

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592818

研究課題名(和文)ポリリン酸を用いた新しい医療用材料の開発

研究課題名(英文)Development of new medical materials using polyphosphoric acid

研究代表者

中田 和彦(NAKATA, KAZUHIKO)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：70261013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：食品添加物として以前から広く使用されているポリリン酸は、過去10年の間に、さまざまな細胞の生理活性に影響を与えることが明らかになってきた。そこで、ポリリン酸を用いた新しい医療用材料の開発をめざして、歯髄細胞の増殖と分化に対するポリリン酸ナトリウム(Poly-P)の効果について検索した。その結果、Poly-Pは歯髄細胞に対して低濃度で有意な増殖促進作用と象牙芽細胞分化誘導能を有し、その細胞増殖にPoly-P誘導マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-3が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：For the past decade, it has been found that polyphosphoric acid used widely as a food additive affects the bioactivity of various cells. Therefore, for the development of new medical materials using the polyphosphoric acid, we examined effects of the sodium polyphosphate (Poly-P) on the proliferation and differentiation of dental pulp (DP) cells. As a result, Poly-P significantly accelerated the proliferation of DP cells and induced their differentiation into odontoblasts with low concentration. Our current data suggests that matrix metalloproteinase (MMP) -3 induced by Poly-P may be involved in the cell proliferation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：ポリリン酸 医療用材料 歯髄細胞 象牙芽細胞 マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP) 象牙質シ  
アロリタンパク(DSP)

## 1. 研究開始当初の背景

環境ホルモン（外因性内分泌攪乱化学物質）などの微量の化学活性物質の生体への影響が危惧されている現代では、薬剤や材料の使用にあたって、その生体為害性（組織刺激性や発がん性など）について、これまで以上の配慮が求められており、治療効果が高く、しかもより安全性の高い、新しい医療用材料の開発が望まれている。

ポリリン酸[poly(P)]は、リン酸が数個から数千個で直鎖状に結合した高分子物質で、微生物から哺乳類にいたるまで、あらゆる生物の細胞内および組織内に存在している生体分子であることが知られている。また、生体に対するポリリン酸の影響に関しては、毒性試験によって無害であることがわかっており、食品添加物（変色防止や結着性向上など）として以前から広く使用されている。しかし、ポリリン酸の生理的役割については、これまでに大腸菌を用いた研究が進められており、徐々に明らかにされ始めているが、未だ未解明な部分が多い。近年、このポリリン酸が線維芽細胞増殖因子：Fibroblast growth factor (FGF) を安定化することによって、さまざまな細胞の生理活性に影響を与えることが報告され (Shiba, J. Biol. Chem., 278, 2003)、その効果が注目されている。また、骨分化マーカー遺伝子の発現誘導や細胞の石灰化がみられたという報告やある程度の抗菌力を有し、抗炎症作用や創傷治癒促進作用があるという報告もあり、再生医療の分野で幅広く利用され研究が進んでいる。したがって、ポリリン酸は非常に安価で、生体に対する安全性がすでにある程度確立されていることから、今後、新しい医療用材料として非常に有望な物質となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

ポリリン酸を用いた新しい医療用材料の開発をめざして、その基礎的知見を得るために、歯髄細胞の増殖と分化に対するポリリン酸の効果について検索することを目的とした。

本研究の特色は、歯髄組織の固有細胞であり、通常は線維芽細胞様の特徴を有しているとともに、生体内では脱分化によって多機能性を獲得して歯髄の創傷治癒のみならず、骨や神経などさまざまな再生療法に応用できる可能性があると考えられている歯髄細胞に対するポリリン酸の影響とその創傷治癒に対する有効性を検討することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯髄細胞の分離と培養

当初の研究計画では、臨床的に健全なヒト

新鮮抜去歯の歯髄組織を培養して得られた細胞をヒト歯髄細胞として使用する予定であったが、患者からの試料（抜去歯）の提供が十分に得られなかったため、ラット歯髄細胞を用いて本研究を遂行した。動物実験指針に従って得られたラットの新鮮抜去歯から歯髄組織を摘出し、抗菌薬を含むダルベッコ MEM 培地でよく洗浄した後、歯髄を約 1×1 mm の小組織片に細切し、セルカルチャーディッシュ中に静置して、15% FBS 含有ダルベッコ MEM 培地を加え、37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。そして、歯髄組織片より遊出した細胞がコンフルエントな状態になった後、通法にしたがい継代培養して凍結保存しておいたものを本実験に使用した。

