

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11704

研究課題名(和文) バイオインフォマティクス技術を用いた歯髄創傷治癒に基づく覆髄剤の開発

研究課題名(英文) Development of pulp capping material based on the wound healing mechanism of the pulp tissue using bioinformatics

研究代表者

高橋 雄介 (TAKAHASHI, YUSUKE)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：60397693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、我々がこれまでに発見した歯髄創傷治癒促進作用を持つタンパク質のアミノ酸配列の中からバイオインフォマティクス技術を用いて機能部位を検索し、機能部位を含むペプチド化合物を覆髄材として応用することを目的として実施された。

その結果、ProteinS100ファミリータンパク質の中から配列アライメント解析にて機能をもつと思われる部位を特定し、得られたペプチドが実際に機能をもつかについてペプチドアレイ法にて検討したところ、いくつかのペプチドが歯髄細胞のALP活性を促進することが明らかとなった。今後得られたペプチドを用いたラット直接覆髄実験を実施し、覆髄材としての機能を評価していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまでの歯科臨床に置いて存在しなかった歯髄の創傷治癒機転に基づく生物学的覆髄材の開発に向けて、大きな科学的知見が得られた。覆髄時に第三象牙質の形成を誘導する効果をもつタンパク質のアミノ酸配列の中から機能的役割を担うペプチド化合物を得て、覆髄材へと応用しようとする試みはこれまでに報告がなく、その学術的意義は非常に高いと考えられる。また、本研究成果を基に新しい覆髄材が開発されたら、歯髄保存の可能性がこれまでよりも向上するとともに、歯の寿命の延長の可能性も上昇し、ひいては健康寿命の延伸へもつながる可能性があり、非常に社会的意義も大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：This research aimed to develop a biological pulp capping material which could promote the wound healing process of dentin-pulp complex. We already discovered some proteins which promoted tertiary dentin formation in vivo. Bioinformatic analysis in silico was performed to compare the sequential alignment among protein S100 family proteins or among some mammalian species. As a result, we found some functional domains from the full-length proteins. Then, peptide array analysis was performed to investigate which peptide showed promotive effects on ALP activity of dental pulp cells and we could extract some specific peptides which revealed positive effects. Now, we are performing in vivo pulp capping experiments to investigate which peptide is the most suitable or critical for the wound healing process of dentin-pulp complex as a novel pulp capping material after cavity preparation using rat molars.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯学 歯髄 覆髄 バイオインフォマティクス 創傷治癒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生活歯が歯髄を喪失すると、外来刺激に対する警報装置としての機能を果たさなくなるだけでなく、根尖性歯周炎や歯根破折発生のリスクを向上させ、歯の寿命が短くなることが知られている(Elderton, Adv Dent Res, 1990)。それゆえに歯髄保存の重要性が着目されており、Mineral Trioxide Aggregate (MTA)などの覆髄材が近年歯科臨床に導入されるに至った。しかし、従来から用いられている水酸化カルシウム製剤に加え、MTA などの新しい材料を用いても、直接覆髄の成功率は60~80%程度との報告が多く(Aguilar et al. J Endod, 2011, Mente et al. J Endod, 2014)、改善の余地を多く残している。また、これまでに成長因子などを歯髄再生を目的とした薬剤として使用するような研究も行なわれてきたが、実用には至っていない。着目すべき点は、これまでの研究やすでに臨床導入されたすべての材料が歯髄の創傷治癒メカニズムに基づく薬剤ではないということである。さらに、患者の歯髄細胞を採取して、抜髄された歯髄腔に移植する歯髄再生療法も行われているが(Nakashima et al. J Endod, 2014)、同一患者から移植用歯髄組織を採取する困難さに加え、準備期間が長期間にわたること、高コストになることなどが想定される。一方、われわれは、歯髄の創傷治癒メカニズムに着目し、その治癒を促進するような分子の同定に成功した。

われわれはこれまで、歯髄の創傷治癒メカニズムに基づき、歯髄の治癒を促進するような生物学的根拠に基づいた覆髄剤の開発を目指してこれまで研究をおこなってきた。

(1) 象牙質 - 歯髄複合体の創傷治癒過程における発現遺伝子の解析

窩洞形成後のラット歯髄における遺伝子発現の変動をマイクロアレイにて検索し、Matrix Metalloproteinase 分子やその制御因子である Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 が象牙質 - 歯髄複合体の創傷治癒に影響を与える可能性を明らかにした(Yoshioka, Takahashi et al. J Biochem, 2013)。

