

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05024

研究課題名(和文) 新規う蝕治療法の創出へ向けた象牙質再石灰化・再生技術の展開

研究課題名(英文) Development of dentin remineralization/regeneration thchnology toward creation of new caries treatment

研究代表者

齋藤 隆史 (SAITO, TAKASHI)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：40265070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、象牙質再石灰化技術および象牙質再生技術のハイブリッド技術を基盤として、多機能性接着修復材料を開発し、その修復技術を開発・普及させることによって新しい齲蝕療法開発の一助となる知見を得ることを目的とした。象牙質リンタンパク質由来ペプチドは象牙芽細胞の増殖、分化、石灰化を誘導した。本ペプチドの作用を増強するキャリアとして安全性の高い魚由来コラーゲン、co-factorとして nephronectin, laminin を添加することにより、多機能性接着修復材料の開発が可能になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to obtain knowledge that aids in the development of new caries therapy by developing and disseminating multifunctional adhesive restoration materials/technology based on hybrid technology of dentin remineralization/regeneration technology. Dentin phosphoprotein derived peptide induced proliferation, differentiation and mineralization of odontoblasts. Moreover, it was suggested that by adding fish derived collagen as a safe carrier and/or nephronectin, laminin as co-factors enhancing the action of the peptide, it becomes possible to develop multifunctional adhesive restoration material.

研究分野：歯科保存学

キーワード：象牙質再石灰化

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢社会を迎え、人々の医学に対する要求が「長生き」から「QOLの向上」へと変化した近年、種々の臓器や組織の再生をめざす再生医学が注目されるようになった。特に硬組織の再生は人のQOLに関連する重要な事項であり、我々の歯学分野においても、齲蝕や歯周病によって生じた歯質、歯槽骨欠損による咬合・咀嚼を中心とする口腔機能の低下を人工代替物により回復させるだけではなく、歯質、歯槽骨組織の誘導修復技術の開発が望まれている。歯周病学領域では、エナメルマトリックスデリバティブ(EMD)の応用など細胞生物学的概念に基づく治療法が提案され、歯周病治療が積極的な治療法に転換された。また、保存修復学・歯内療法学領域においても、歯を長期にわたり口腔内に保存し、機能を営ませるための象牙質・歯髄複合体の意義が再認識されており、自己修復能力を最大限に利用して組織を誘導しようとする再生歯学の概念が登場してきた。

(2) 古くから保存修復治療、歯内療法において、齲蝕によって喪失した象牙質を再生させ、歯髄組織を可及的に保存する歯髄保存療法が試みられてきた。覆髄剤・断髄剤として主に水酸化カルシウム製剤が使用されてきた。しかし水酸化カルシウムの高pHによる歯髄為害性が懸念され、近年、接着性レジンシステム、リン酸カルシウム系材料等が応用されているが、修復象牙質の形成量、形成に要する期間の点で水酸化カルシウムを凌駕する薬剤・材料は見当たらない。したがって、生体親和性を有し、短期間のうちに強力に修復象牙質を誘導する再生材料・技術の開発が望まれている。

2. 研究の目的

これまでに申請者らの研究グループが開発してきた象牙質再石灰化技術および象牙質再生技術のハイブリッド技術を基盤として、多機能性接着修復材料を開発し、その修復技術を開発・普及させることによって新しい齲蝕療法開発の一助となる知見を得ることを目的とした。そのために以下のことを目的として研究を遂行した。

(1) 象牙質再生技術において、象牙質リタンパク質由来ペプチドの象牙芽細胞の増殖・分化への影響を検討する。

(2) 象牙質再石灰化技術および象牙質再生技術の効果を増強するキャリア因子や協働因子 co-factor の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 本材料を添加したラット象牙芽細胞様細胞株を10% FBS, 50 µg/ml アスコルビン酸、10 mM β-グリセロリン酸含有DMEM で培養す

る。細胞増殖はCell Counting Kit-8 (同仁化学)を用いて測定した。アルカリフォスファターゼ活性をLab assay ALP キット(和光純薬)を用いて測定した。さらに、RT-PCR 法により象牙芽細胞の分化マーカーであるDSPP, DMP-1, コラーゲンタイプI, OCN, OPN, ON, RUNX2 等の各遺伝子発現を検討した。また、Alizarin Red 染色により石灰化誘導の確認を行った。

