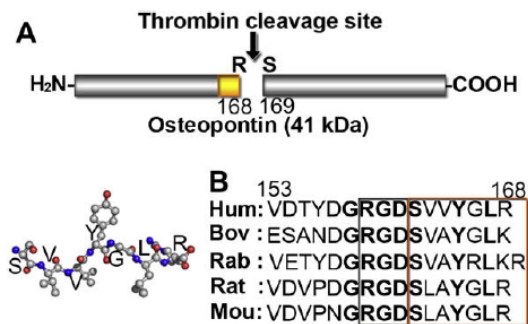


図1 機能性ペプチド SVVYGLR。A: ヒトオステオポンチンタンパク質がトロンピンによって切断されたC末端部位にSVVYGLR配列が存在する。B: この部位のアミノ酸配列は哺乳類において比較的よく保存されている (Egusa H, Kaneda Y et al, Biomaterials, 2009 より)

合成ペプチドを用いた再生医療は、その分子量が小さいことから、タンパク質である成長因子と比較して副作用が少なく安全であることが期待されている。

一方、SVVYGLR配列は関節リウマチの研究領域でも近年注目されており、このアミノ酸配列を含むタンパク質の断片がインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ と特異的に結合し、生体内における炎症反応に大きく関与していることが明らかにされた (Kanayama M et al. J Immunol, 2009)。さらにSVVYGLR配列をブロックする抗体を用いることによって炎症や骨吸収を抑えることが可能であることが明らかになりつつある (Rao H et al, J Bone Miner Res, 2006)。

このような背景のもと、本研究代表者は合成ペプチドSVVYGLRをアンタゴニストとして利用することによって、炎症反応を抑制できる可能性に着目した。抗炎症作用を有するペプチドは、増成術後の骨組織の吸収を抑える新規骨組織再生促進剤となり得る可能性がある。

さらに本研究代表者は、インプラント治療に必要な骨増生術に際して、この機能性ペプチドSVVYGLRがインプラント埋入周囲の炎症を抑えることによって早期かつ確実なオッセオインテグレーションを導く可能性に着目し、インプラント体にこのペプチドを組み込むことによって、より効果的な新規インプラント材料の開発が可能ではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究計画では、新たな骨組織再生促進ペプチド材料を開発するために、以下の項目を明らかにすることを目的とした。

(1) 合成ペプチドSVVYGLRが骨芽細胞および破骨細胞に及ぼす影響を明らかにする。

(2) 合成ペプチドSVVYGLRが骨芽細胞および破骨細胞の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を明らかにする。

(3) 合成ペプチドSVVYGLRが、マウス頭蓋骨の骨欠損炎症部位に及ぼす影響を明らかにする。

(4) SVVYGLRペプチドを放出する吸収性生体材料を作製し、インプラントのオッセオインテグレーション獲得に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 合成ペプチドSVVYGLRが骨芽細胞および破骨細胞に及ぼす影響

①骨芽細胞

生後8週齢のSDラットの大腿骨髄より間葉系間細胞を分離培養した。この骨髄由来間葉系間細胞を、合成ペプチドSVVYGLR (100 ng/ml) を添加した骨芽細胞分化誘導培地中で培養し、誘導5日後のアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性をALP染色法で、11日後の細胞外基質の石灰化をvon Kossa染色で評価した。

また、この骨髄由来間葉系間細胞を増殖培地 (非誘導培地) 中で培養した際に合成ペプチドSVVYGLR (100 ng/ml) を添加し、15日後に骨芽細胞および軟骨細胞に関与する遺伝子発現をRT-PCR法で解析することで、SVVYGLRペプチドがラット間葉系間細胞の分化の方向付けに及ぼす影響を検討した。

②破骨細胞

生後10週齢のマウスの大腿骨髄より破骨前駆細胞を分離培養した。この細胞をRANKL刺激により破骨細胞に分化誘導する際に合成ペプチドSVVYGLR (100 ng/ml) を添加し、5日後のTRAP染色陽性多核細胞数および破骨細胞分化特異的遺伝子およびこのペプチドの結合分子であるインテグリン $\alpha 9$ 遺伝子の発現 (RT-PCR法) について評価した。

(2) 合成ペプチドSVVYGLRが骨芽細胞および破骨細胞の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響

マウス大腿骨髄より間葉系間細胞および破骨前駆細胞を分離培養した。それぞれの細胞を、合成ペプチドSVVYGLR (10-100 ng/ml) を添加した増殖培地中で培養し、3および5日後に単離したトータルRNAを用いてcDNAを合成し、IL-1 β 、IL-6およびIL-8の遺伝