### (2) 鎖長 65 のポリリン酸ナトリウム (Poly-P65) の調製

食品添加物として市販されているトリポリリン酸ナトリウム（トリ Poly-P、平均重合度 10～130、太平化学産業）を 20g/200mL となるように蒸留水に溶解した後、96%エタノールを 32mL 添加した。約 2 週間、室温にて静置して形成された針状結晶の沈殿物を Poly-P65 として、以下の実験に使用した（図 1. 大井、北海道歯誌, 25, 2004）。

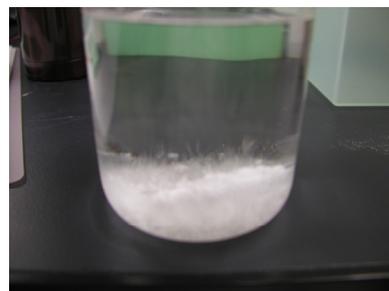


図 1. 鎖長 65 のポリリン酸ナトリウム

また対照試料として、未調整のトリ Poly-P（平均重合度 10～130、太平化学産業）そのもとその他に市販のトリ Poly-P とテトラ Poly-P の 1 : 1 混合品（関東化学）および Poly-P（和光純薬）を使用して比較検討を行った。

### (3) ポリリン酸添加実験

自家調製した鎖長 65 のポリリン酸ナトリウム (Poly-P65) および対照 Poly-P を終濃度 20mM となるようにリン酸緩衝液 PBS に溶解した後、pH7.4 に調製してフィルター滅菌して、以下の添加実験に使用した。歯髄細胞の浮遊液を調製し、96 ウェルカルチャープレートに一定量ずつ分注して 24 時間培養した。PBS で洗浄後、ポリリン酸が所定濃度 (0.03125～0.5mM) になるように調製した培地に交換し、

所定時間の培養を行って、ポリリン酸を歯髄細胞に作用させ、その増殖と分化に対する効果について、以下のように生化学的検索を行った。

#### (4) 細胞増殖活性の測定

細胞増殖活性は、細胞増殖試薬 WST-1 (ロジェ・ダイアグノスティックス社) を用いて測定した。所定培養時間終了後、試薬溶液 (WST-1, HEPES, 1-Methoxy PMS) を加えてよく混和した。CO<sub>2</sub> インキュベーターで、1~4 時間呈色反応を行った。反応後、マイクロプレート・リーダーを用いて、波長 450nm における各溶液の吸光度を測定した。

#### (5) Reverse Transcription-PCR

##### (RT-PCR) 法による細胞増殖因子および分化マーカー遺伝子発現の検索

歯髄細胞から通法にしたがって、total RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA とした後、細胞増殖因子として最近注目されているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -3、ならびに象牙質細胞分化マーカーである象牙質シアロタンパク質 (dentin sialophosphoprotein: DSPP) および骨芽細胞分化マーカーであるオステオカルシン (bone gamma carboxyglutamate protein: Bglap) の遺伝子発現を検索した。

## 4. 研究成果

### (1) ポリリン酸が歯髄細胞の増殖におよぼす影響について

#### ① Poly-P の至適濃度の検討について

自家調製した鎖長 65 のポリリン酸ナトリウム (Poly-P65) を 0.03125~0.5mM の濃度で歯髄細胞に作用させ、位相差顕微鏡下で経時的に観察した。その結果、0.03125 mM と 0.0625mM の低濃度の場合、コントロール (無添加群) に比べて、歯髄細胞の増殖状態はほぼ同等と観察された (図 2 a, b, c)。一方、0.125mM では歯髄細胞の増殖は明らかに抑制されていることが観察され、また 0.25mM と 0.5mM の高濃度では細胞の定着と増殖が認められなかった (図 2 d, e, f)。したがって、以後の歯髄細胞の増殖と分化に対する Poly-P65 の効果については、0.00625~0.2mM の濃度で検討することとした。

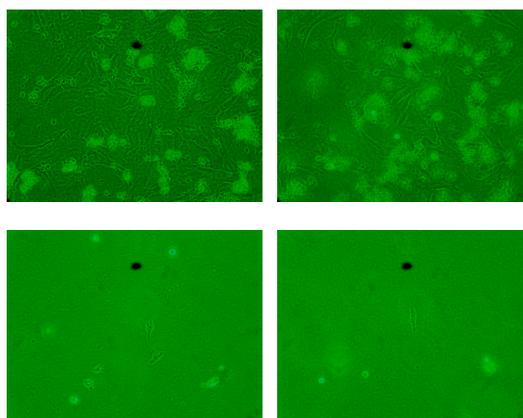
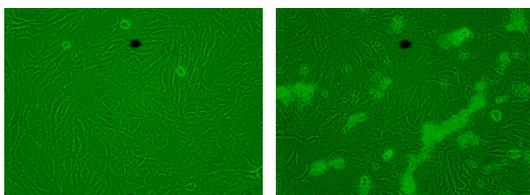