(2) 魚(ティアラピア)鱗由来コラーゲンコーティングがラット象牙芽細胞様細胞株の増殖・分化・石灰化に及ぼす影響を検討した。

(3) 細胞接着性因子で、カルシウム結合能を有する nephronectin, laminin111, laminin411, laminin511 (インテグリン結合性断片)のラット象牙芽細胞様細胞株あるいはヒト歯髄幹細胞の増殖・分化・石灰化に及ぼす影響を検討した。

(4) ヒト象牙質ブロックを切り出し、35%リン酸ゲルで15秒間脱灰処理を行った。試料をCO₂レーザー照射・非照射群、さらにフッ化物イオン含有溶液浸漬・非浸漬群の4群に分けて試料とした。

レーザー照射は、CO₂レーザー (Nanolaser GL-III、ジーシー)を試料から10mm離して0.5W(1.5W/cm²)で5秒間照射した。1日、1週、2週、1か月後にnano-indentation試験により象牙質の機械的特性(硬さ、弾性係数)を測定し、象牙質表面をSEMで観察した。

4. 研究成果

(1) 象牙質リタンパク質由来ペプチド SRGDASYNSDESKD 0.5mg/ml が最もアルカリフォスファターゼ活性を上昇させ(培養7日後)、DMP-1 mRNA 発現を2倍以上上昇させた(10日後)。さらに同ペプチドが象牙芽細胞の石灰化 nodule 形成を促進することが明らかになった(図1)。

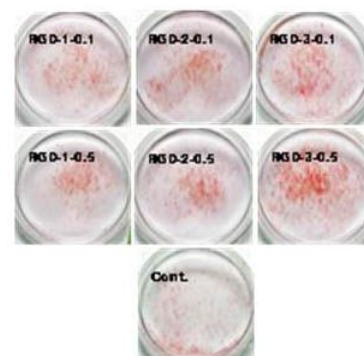


図1 象牙質リタンパク質由来ペプチドによる石灰化誘導促進作用

(2) 安全性の高い魚(ティアラピア)鱗由来コラーゲンは生体親和性を示し、さらにブタ皮膚由来コラーゲンと同様に象牙芽細胞の増殖を上昇させ、アルカリフォスファターゼ活

性を上昇させた（10日後）。また BSP mRNA 発現を増強させ、石灰化誘導を促進することが明らかになった。

(3) nephronectin は魚（ティラピア）鱗由来コラーゲンと同様に、象牙芽細胞の増殖を刺激し、さらに高い石灰化誘導能を有することが明らかになった（図2）。

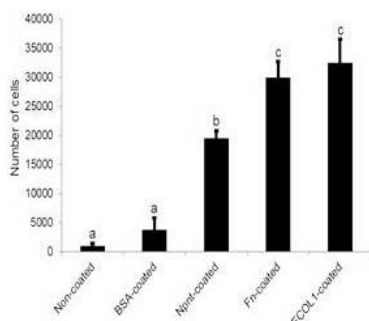


図2 nephronectin による象牙芽細胞の増殖促進作用

ラミニン断片である LN-511, LN-411 リコンビナントタンパクを細胞培養ディッシュにコーティングし、象牙芽細胞用細胞あるいはヒト歯髄幹細胞を培養したところ、細胞増殖を刺激し、DMP-1、DSPP mRNA（象牙質形成関連遺伝子）の発現を増強し、石灰化を誘導した。

(4) CO₂ レーザー照射後にフッ化物イオン含有溶液に浸漬すると、象牙質の硬さが上昇し、象牙質表面を石灰化物が完全に被覆している像が認められ、脱灰象牙質の再石灰化が生じていることが確認された（図3）。

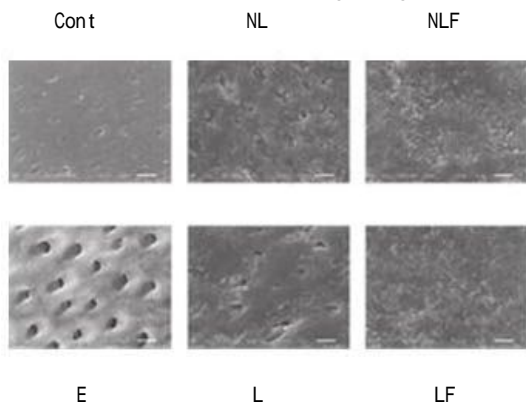


図3 SEMによる象牙質表面の観察。
Cont: 脱灰前、E: 脱灰後

(1)~(4)の研究結果から、象牙質リントタンパク質由来ペプチドSRGDASYNSDESKD (0.5mg/ml)は象牙芽細胞の増殖、分化、石灰化を誘導し、本ペプチドの作用を増強するキャリアとして安全性の高い魚（ティラピア）由来コラーゲン、協働作用を発揮するco-factorとしてnephronectin, laminin（インテグリン結合性ラミニン断片）を添加することにより、象牙質再石灰化技術および象牙質再生技術のハイブリッド技術を基盤とした

