

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24593138

研究課題名(和文) 歯根膜幹細胞に対する新規骨形成剤ペプチドの効果

研究課題名(英文) Effect of novel bone-forming agent on human periodontal ligament stem cells

研究代表者

田中 昭男 (TANAKA, Akio)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10121823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：組織再生に関与するのは幹細胞である。歯周組織、とくに歯根膜にも幹細胞の存在が言われている。今回、歯根膜幹細胞を抽出し、新規骨形成剤である合成ペプチドを培養歯根膜幹細胞に添加して、その細胞の機能変化と遺伝子発現を検討した。その結果、細胞増殖能および石灰化物の形成が増加し、骨芽細胞マーカー発現が増強した。また、leucine-rich repeat-containing protein (LRR)の遺伝子発現が最も顕著であったので、合成ペプチドは歯根膜幹細胞を骨芽細胞へ分化させる可能性を持っていることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Cells related to tissue regeneration are known as stem cells. In the periodontal tissue, especially periodontal ligament stem cells seem to be present. Isolated human periodontal ligament stem cells (HPLSCs) were cultured with a bone-forming agent, a novel synthetic peptide, and examined for cell function and gene expression. The cells showed increased cellular proliferative potential, calcification potential, and expression of osteoblast markers. In addition, gene expression of leucine-rich repeat-containing (LRR) protein was most prominent. As the LRR gene is strongly expressed in osteoblasts, the novel synthetic peptide indicates an osteoblastic differentiation potential of HPLSCs.

研究分野：口腔病理学

キーワード：歯根膜幹細胞 歯周組織再生 歯周病 新規合成ペプチド 再生歯科医学

1. 研究開始当初の背景

エムドゲイン®は、生物由来物質のため、種々な問題を含んでいる。したがって、エムドゲイン®に代わる更に優れた物質の開発が望まれる。我々は旧タイプのエムドゲイン®をラット背部皮下に接種してエオジン好性の円形小体を得た。この円形小体を回収し、SDS-PAGE にかけて、エムドゲイン®の場合には現れない約 40 kDa のバンドが得られた。このバンドをトリプシン処理し、複数の断片にしたもののうち、分子量 1,010 のフラグメントを MALDI-TOF-MS 法によって解析し、7 種のアミノ酸シーケンスである WYQNML (I)R を得た。これらのシーケンスはデータベース検索で、ウシのアメロゲニン II 前駆物質 (WYQNMLR)、アメロゲニンロイシン優位アメロゲニンポリペプチド (LRAP)、およびブタのアメロゲニン前駆物質 (WYQNMIR) であった (J Periodontol 2005; 76: 1934-1941)。これを元にペプチドを合成し、ラット背部皮下に徐放性効果のある基材とともに埋入し、その物質の消長を病理組織学的に明らかにした。その結果、15 mg/mL 濃度では、14 日後に骨・軟骨・軟骨内骨化を伴った硬組織がみられた (Oral Sci Inter 2010; 7: 26-33)。これを新規骨形成剤ペプチドとして特許出願し、特許 (第 5179815、平成 25 年 1 月 18 日登録) を取得した。このペプチドを市販の培養ヒト歯根膜線維芽細胞に添加すると 3 日後では 1 日後に比較して BMP1A 遺伝子が約 34 倍に、そして SPARC (オステオネクチン) 遺伝子は 1.55 倍に増加したが、FGFRL1 遺伝子は 1/25 に減少した (J Osaka Dent Univ 2009; 43: 111-117)。また、ラットに形成した人工的歯周組織欠損部にこのペプチドを適用すると象牙質表面にセメント質様硬組織が形成された (Oral Med Pathol 2012; 16: 75-80)。したがって、培養ヒト歯根膜幹細胞 (HPLSCs) に添加し、その際の遺伝子発現を明らかにすることによって HPLSCs の機能発現が解明でき、より直接的な歯周組織再生因子の開発が期待できる。