(2) 象牙質基質分解産物が歯髄の創傷治癒に与える影響

歯髄細胞にとっての細胞外基質である、象牙質基質中に含まれるタンパクが MMP 分子によって分解を受け、その分解産物が歯髄の創傷治癒を促進することを明らかにした(Okamoto, Takahashi et al. Sci. Rep, 2018)。

(3) 象牙質基質分解産物の同定ならびに機能解析

象牙質基質分解産物をプロテオーム解析することで、歯髄の創傷治癒を促進する分子の同定ならびに同定された分子(Prolactin-inducible protein, S100-A7、Junction plakoglobin)の機能解析をおこない、歯髄創傷治癒に有効な分子の絞り込みを進めてきた(Komichi, Takahashi et al. Cells, 2019)。

以上の結果より、象牙質 - 歯髄複合体の創傷治癒を促進する分子の候補が明らかとなった。本申請課題は、これらの結果をさらに発展させ、臨床で用いる覆髄剤の開発へと研究を進めていく計画である。これまでに得られた候補分子はすべてタンパクであるため、実際の臨床においてこのまま覆髄剤として用いるには困難が伴うと考えられる。それは、組換えタンパクの使用に対する安全性の問題およびコストが高価になるという懸念である。われわれは、今後の臨床応用を考慮すると、安全性が高く、かつ安価な薬剤を開発していくことが必須であると考え、タンパクの中から機能ドメインを抽出し、タンパクよりも分子量が小さく、合成が容易なペプチド化合物を覆髄剤として用い、その機能を解析することで、上記の問題点を解決可能な覆髄剤の開発が可能になると考え、本研究の着想を得た。

これまでの研究で得られた候補タンパク(Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1、Prolactin-inducible Protein、Junction Plakoglobin、S100-A7)の中で歯髄創傷治癒を促進す

る特異的な機能領域を検索、決定を経た後、その機能ペプチドを用いて直接覆髄実験をおこなうとともに、歯髄細胞との相互作用についても検証していく予定である。

また、上記手法による覆髄剤の評価には、これまで行ってきた病理組織学的手法にて、歯髄の炎症状態や第三象牙質の形成についての評価を行うことに加え、最新機器であるナノCTを用いた三次元的解析を行うことで、形成された第三象牙質について従前よりも高精度な定量的ならびに定性的評価を行い、これまでは明瞭な評価基準が存在しなかった覆髄剤の客観的評価方法の確立も視野に入れて検証したい。

2．研究の目的

本研究では、バイオインフォマティクスの技術を応用した生物学的覆髄剤の開発を目的とし、歯髄創傷治癒を促進するタンパクの機能ドメインや、さらに断片化したモチーフ構造を含むペプチドが歯髄に与える影響を *in vivo*、*in vitro* で検討を行う。その成果により、これまで存在しなかった観点からの歯髄保存療法の確立ならびに臨床的応用を目指す。

3．研究の方法

(1) Protein S100-A7 の分解・非分解における覆髄材としての機能評価

これまで一連の研究においてわれわれが見出した、歯髄の創傷治癒を促進する効果をもつ可能性があるタンパクである、Protein S100-A7 (以下 S100A7 と記す) の全長構造を維持したまま、もしくは MMP20 で酵素処理した各種タンパク分解産物を覆髄材として用いた直接覆髄実験をラットを用いた動物実験系にて実施し、高解像度マイクロCTおよび病理組織学的手法にて形成される第三象牙質についての評価をおこなった。

(2) S100A7 の標的分子の検索

S100A7 が歯髄組織のどのような分子と相互作用して創傷治癒を促進しているのかを明らかにするために、コバルトレジンにて標識した S100A7 とラット歯髄由来初代培養細胞を用いてプルダウンアッセイを実施した。