多機能性接着修復材料の開発が可能になると考えられた。さらに歯科用レーザーとフッ化物イオンの組合せが多機能性接着修復材料の機能を増強することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計14件)

1. Tang J, Saito T. A Novel Fragment Derived from Laminin-411 Facilitates Proliferation and Differentiation of Odontoblast-Like Cells. *Biomed Res Int*. 2018 May 9;2018:9465383. doi: 10.1155/2018/9465383. 査読有り
2. Tang J, Saito T. Laminin-1 acts as an adhesive for odontoblast-like cells and promotes their differentiation toward a hard tissue-forming phenotype. *J Oral Sci* 2018 Apr 16. doi: 10.2334/josnusd.17-0286. [Epub ahead of print] 査読有り
3. 松田康裕、奥山克史、山本洋子、大木彩子、Khatun MM、佐野英彦、斎藤隆史. フッ化物含有知覚過敏抑制材による象牙質表面の脱灰抑制効果. *日歯保存誌* 60, 273-281, 2017. 査読有り
4. Tang J, Saito T. The role of nephronectin on proliferation and differentiation in human dental pulp stem cells. *Stem Cells Int* 2017, Article ID 2546261, 14 pages, <https://doi.org/10.1155/2017/2546261> 査読有り
5. Tang J, Saito T. Dexamethasone stimulates nephronectin expression and mediates mineralization in MDPC-23 cell via Akt/mTOR signaling pathway. *Biol Eng Med* 2: 1-6, 2017. 査読有り
6. Tang J, Saito T. Nephronectin stimulates the differentiation of MDPC-23 cells into an odontoblast-like phenotype. *J Endod* 43(2), 263-271, 2017. 査読有り
7. Tang J, Saito T. Human plasma fibronectin promotes proliferation and differentiation of odontoblast. *J Appl Oral Sci* 25(3), 299-309, 2017. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0442. 査読有り
8. 飯嶋雅弘、伊藤修一、川村尚彦、斎藤隆史、溝口 到. CO₂ レーザー照射とガラスイオノマーセメントによる象牙質の再石灰化. *日本レーザー歯学会誌* 27(3), 101-107, 2016. 査読有り
9. Tang J, Saito T. Effect of dentin phosphophoryn-derived RGD peptides on odontoblast-like cells. *Int Endod J* 49 (7), 670-83, 2016. 査読有り
10. Bessho K (8人省略、9番目). Comparison of human mesenchymal stem cells

derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *Int J Oral Maxillo Surg* 45:124-131, 2016. 査読有り.

11. Bessho K (12人省略、13番目). Antagonistic functions of USAG-1 and RUNX2 during tooth development. *PLoS One*. 2016 Aug 12;11(8) e0161067 査読有り
12. Murata M (10人省略、1番目). Highly porous -TCP block with triple pore structure in rat subcutaneous tissue and sheep iliac critical bone defect. *Key Engineering Materials* 696: 187-191, 2016 査読有り
13. Tang J, Saito T. Biocompatibility of Novel Type I Collagen Purified from Tilapia Fish Scale: An In Vitro Comparative Study. *Biomed Res Int*. 2015;2015:139476. doi: 10.1155/2015/139476. Epub 2015 Sep 27. 査読有り
14. Tang J, Saito T. Effect of type I collagen derived from tilapia scale on odontoblast-like cells. *Tissue Engin Regen Med*, 12, 4, 231-238, 2015. 査読有り

〔学会発表〕(計 17 件)

