

論文内容要旨

アメロゲニンペプチドの骨代謝関連細胞に対する
影響とペプチド固定化の有効性の検討

応用生命科学部門 歯科矯正学

(主指導教員：谷本 幸太郎 教授)

統合健康科学部門 口腔生物工学

(副指導教員：二川 浩樹 教授)

応用生命科学部門 歯科矯正学

(副指導教員：廣瀬 尚人 助教)

栗田 哲也

医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻

論文内容要旨

論文題目 : アメロゲニンペプチドの骨代謝関連細胞に対する影響とペプチド固定化の有効性の検討

学位申請者 栗田 哲也

アメロゲニンは、エナメル質の形成期にエナメル芽細胞より分泌される細胞外基質で、約 90%を占める蛋白質である。硬組織を無細胞性に誘導する働きを有しており、エナメル質形成に関与している。近年、ブタの幼若エナメル蛋白抽出物であるエムドゲイン[®]が製品化され、組織再生療法の一つとして臨床的に有用であることが数多く報告されている。しかしながら、エムドゲイン[®]は様々な蛋白を含有しており、どの構成成分が組織再生効果に関与しているのか、詳細は不明である。また、動物由来であることから、抗原性や品質の安定性は定かではない。我々は、アメロゲニンに組織再生効果があると考え、ヒト完全長アメロゲニンを精製するとともに、歯周組織構成細胞に対する影響について検討を重ねてきた。その結果、ヒト完全長アメロゲニンが培養ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(MSCs)や、培養ヒトセメント芽細胞における細胞増殖能、および基質産生能を亢進させることが明らかとなった。しかしながら、アメロゲニンは、生体内では酵素により様々な断片に分解される。また、完全長アメロゲニンは、C 末端側に親水性領域、N 末端側に疎水性領域を有するため、強い極性を帯びており、生理的条件下では、凝集し、生理活性が低下する。そのため、生体で用いた場合に安定した効果を発揮しづらいと考えられる。蛋白質において、他の分子との相互作用に必要な活性部位を探索することは、その蛋白質の構造や機能の解明に繋がる。そして、活性部位が明らかになれば、分子量の小さいペプチドを工業的に精製することが容易となり、安定した供給が可能となる。これまでの研究により、アメロゲニンの C 末端に活性部位が存在し、その作用により、ヒト培養セメント芽細胞の代謝調節に影響を及ぼすことが示された。近年、単独では構造的に不安定で生体内で活性が消失しやすい細胞増殖因子の欠点を細胞外マトリックスと組み合わせることで克服する **tissue engineering** を用いた骨再生に関する研究が盛んに行われるようになってきた。C 末端側アメロゲニンペプチド (以下; **amgCP**) を生体材料の表面に固定化して用いることにより、アメロゲニンの持つ生理活性効果が持続し、MSCs や骨芽細胞の代謝を効果的に調節できると推察される。本研究では、**amgCP** が MSCs および骨芽細胞の代謝調節機構に及ぼす影響について検討を行った。また、**amgCP** を Au 基板に固定化し、その上で細胞を培養することにより、**amgCP** 処理の有効性を検討することを目的とした。

実験には、ヒト骨髄由来 MSCs (以下; hMSCs) およびマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞 (以下; MC3T3-E1) を用いた。各培養細胞に amgCP を添加し、細胞増殖能と骨基質産生能に及ぼす影響について検討を行った。細胞増殖能については、Cell Proliferation ELISA BrdU kit 及び MTS assay を用いた。骨基質産生能については、定量 PCR を用いて alkaline phosphatase (以下; ALP)、Bone sialoprotein (以下; BSP) などの骨形成関連遺伝子の発現を解析するとともに、Western blot 解析により、蛋白質発現の変化についても評価した。

また、amgCP 添加が、hMSCs のシグナル伝達機構に及ぼす影響について検討を行った。アモロゲニンの細胞膜受容体である LAMP-1 レセプターと、これに関連した ERK1/2 のブロックが、amgCP 添加による細胞増殖能と p-ERK のリン酸化蛋白質発現に及ぼす影響について評価した。

さらに、Au 基板上にカルボジイミド法を用いて amgCP を固定化し、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法によって固定化されたペプチドの定量を行った。作製された amgCP 固定化基板上で培養した細胞における細胞増殖能、および骨基質産生能について検討を行った。

その結果、以下のことが明らかとなった。

1. hMSCs および MC3T3-E1 において、amgCP を添加することにより、細胞増殖能の有意な亢進が認められた。また、MC3T3-E1 の骨基質産生能は、amgCP 添加による有意な変化は認められなかったが、hMSCs の骨基質産生能は有意な亢進が認められた。
2. hMSCs においては、LAMP-1 レセプターをブロックすることにより、amgCP 添加による細胞増殖能の亢進が有意に抑制された。また、amgCP の添加により亢進した細胞増殖能が ERK1/2 の上流に位置する MEK1/2 阻害剤の添加により有意に抑制された。これらの結果より、amgCP 添加は LAMP-1 レセプターを介して ERK1/2 を活性化し、hMSC の細胞増殖に影響を及ぼすことが明らかとなった。
3. カルボジイミド法を用いて Au 基板上に固定化した amgCP を SPR 法にて定量した結果、結合量は 13 ng/cm^2 であった。作製した amgCP 固定化基板上で培養した細胞に対して、細胞増殖能および骨基質産生能を検討した結果、培養 hMSCs および MC3T3-E1 の細胞増殖能の有意な亢進が認められた。また、培養 hMSCs の骨基質産生能は亢進する傾向が認められた。

以上の結果より、amgCP は、培養 MSCs および骨芽細胞の細胞増殖能を亢進させることが明らかとなった。また、その作用機序として、LAMP-1 受容体を介した ERK1/2 の活性化が示された。さらに、amgCP 固定化の有効性が明らかとなったことより、生体材料に対する amgCP 固定化を応用した骨再生治療の可能性が示唆された。