(3) S100 ファミリータンパク質の配列アライメント解析

S100 ファミリータンパクについて配列アライメント解析を実施し、各タンパクに保存されている配列ならびに機能部位である可能性があるペプチド候補を決定した。

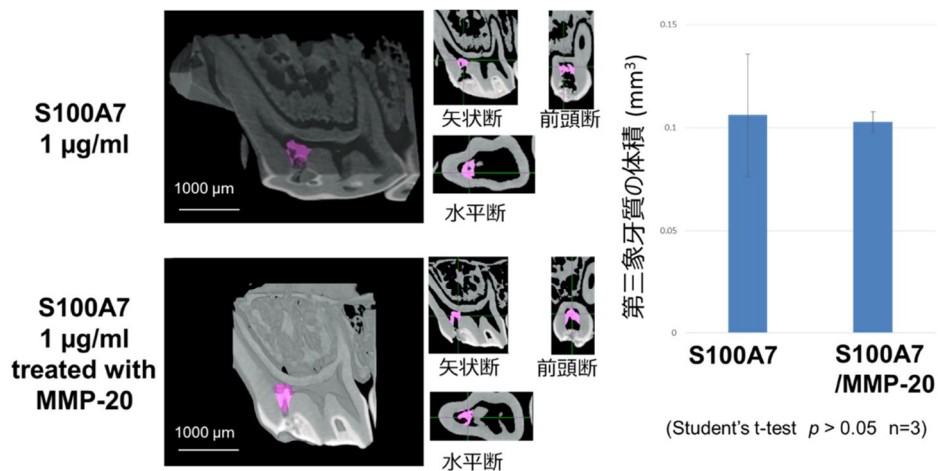
(4) ペプチドアレイ

配列アライメント解析にて得られたペプチドの機能を検討するために、ペプチドアレイ法をおこなった。セルロースメンブレン上に各種ペプチドをペプチド合成器にて作成し、そのメンブレンを含む細胞培養皿にてヒト歯髄幹細胞を培養し、7日後に Alkaline phosphatase (ALP) 活性を測定し、各ペプチドが ALP 活性に与える影響について検討をおこなった。

4. 研究成果

(1) Protein S100-A7 の分解・非分解における覆髓材としての機能評価

S100A7 は MMP20 による分解の影響を受けずに、第三象牙質形成を誘導することが明らかとなった (図 1)。



■ : 第三象牙質

図1. MMP-20処理の有無によるS100A7の覆髓材としての機能評価

(2) S100A7 の標的分子の検索

プルダウンアッセイの結果を図 2 に示す。コントロールでは認められないバンドが S100A7 では認められ (赤矢印)、S100A7 は歯髓の特定のタンパク質と相互作用をもつ可能性が示唆された。

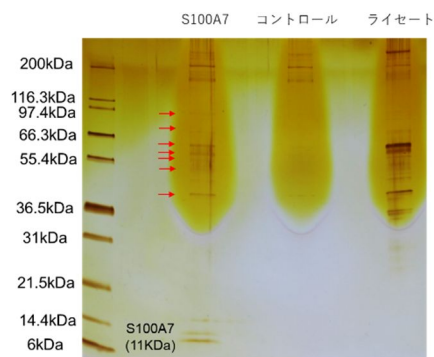


図2. プルダウンアッセイにて得られたSDS-PAGE 赤矢印がS100A7で得られたバンドを示す。

(3) S100 ファミリータンパク質の配列アライメント解析

S100A6, A7A, A7B, A8, A9 間での配列アライメントの結果、過去に報告のあったカルシウム結合部位などに相同性が高い配列を認めた。それ以外の部位でも複数のペプチドの候補を得た。