子発現を RT-PCR 法にて解析した。

(3) 合成ペプチド SVVYGLR が、マウス頭蓋骨再生部位の破骨細胞に及ぼす影響

ラット頭蓋骨欠損モデルを用いて、合成ペプチド SVVYGLR (10 μ g/site) を含んだコーゲンスポンジを骨欠損部に埋入し、3 週間後に頭蓋骨を摘出して TRAP 染色にて破骨細胞の活性を組織学的に評価した。

(4) SVVYGLR ペプチドを放出するインプラント体の作製およびそのオッセオインテグレーション獲得に対する評価

直径 2.0 mm 長さ 3.5 mm の純チタン円柱に内空を設け、チタン表面に通じる細孔が付与されたインプラント体の内空に、SVVYGLR ペプチド含有水和ゲルをシリンジで填入することで、SVVYGLR ペプチド放出インプラントの作製を試みた (図 2)。

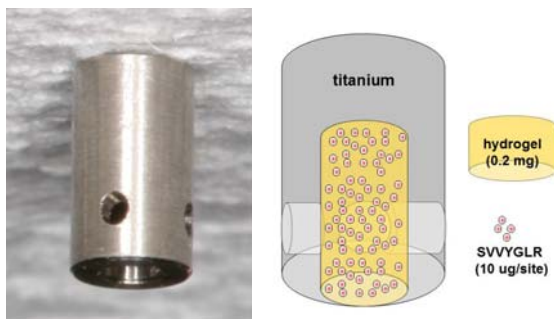


図 2 SVVYGLR ペプチド放出インプラント。純チタン円柱内腔にペプチドを含浸した水和ゲルを填入した。

また、この SVVYGLR ペプチド放出インプラント (1 μ g/site) を、ラット大腿骨に埋入し、4 週間後に屠殺し、灌流固定後に大腿骨を摘出した。埋入部位におけるオッセオインテグレーションおよび骨新生を評価するため、チタン金属を含む非脱灰研磨標本を作製し、トルイジンブルー染色にて組織学的な評価を行った。

4. 研究成果

(1) 合成ペプチド SVVYGLR が間葉系間細胞および破骨細胞に及ぼす影響

① 間葉系幹細胞

骨芽細胞分化誘導培地中において、合成ペプチド SVVYGLR はラット骨髄由来間葉系幹細胞の 5 日後の ALP 活性を促進したが (図 3)、11 日後の石灰化形成を抑制した (図 4)。

これらの結果から、SVVYGLR ペプチドは、前駆骨芽細胞の石灰化過程には抑制的に作用しているが、間葉系間細胞が骨芽細胞へ方向付けされる初期過程においては ALP 活性を増強している可能性が考えられた。

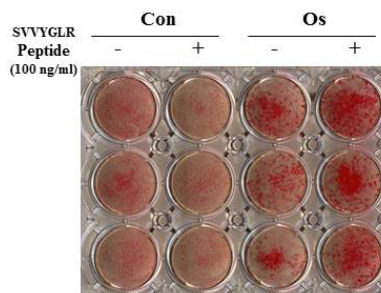


図 3 ALP 染色像。Con : 増殖培地, Os : 骨芽細胞分化誘導培地。

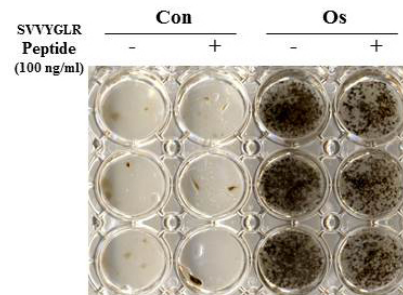


図 4 von Kossa 染色像。Con : 増殖培地, Os : 骨芽細胞分化誘導培地。

また、ラット骨髄由来間葉系間細胞を増殖培地中で培養した際に合成ペプチド SVVYGLR (100 ng/ml) を添加すると、15 日後には骨芽細胞の分化に関与する osteopontin や osteocalcin ではなく、軟骨細胞のマーカである II 型 Collagen の遺伝子発現の促進を認めた。

さらに、ラット骨髄由来間葉系間細胞を軟骨細胞分化培地中で合成ペプチド SVVYGLR (100 ng/ml) を添加して 20 日間培養し、サフラニン O 染色を行った結果、ペプチド添加群の細胞は陽性を示した (図 5)。

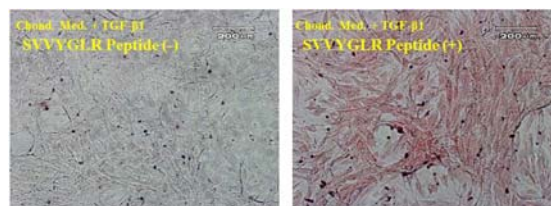


図 5 サフラニン O 染色像。ラット骨髄由来間葉系幹細胞を軟骨細胞誘導培地中で合成ペプチド SVVYGLR (100 ng/ml) を添加して 20 日間培養した。