2. 研究の目的

各臓器組織には幹細胞が存在し、その細胞によって組織・臓器の再生、恒常性が維持されている。歯周組織においても、とくに歯根膜にも幹細胞の存在が明らかにされ、歯根膜の維持に関与していることが言われている。HPLSCs に対する新規骨形成剤ペプチドの作用を明らかにし、HPLSCs の遺伝子発現を検索し、さらに有効な歯周組織再生に関与する因子を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HPLSCs の分離と機能発現

①細胞の樹立、分離培養

医の倫理委員会の承認を得て、抜去したヒト埋伏智歯の歯根膜組織を採取し、酵素処理後に、セルストレーナーと呼ばれる篩にかけ

て一個一個の細胞に単離して培養し、幹細胞マーカーによって免疫組織化学的に HPLSCs の同定を行った。

②HPLSCs に対する新規骨形成剤ペプチドの影響

HPLSCs の継代 3~5 代の細胞に新規骨形成剤ペプチドを添加して培養した。硬組織形成能はアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、オステオカルシン産生、オステオネクチン mRNA 発現、カルシウム沈着を測定することによって検討した。培養 HPLSCs を 24 ウェルプレートに播種し、細胞がコンフルエントになったのち、1、10、100 ng/mL に調整した新規骨形成剤ペプチドを含む培地と交換して 1、3、7 日後に細胞を回収して、細胞の ALP 活性は吸光度によって、DNA 量は dsDNA アッセイキットによってそれぞれ測定した。最も高い ALP 活性および DNA 量を示した新規骨形成剤ペプチドの濃度を以後の研究に用いた。

(2) 間葉系幹細胞に対する新規骨形成剤ペプチドの影響

間葉系幹細胞についても (1)②と同様に ALP 活性、オステオカルシン産生、オステオネクチン発現、カルシウム沈着を測定するために培養し、新規骨形成剤ペプチドを添加して検討した。

(3) HPLSCs に対する新規骨形成剤ペプチドと既製のエナメルマトリックスデリバティブとの比較

HPLSCs に対する新規骨形成剤ペプチドと既製のエナメルマトリックスデリバティブの影響を調べるためにオステオカルシンの産生量について Gla タイプ・オステオカルシン EIA キットを用い ELISA 法によって検討した。一方、遺伝子発現については培養 2、3 週後に細胞を回収し QIAcube および RNeasy Mini キットを用いて total RNA を抽出し、各 RNA から SuperScript VILO 合成キットを用いて逆転写を行い、cDNA を作製し、Real Time PCR 法によって解析した。

(4) 新規骨形成剤ペプチド刺激の培養 HPLSCs の遺伝子発現

HPLSCs は、通常の培地で培養したもの、骨芽細胞用培地で培養したもの、および骨芽細胞用培地での培養に新規骨形成剤ペプチドを添加したものの 3 種類とした。これらの培養 HPLSCs を回収し、PBS で洗浄して市販キットを用いて total RNA を抽出し、total RNA から cDNA そして dsDNA を合成し、次いで cRNA へ転写し、網羅的遺伝子解析であるマイクロアレイ解析を行った。

(5) 細胞シート

-80°C で冷凍保存の HPLSCs を起眠させ、細胞シート回収用温度応答性細胞培養器材である 12 穴マルチウェルの UpCell11® に細胞を播種

し通常の培養環境下で培養し、完全にコンフルエントになるように培養を行った。次いで、細胞シート回収用支持体である CellShifter™ 1 枚を培養細胞上に静置して室温に戻るまで放置し、細胞がプレートから剥離するまでそのままの状態に維持した。培養細胞が CellShifter™ に移行したのちに、CellShifter™ を培養液で満たしたシャーレに移した。これを 1 枚の CellShifter™ につき 6 回繰り返し、6 層の細胞を張り付けた CellShifter™ を 2 枚用意し、細胞どうしが向き合うように密着させた。これを 4%ホルマリンで固定して 20%スクロースに浸漬し、-80℃で凍結して凍結切片を作製し DAPI で染色してオールインワン蛍光顕微鏡で観察した。