図 2. 自家調製した Poly-P65 添加後 2 日目の培養歯髄細胞の位相差顕微鏡観察像

a control	b 0.03125mM
c 0.0625mM	d 0.125mM
e 0.25mM	f 0.5mM

### ② 歯髄細胞の増殖活性に対する Poly-P65 の影響と 3 種類の市販 Poly-P との比較について

0.1mM Poly-P65 添加 3, 5, 7 日目において、統計学的有意な細胞増殖が認められた (図 3)。そして Poly-P65 は歯髄細胞の増殖をコントロール (無添加群) に比べて約 70% 以上促進した。

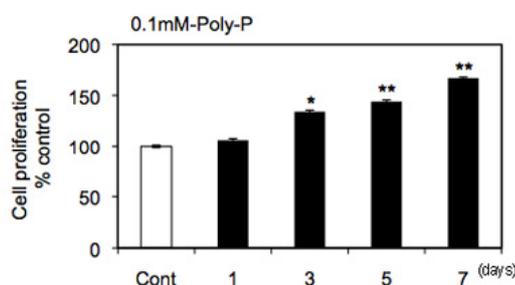


図 3. Poly-P65 の歯髄細胞に対する増殖促進作用 (\*p<0.05, \*\*p<0.01)

一方、対照試料としたトリ Poly-P (平均重合度 10~130、太平化学産業) では、0.0625~1mM 添加において細胞増殖活性への影響は認められず、2mM では細胞の定着と増殖が認められなかった。また、トリ Poly-P とテトラ Poly-P の 1 : 1 混合品 (関東化学) および Poly-P (和光純薬) では、0.5mM 添加の場合のみ、細胞増殖活性が約 10% 促進され、2mM では細胞の定着と増殖が認められなかった (データ未表示)。

したがって、自家調製した Poly-P65 は、他の市販 Poly-P に比べて、歯髄細胞の増殖活性を高める作用が最も強いことが明らかとなり、またその増殖促進作用には至適濃度がある可能性が示唆された。

(2) ポリリン酸が歯髄細胞の分化におよぼす影響について

0.05mM Poly-P65 添加 7 日目と 0.1mM Poly-P65 添加 5、7 日目において、象牙芽細胞分化マーカーである象牙質シアロタンパク質 *Dspp* の発現が認められた。しかし、0.025~0.00625mM Poly-P65 添加群においては、*Dspp* の発現は認められなかった (図 4)。また骨芽細胞分化マーカーであるオステオカルシン *Bglap* については、0.1~0.00625mM Poly-P65 添加の場合、*Bglap* の発現は認められなかった。したがって Poly-P65 は、歯髄細胞に対する象牙芽細胞分化誘導能を有している可能性が示唆された。

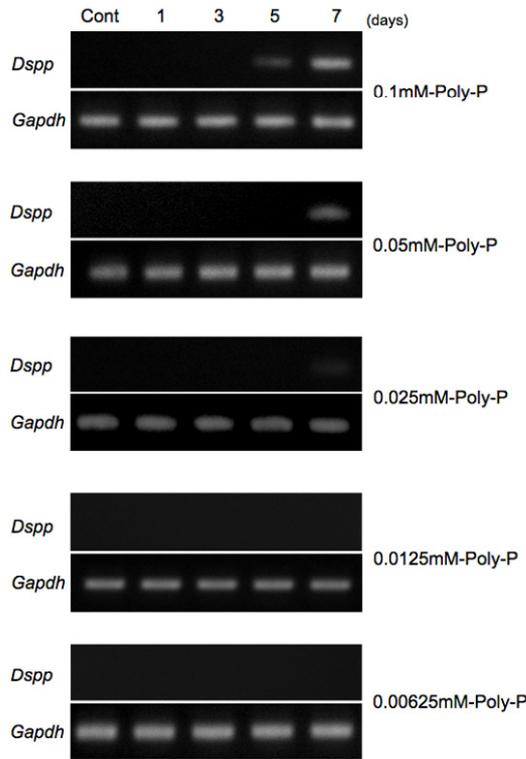


図 4. Poly-P65 による歯髄細胞の象牙芽細胞分化マーカー *Dspp* 発現

(3) 歯髄細胞における Poly-P65 誘導マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-3 遺伝子発現の検討について