(4) ペプチドアレイ

いくつかのペプチドがヒト歯髓幹細胞の ALP 活性を上昇させることが明らかとなった (図 3)。

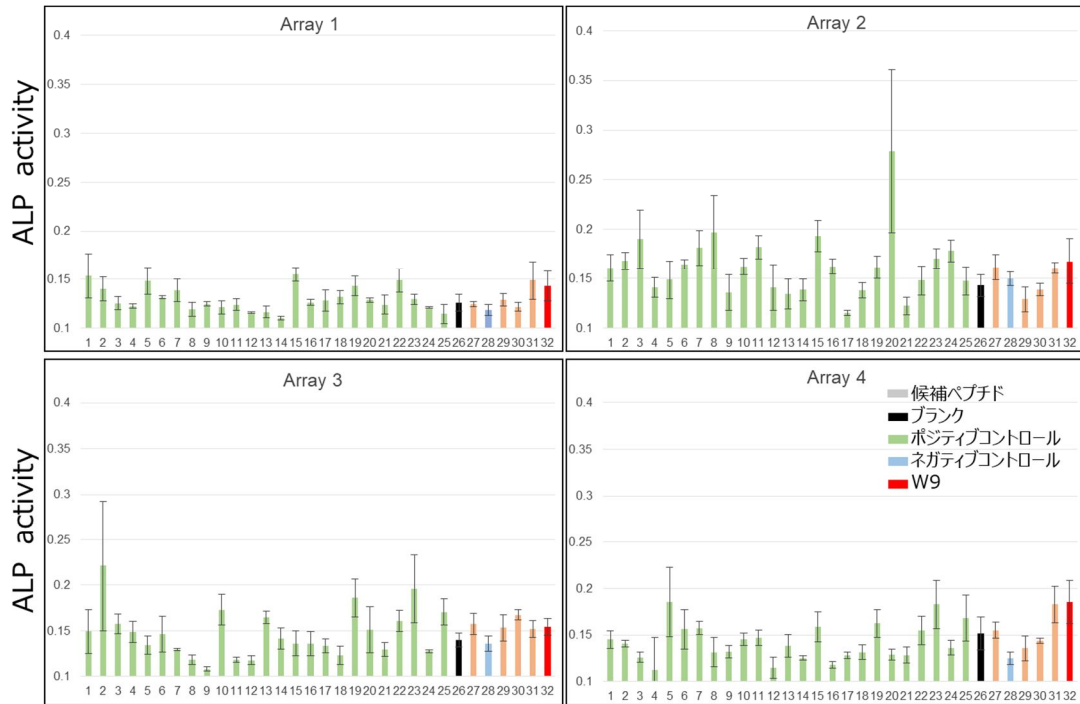


図3. ペプチドアレイにて各ペプチドが歯髄幹細胞のALP活性に与える影響の評価
一部のペプチドがALP活性を促進していることが明らかとなった。

以上の結果より、覆髄材として用いるためのペプチド構造の候補が決定された。現在、実際にこれらのペプチドを用いた、ラット直接覆髄実験を実施中である。今後、覆髄実験の結果によって、実際の臨床に用いることができるペプチド化合物の決定を進めるとともに、ペプチドのキャリアーとなる物質の検索や、さらには間接覆髄での応用についても検討を加えていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Okamoto Motoki, Takahashi Yusuke, Komichi Shungo, Cooper Paul R., Hayashi Mikako	4. 巻 8
2. 論文標題 Dentinogenic effects of extracted dentin matrix components digested with matrix metalloproteinases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-29112-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Takahashi Yusuke, Okamoto Motoki, Komichi Shungo, Imazato Satoshi, Nakatsuka Toshiyuki, Sakamoto Shuji, Kimoto Katsuya, Hayashi Mikako	4. 巻 23
2. 論文標題 Application of a direct pulp capping cement containing S-PRG filler	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 1723-1731
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00784-018-2596-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okamoto Motoki, Takahashi Yusuke, Komichi Shungo, Ali Manahil, Watanabe Masakatsu, Hayashi Mikako	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of tissue inhibitor of metalloprotease 1 on human pulp cells in vitro and rat pulp tissue in vivo.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Endodontic Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iej.13099.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okamoto Motoki, Takahashi Yusuke, Komichi Shungo, Ali Manahil, Yoneda Naomichi, Ishimoto Takuya, Nakano Takayoshi, Hayashi Mikako	4. 巻 -
2. 論文標題 Novel evaluation method of dentin repair by direct pulp capping using high-resolution micro-computed tomography	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00784-018-2374-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ali Manahil, Okamoto Motoki, Komichi Shungo, Watanabe Masakatsu, Huang Hailing, Takahashi Yusuke, Hayashi Mikako	4. 巻 96
2. 論文標題 Lithium-containing surface pre-reacted glass fillers enhance hDPSC functions and induce reparative dentin formation in a rat pulp capping model through activation of Wnt/ -catenin signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 594 ~ 604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2019.06.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Komichi Shungo, Takahashi Yusuke, Okamoto Motoki, Ali Manahil, Watanabe Masakatsu, Huang Hailing, Nakai Takeo, Cooper Paul, Hayashi Mikako	4. 巻 8
2. 論文標題 Protein S100-A7 Derived from Digested Dentin Is a Critical Molecule for Dentin Pulp Regeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1002 ~ 1002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8091002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Okamoto Motoki, Ali Manahil, Komichi Shungo, Watanabe Masakatsu, Huang Hailing, Ito Yuki, Miura Jiro, Hirose Yujiro, Mizuhira Manabu, Takahashi Yusuke, Okuzaki Daisuke, Kawabata Shigetada, Imazato Satoshi, Hayashi Mikako	4. 巻 8
2. 論文標題 Surface Pre-Reacted Glass Filler Contributes to Tertiary Dentin Formation through a Mechanism Different Than That of Hydraulic Calcium-Silicate Cement	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1440 ~ 1440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8091440	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 小道俊吾, 高橋雄介, 岡本基岐, S Ali Manahil, 渡邊昌克, 林 美加子
2. 発表標題 歯髄創傷治癒過程におけるProtein S100-A7の局在解析
3. 学会等名 第148回日本歯科保存学会2018年度春季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Okamoto M, Ali Manahil, Komichi S, Watanabe M, Naruse H, Ito Y, Takahashi Y, Hayashi M