(6) その他、研究で用いた培養 HPLSCs の応用

HPLSCs を用いて歯周病における歯周組織再生に影響する因子である歯周病原細菌および糖尿病の側面から高血糖状態についても検討を行った。

4. 研究成果

(1) HPLSCs に対する新規骨形成剤ペプチドの効果

分離培養した HPLSCs は免疫組織化学的にビメンチンおよび STRO-1 に陽性で、サイトケラチンに陰性であった。新規骨形成剤ペプチドとともに骨芽細胞用培地で培養した HPLSCs には多量の石灰化物の形成および ALP 活性の増強がみられた。また、培養の初期にはオステオネクチン産生が、そして後期にオステオカルシン産生が増強した。以上のことから、新規骨形成剤ペプチドは HPLSCs を骨芽細胞の特徴を示す細胞へ分化誘導させたので、歯周組織再生の有力な材料となり得ることが示唆される (Kato H et al. 2013,

doi: 10.1902/jop.2012.120469.)。

(2) ヒト間葉系細胞に対する新規骨形成剤ペプチドの効果

市販の培養ヒト間葉系幹細胞に新規骨形成剤ペプチドを添加すると、ALP 活性、コラーゲンタイプ I C-ペプチド形成およびオステオカルシンの産生を増強し、それらの産生は細胞外シグナル関連キナーゼを阻害することによって低下したことから、間葉系幹細胞においても新規骨形成剤ペプチドは骨芽細胞への分化を促進し、それは細胞外シグナルキナーゼを介して起こることが示唆される (Katayama N, et al. 2014,

doi:10.3390/ijms150814026.)。

(3) HPLSCs に対する新規骨形成剤ペプチドと既製のエナメルマトリックスデリバティブとの比較

HPLSCs に対するオステオカルシンと血小板由来成長因子 β は、Real Time PCR 法による解析では、培養 2、3 週ともに増加したが、オステオカルシンの産生量については培養 3 週

後には新規骨形成剤ペプチドよりも既製エナメルマトリックスデリバティブのほうが有意に増加した (田幡 元、他 日本歯科保存学雑誌 2014; 57: 130-136)。

(4) 新規骨形成剤ペプチド刺激による HPLSCs の遺伝子発現

Leucine-rich repeat-containing protein (LRR) の遺伝子発現が 35 倍増強していた。LRR 遺伝子は骨芽細胞に強く発現する遺伝子であるので、新規骨形成剤ペプチドは、HPLSCs を骨芽細胞へと分化誘導する可能性をもつことが示唆される。その他の遺伝子では、PIP、SAA1、FKBP5、GPM6B、IGF2、CPM、RASL11B、XPNPEP3、STK31、MT1X、ANGPTL4、LEP、RERG、DPT、BMP 6 precursor が増強し、thymosin- β も若干増強した。骨芽細胞に発現するといわれている LRR およびエナメルタンパクの発現に係る thymosin- β 発現の増強が新規骨形成剤ペプチド刺激でみられたことから、本ペプチドの作用を分子レベルで解明できつつある (富永和也、他 2015、田中昭男、他 2016)。

(5) 細胞シート

-80℃で冷凍保存の HPLSCs を起眠させ、細胞シート回収用温度応答性細胞培養器材である 12 穴マルチウェルの UpCell® に細胞を播種して通常の培養環境下で、完全にコンフルエントになるように培養を行った。培養 14 日の単一細胞 (図 1-1) と細胞シート (図 1-2) では明らかに細胞密集度が異なっていた。単一細胞では、細胞密度はまばらであったが、細胞シートでは細胞密度は高く、細胞間の隙間はみられなかった。1 枚の CellShifter™ につき 6 層程度の細胞を張り付けた CellShifter™ を 2 枚用意し、細胞どうしが向き合うように密着させ、凍結切片を作製し、DAPI で染色してオールインワン蛍光顕微鏡で観察し、数層の細胞の存在を確認した (図 2)。