1. Tang J, Saito T. Nephronectin promotes proliferation and differentiation of odontoblast-like cells. 第146回日本歯科保存学会, 2017.
2. Qiu Y, Tang J, Saito T. The *in vitro* effects of CCN2 on odontoblast-like cells. 第146回日本歯科保存学会, 2017.
3. 八木香子, 山本洋子, 上村玲央, 奥山克史, 松田康裕, 鈴木耕拓, 林美加子. In-air micro-beam PIXE/PIGE によるCa を含有したガラスアイオノマーセメントを塗布した根面象牙質の耐酸性評価. 第146回日本歯科保存学会, 2017.
4. Tang J, Saito T. Effect of Nephronectin on proliferation and differentiation of odontoblast-like cells. The 95th IADR, 2017.
5. Iijima M, Kawaguchi K, Kawamura N, Ishikawa R, Ito S, Saito T, Mizoguchi I. In vitro Effect of S-PRG containing paste in dentin remineralization. The 95th IADR, 2017.
6. Yagi K, Yamamoto H, Uemura R, Okuyama K, Matsuda Y, Suzuki K, and Hayashi M. Evaluation of the acid resistance of root dentin when applying fluoride containing materials incorporating Ca using in-air micro- PIXE/PIGE. *International Dental Material Congress* 2016, 2016.
7. Tang J, Saito T. Comparative study of fibronectin and type I collagen in terms of their *in vitro* effects on odontoblast-like cells. The 20th annual meeting of Taiwan academy of operative dentistry, 2016.
8. 松田康裕, 奥山克史, 山本洋子, 大木彩子, 泉川昌宣, 油井知雄, 伊藤修一, 佐野英彦, 齋藤隆史. フッ化物含有知覚過敏抑制材による象牙質表面の脱灰抑制効果. 第145 回日本歯科保存学会, 2016.
9. Matsuda Y, Okuyama K, Yamamoto H, Ooki S, Izumikawa M, Yui T, Ito S, Sano H, Saito T. Demineralize prevention of dentin with S-PRG varnish via automatic pH-cycling. 146th scientific meeting of the Korean Academy of Conservative Dentistry (KACD), 2016.
10. Tang J, Saito T. An *in vitro* study of Nephronectin on proliferation and differentiation of odontoblast-like cell. 146th scientific meeting of the Korean Academy of Conservative Dentistry, 2016.
11. ALapati SB, Iijima M, Brantley WA, Ito S, Muguruma T, Saito T, Mizoguchi I. *In vitro* Investigation of Nanoproperties at Dentin-Pulp Capping Material Interface. 94th IADR, 2016.
12. 藤田裕介, 伊藤修一, 村井雄司, 近藤有紀, 齋藤隆史, 齊藤正人. ボンディング材における接着性モノマー添加による象牙質接着性に対する影響. 第54 回日本小児歯科学会, 2016.
13. 近藤有紀, 伊藤修一, 佐藤夕紀, 植原治, 倉重圭史, 齋藤隆史, 齊藤正人. 新規バイオアクティブセメントのバイオフィルム形成抑制能および細胞増殖活性に対する影響. 第54 回日本小児歯科学会, 2016.
14. Tang J, Saito T. Biocompatibility of Novel Type I Collagen Purified from Tilapia Fish Scale: An In Vitro Comparative Study. 第143 回日本歯科保存学会, 2015.
15. 松田康裕, 齋藤隆史, 奥山克史, 大木彩子, 橋本直樹, 佐野英彦, 山本洋子, 岩見行晃, 林美加子, 能町正治, 山田尚人, 喜多村茜, 佐藤隆博, 安田啓介. 脱核反応による歯質中のフッ素分布測定12. 第10 回高崎量子応用研究シンポジウム, 2015.
16. 飯嶋雅弘, 伊藤修一, 齋藤隆史, 溝口到. CO₂ レーザー照射とフッ化物塗布を併用したエナメル質の脱灰抑制. 第27 回日本レーザー歯学会, 2015.
17. 近藤有紀, 伊藤修一, 高田一江, 植原治, 倉重圭史, 齋藤隆史, 齋藤正人. 新規バイオアクティブセメントの物理化学的特

性について. 第53回日本小児歯科学会,
2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: ラミネン断片を含有する歯の象牙質及
び/又は歯髄の疾患、障害又は症状を
治療又は予防するための医薬

発明者: 唐佳、斎藤隆史

権利者: 学校法人東日本学園

種類: 特許

番号: 特願 2018-67591

出願年月日: 2018年3月30日

国内外の別: 国内

名称: ネフロネクチンを含むう蝕治療剤

発明者: 唐佳、斎藤隆史

権利者: 学校法人東日本学園

種類: 特許

番号: 特願 2016-79544

出願年月日: 2016年4月12日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斎藤 隆史 (SAITO TAKASHI)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号: 40265070

(2) 研究分担者

村田 勝 (MURATA MASARU)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号: 00260662

伊藤 修一 (ITO SHUICHI)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号: 50382495

別所 和久 (BESSHO KAZUHISA)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号: 90229138

松田 康裕 (MATSUDA YASUHIRO)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号: 50431317