2. 発表標題 Biocompatibility of S-PRG filler cements in rat subcutaneous implantation model
3. 学会等名 96th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ali M, Okamoto M, Komichi S, Watanabe M, Takahashi Y, Hayashi M
2. 発表標題 Lithium contained S-PRG cement facilitated hDPSCs migration and functional vascularity
3. 学会等名 96th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ali M, Okamoto M, Komichi S, Watanabe M, Takahashi Y, Hayashi M
2. 発表標題 Lithium containing S-PRG fillers enhanced tertiary dentin formation via Wnt/ β -catenin pathway activation
3. 学会等名 IFEA 11th World Endodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小道俊吾, 高橋雄介, 岡本基岐, S. Ali Manahil, 林 美加子
2. 発表標題 象牙質 - 歯髄複合体の創傷治癒を促進する象牙質基質分解産物の同定と機能解析
3. 学会等名 第146回日本歯科保存学会2017年度春季学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 S. Ali Manahil, 岡本 基岐, 小道 俊吾, 高橋 雄介, 伊藤 善博, 林 美加子
2. 発表標題 リチウムイオン含有S-PRGセメントの直接覆髄剤としての応用
3. 学会等名 第146回日本歯科保存学会2017年度春季学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡本 基岐, 小道 俊吾, 高橋 雄介, Manahil Saeed, 米田 直道, 石本 卓也, 中野 貴由, 林 美加子
2. 発表標題 高解像度Micro-CTを用いた覆髄剤より誘導された第三象牙質の定量定性評価
3. 学会等名 第37回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡本 基岐, 小道 俊吾, 伊藤 勇紀, 栗木 菜々子, 渡邊 昌克, 高橋 雄介, 林 美加子
2. 発表標題 Er:YAG laserの歯髄保存療法における有効性の検討
3. 学会等名 第29回日本レーザー歯学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 S. Ali Manahil, 岡本 基岐, 小道 俊吾, 渡邊 昌克, 伊藤 善博, 高橋 雄介, 林 美加子
2. 発表標題 リチウムイオン含有S-PRGセメントが歯髄細胞に与える影響
3. 学会等名 第147回日本歯科保存学会2017年度秋季学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡本基岐, 小道俊吾, S. Ali Manahil, 渡邊昌克, 高橋雄介, 林 美加子
2. 発表標題 低酸素誘導因子(HIF-1a)による第三象牙質形成に与える影響
3. 学会等名 第147回日本歯科保存学会2017年度秋季学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ali M, Okamoto M, Komichi S, Watanabe M, Huang H, Takahashi Y, Hayashi M
2. 発表標題 Bioactivity and Biocompatibility of Lithium Contained Surface Pre-reacted Glass Fillers
3. 学会等名 97th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okamoto M, Takahashi Y, Komichi S, Ali M, Watanabe M, Huang H, Cooper P, Hayashi M
2. 発表標題 The role of mTOR signal on reactionary and reparative dentin formation in vivo
3. 学会等名 IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本基岐, 高橋雄介, 黄 海玲, 小道俊吾, S. Ali Manahil, 渡邊昌克, 松本紗也子, 林 美加子
2. 発表標題 生物学的覆髄材料の臨床的評価を目指したラット覆髄モデルの開発
3. 学会等名 第151回日本歯科保存学会2019年度秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋雄介, 渡邊昌克, 岡本基岐, 小道俊吾, S. Ali Manahil, 黄 海玲, 松本紗也子, 林 美加子
2. 発表標題 生物学的根拠に基づくペプチド覆髄剤の開発
3. 学会等名 第151回日本歯科保存学会2019年度秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahashi Y
2. 発表標題 Designing a new pulp capping material: from fundamental data to material development
3. 学会等名 25th European Dental Materials Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okamoto M, Takahashi Y, Ali M, Watanabe M, Huang H, Matsumoto S, Kuriki N, Komichi S, Hayashi M
2. 発表標題 The role of mTOR signal on Tertiary dentin formation
3. 学会等名 98th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Huang H, Okamoto M, Ali M, Watanabe M, Matsumoto S, Takahashi Y, Komichi S, Hayashi M
2. 発表標題 Evaluation of Inflammatory Response During Wound Healing Process In Caries Affected Dental Pulp
3. 学会等名 98th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 象牙質-歯髄組織を再生させる新規直接覆髄材料	発明者 岡本基岐、高橋雄介、林美加子他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-205226	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 歯科用組成物	発明者 岡本基岐、高橋雄介、林美加子他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/04272	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石本 卓也 (Ishimoto Takuya) (50508835)	大阪大学・工学研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	岡本 基岐 (Okamoto Motoki) (60755354)	大阪大学・歯学研究科・助教 (14401)	
研究分担者	小道 俊吾 (Komichi Shungo) (40804456)	大阪大学・歯学研究科・特任研究員 (14401)	