図 1-1 歯根膜幹細胞の単一細胞



図 1-2 歯根膜幹細胞の細胞シート

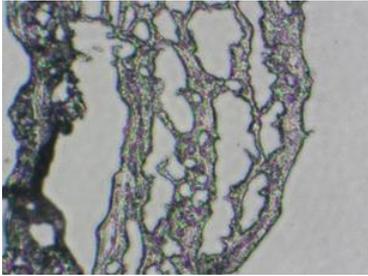


図 2 歯根膜幹細胞の積層断面像

(6) その他 HPLSCs を用いた成果

①HPLSCs に *Porphyromonas gingivalis* リポポリサッカライドを作用させ、HPLSCs の骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討した結果、ALP 活性およびコラーゲンタイプ I $\alpha 1$ 活性の低下を引き起こし、炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-6、および IL-8 の産生を惹起した。したがって、炎症が助長されることから歯周病において HPLSCs の骨芽細胞への分化を阻害することが考えられ、歯周病原細菌が歯周組織再生に対して悪影響を与える科学的根拠が得られた (Kato H et al. 2014, doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.11.008.)。

②糖尿病は歯周病の大きな危険因子であり、種々な細胞機能に影響を与える。とくに HPLSCs に対しては高血糖状態では細胞増殖および骨芽細胞への分化を抑制したが、NF- κ B および IL-6 と IL-8 の発現を誘導した。NF- κ B の阻害剤を HPLSCs の培養液に添加すると IL-6 の発現が抑制されたことから、糖尿病を併発している歯周病患者では HPLSCs の増殖および骨芽細胞への分化が抑制され、それが NF- κ B 経路を介することが示唆される

(Kato H et al. 2016, doi: 10.1902/jop.2015.150474.)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- (1) Katayama N, Kato H, Taguchi Y, Tanaka A, Umeda M. The effects of synthetic oligopeptide derived from enamel matrix derivative on cell proliferation and osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci* 査読有 2014; 15: 14026-14043.

(Doi:10.3390/ijms150814026.)

- (2) Kato H, Katayama N, Taguchi Y, Tominaga K, Umeda M, Tanaka A. A synthetic oligopeptide derived from enamel matrix derivative promotes the differentiation of human periodontal ligament stem cells into osteoblast-like cells with increased mineralization. *J Periodontol* 査読有 2013; 84: 1476-1483.

(Doi:10.1902/jop.2012.120469.)

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) 田中昭男、竹内友規、本田秀太、富永和也、嘉藤弘仁、和唐雅博、岡村友玄、梅田誠. 新規合成ペプチドに対する歯根膜幹細胞の遺伝子発現. 第 23 回日本歯科医学会総会, 2016 年 10 月 21~23 日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

- (2) 富永和也, 嘉藤弘仁, 岡村友玄, 和唐雅博, 西川哲成, 田中昭男. ヒト HPLSCs に対する新規合成ペプチド効果の遺伝子的観察. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会. 2015 年 9 月 11 日~13 日, 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市)

- (3) 嘉藤弘仁, 片山暢仁, 奥田麻貴子, 富永和也, 田口洋一郎, 梅田 誠, 田中昭男. Emdogain®由来新規合成ペプチドによるヒト歯根膜由来幹細胞に対する効果について. 第 55 回秋季日本歯周病学会学術大会 2012 年 9 月 23 日, つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 昭男 (TANAKA, Akio)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 10121823

(2) 研究協力者

嘉藤 弘仁 (KATO, Hirohito)
大阪歯科大学大学院生

山脇 勲 (YAMAWAKI, Isao)
大阪歯科大学大学院生