0.05mM と 0.1mM Poly-P65 添加 3、5、7 日目において、歯髄細胞における MMP-3 の遺伝子発現が認められた。しかし、0.025~0.00625mM Poly-P65 添加群では、歯髄細胞の MMP-3 遺伝子発現は認められなかった (図 5)。

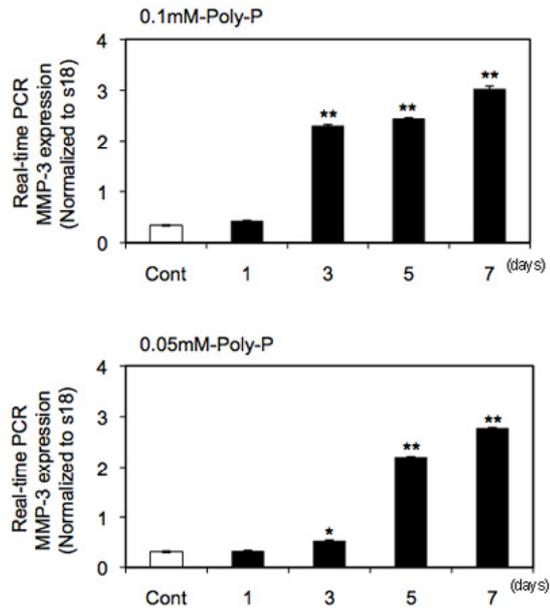


図 5. 歯髄細胞における Poly-P65 誘導 MMP-3 遺伝子発現 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

(4) MMP-3 siRNA を用いた歯髄細胞における Poly-P65 誘導 MMP-3 の細胞増殖作用の検討について

MMP-3 siRNA 遺伝子導入によって、Poly-P65 の歯髄細胞に対する増殖促進作用 (図 3) は、統計学的有意に抑制された (図 6 上段)。また、0.1mM Poly-P65 添加 7 日目において、歯髄細胞の増殖抑制が組織学的にも観察された (図 6 下段)。

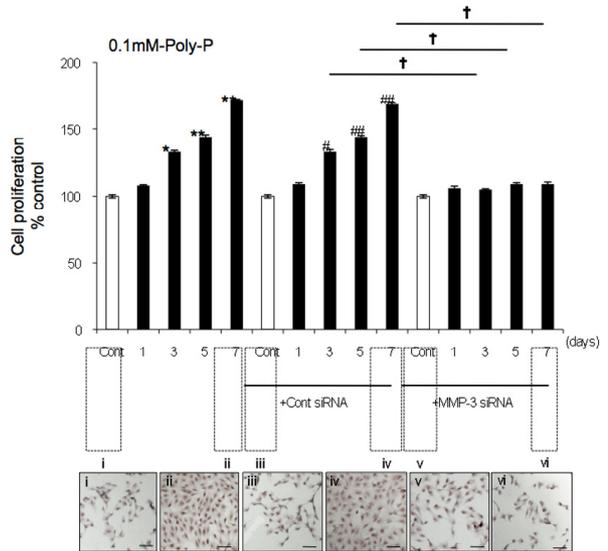


図 6. MMP-3 siRNA による Poly-P65 の歯髄細胞増殖促進作用の抑制 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , † $p < 0.05$  as indicated by bracket)

以上の結果から、ポリリン酸 Poly-P65 は歯髄細胞の増殖と分化に対して、それぞれ有意に促進する効果を有していることが明らかになった。したがってこのポリリン酸 Poly-P65 は、創傷治癒促進作用を有する新しい医療用材料の開発という観点からみて、非常に有望な物質であり、非常に安価で、生体に対する安全性がすでにある程度確立されていることから、今後、基礎的ならびに臨床的研究をさらに進めることによって、再生医療での臨床応用も比較的スムーズに進む可能性が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中田 和彦 (NAKATA, Kazuhiko)

愛知学院大学歯学部・准教授

研究者番号：70261013

### (2) 研究分担者

中村 洋 (NAKAMURA Hiroshi)

愛知学院大学歯学部・教授

研究者番号：40064878

尾関 伸明 (OZEKI Nobuaki)

愛知学院大学歯学部・講師

研究者番号：70469005

### (2) 連携研究者

なし