これらの結果から、合成ペプチド SVVYGLR は、間葉系間細胞の骨芽細胞分化には促進的に作用しないが、軟骨細胞への分化を促進する可能性が示唆された。

② 破骨細胞

マウス破骨前駆細胞を RANKL で刺激して分化誘導すると、細胞分化に伴いインテグリン

$\alpha 9$ の遺伝子発現が増加し、合成ペプチド SVVYGLR を破骨細胞に作用させるとこの発現は抑制された。また、マウス破骨前駆細胞の破骨細胞分化誘導において、合成ペプチド SVVYGLR を添加することで、TRAP 染色陽性多核細胞数は有意に減少し、破骨細胞分化特異的遺伝子 (calcitonin receptor, cathepcin K, TRAP) の発現は著明に抑制された。以上の結果から、合成ペプチド SVVYGLR は破骨細胞の分化をインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ との結合を介して抑制している可能性が考えられた。

(2) 合成ペプチド SVVYGLR が骨芽細胞および破骨細胞の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響

合成ペプチド SVVYGLR が、骨芽細胞および破骨細胞の炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, IL-8) の発現に及ぼす影響を検討した結果、どちらの細胞に対しても用いた 10-100 ng/ml の濃度ではこのペプチドはこれら遺伝子発現に対して著明な促進あるいは抑制作用を示さなかった。今後、合成ペプチド SVVYGLR が炎症に関与する他のサイトカイン分子や他の炎症細胞に対してもどのような作用を及ぼすかを検討していく必要があると思われる。

(3) 合成ペプチド SVVYGLR が、マウス頭蓋骨再生部位の破骨細胞に及ぼす影響

ラット頭蓋骨欠損モデルにおいて、合成ペプチド SVVYGLR (10 μ g/site) を含んだコラーゲンスポンジを移植した場合には、非含有対照群の場合と比較して TRAP 陽性破骨細胞の数が少ない傾向を示した (図 6)。

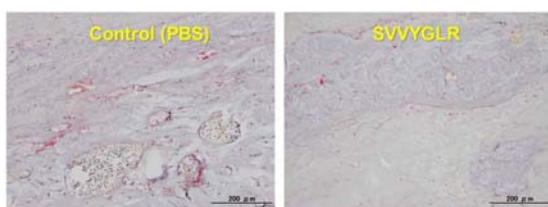


図 6 ラット頭蓋骨欠損モデルにおいて、合成ペプチド SVVYGLR (10 μ g/site) を含んだコラーゲンスポンジを移植し、3 週間後の TRAP 染色像。

これは、in vitro における合成ペプチド SVVYGLR の破骨細胞分化抑制作用が、生体の骨再生部位においても起こっている可能性を示していると思われる。ただし、これに伴う著明な骨再生の像は認めなかった。今後、ペプチドの濃度を変えた実験を追加し、詳細を明らかにしていく必要があると考えている。

(4) SVVYGLR ペプチドを放出するインプラント体のオッセオインテグレーション獲得

に対する評価

作製した SVVYGLR ペプチド放出インプラント (1 μ g/site) を、ラット大腿骨に埋入したところ、インプラント体と骨界面には高い骨接触率 (オッセオインテグレーション) を認めたが、ペプチド非含有対照群と比較して著明な相違を認めなかった。(図 7)。

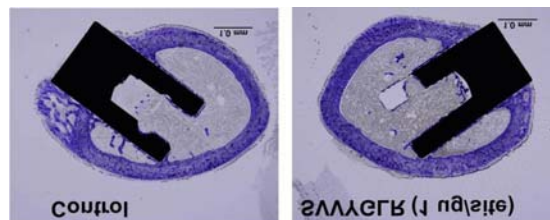


図 7 SVVYGLR ペプチド放出インプラントをラット大腿骨に埋入し、4 週間後の組織切片像 (トルイジンブルー染色)。

今後、ペプチドの濃度を変えて、詳細を検討し、このペプチドの徐放システムを確立していく必要があると考えている。

以上の結果から、1-10 μ g/site の合成ペプチド SVVYGLR が骨欠損部位に及ぼす影響として、破骨細胞に対する著明な分化抑制作用が明らかとなったが、これに伴う明らかな炎症抑制効果および骨形成作用は認めなかった。今後は、このペプチドを局所に徐放するシステムを確立し、その炎症および骨形成における効果の有無を検証していく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 善俊 (KANEDA YOSHITOSHI)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：70448124