

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 9 月 2 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10118

研究課題名(和文) 接着性レジンによる上皮暫間的封鎖内での創製した人工タンパク質による付着上皮の再生

研究課題名(英文) Regeneration of attachment epithelium using artificial protein in the closed wound by adhesive resin

研究代表者

井上 孝 (Inoue, Takashi)

東京歯科大学・歯学部・特任教授

研究者番号：20125008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、開放創である歯周病の病態を閉鎖創にする目的で、人工タンパクと接着性レジン(SB)を用いてを計画した。本計画を成功させるために、試験管内および小動物を用いて研究を重ね、その結果、最終的にエナメル質と歯肉を生物学的接合を得るまでの期間、保護的に接着性レジンを用い、人工タンパク質の応用が臨床的に有用な歯周治療となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は局所的病態のみならず、歯周病原菌が血流に乗り全身諸臓器・組織に様々な病態を発生させることが明らかになっている。しかし、今までの治療は歯周病の治療に専念し、エナメル質と付着上皮が解離し、開放創になっているという点に着目した研究はほとんどなかった。本研究では、接着性レジンと人工タンパク質を用いて、治療により閉鎖創を目指す銚本的な治療法である。その結果、未病の予防のみならず、医療費削減にも貢献することは間違いない。

研究成果の概要(英文)：In this study, we planned to use artificial protein and adhesive resin (SB) for the purpose of closing the pathological condition of periodontal disease, which is an open wound. In order to make this project successful, we have conducted repeated studies in vitro and using small animals, and as a result, artificially using adhesive resin to protect the enamel and gingiva until a biological bond is obtained. It was suggested that the application of protein would be a clinically useful periodontal treatment.

研究分野：保存系歯科学

キーワード：開放創 閉鎖創 接着性レジン 人工タンパク質 再生 付着上皮

1. 研究開始当初の背景

現在までに数多くの歯周組織再生に関する基礎的並びに臨床的研究が試みられてきたが、完全再生を達成した報告は皆無であった。それは、今までの研究が歯周組織の歯槽骨と歯根膜の再生のみに焦点を当て、歯肉口腔粘膜上皮と歯牙の閉鎖環境を設定できなかったためである。つまり、歯周病が開放創であるために、細菌感染を防ぐことが出来ず慢性炎症と定義づけられたためである。本研究を行うのは、このような背景をもとに、硬組織のエナメル質と軟組織の口腔粘膜上皮を接合させ閉鎖環境を作る必要性があるということである。

その結果、閉鎖環境が作ることが可能となり、二次感染を防ぐことが可能になる。さらに欠損内に応用する歯周治療薬剤、補填材などの効果を十分に発揮させることが出来るようになる。さらに、歯周病菌が生体内に入ることも可能になり、全身の臓器疾患を予防することができ、最終的には歯を失うことが少なくなり、健康長寿に貢献できる。

2. 研究の目的

4META レジンエナメル質と樹脂含侵エナメル質を作ることが知られていて、すでに研究者は、4META レジンが軟組織とハイブリッド層を作ることにも報告している。そこで、本研究では、高組織のエナメル質と軟組織の口腔粘膜上皮の間に 4META レジンを応用して暫間的な閉鎖創を作ることが第一の目的であった。皮膚の場合は、上皮と上皮の断端を縫合することで容易に閉鎖することが可能であるが、軟組織の歯肉口腔粘膜と硬組織のエナメル質を縫合したという報告は皆無である。次に、研究者は人工タンパクの創製の研究を行い、エナメル質に接着するアミノ酸配列 (EBP:Enamel Binding Protein) を検索し、既知の上皮に特異的に結合する RGD モチーフを含む人工タンパクを創製し、4META レジンにより暫間閉鎖されている中で、歯肉口腔粘膜とエナメル質の間に付着上皮を再生させ、歯根膜および歯槽骨の再生をも期待することが目的である。

3. 研究の方法

研究は *in vitro* および *in vivo* に分けて行った。

In vitro では、培養歯肉細胞と 4-META レジンがハイブリッド構造を作り結合するかどうかを検討した。まず、口腔角化上皮細胞を培養し、その後培養上皮細胞シート上で 4META レジンを重合させる。その後、4META レジンが上皮とハイブリッド層を形成したかを確認する。

次に培養歯肉細胞およびエナメル質と特異的に結合する人工タンパクを創製し、その人工タンパクが歯肉上皮細胞とエナメル質の双方に接着するかどうかを検討した。

まず牛歯のエナメル質を板状に切り出し、そのエナメル質上で、ペプチド・ファージ・ライブラリーを用いて、エナメル質に結合するアプタマーを検索する。その後、RGD モチーフとエナメル質に結合するアプタマーを MolCraft を用いてファージディスプレイ法により人工タンパク質を創製した。

In vivo の実験では、4META レジンが歯肉口腔粘膜上皮とハイブリッドができるかをビーグル犬を用いて検討した。ビーグル犬にエナメル質と口腔粘膜上皮の間にハイブリッド層が形成されるか検討した。

さらに、創製した人工タンパク質が、上記 4META レジンにより形成された暫間的閉鎖創内で付着上皮、歯肉、歯根膜、歯槽骨が再生されたか否かを検討した。

4. 研究成果

エナメル質と歯肉上皮の結合を人工タンパク質の応用により検索してきたが、この結合を実現させるための、人工タンパク質が作用する間の保護膜ともいえる接着性レジン (SB) による 歯肉とエナメル質の仮封鎖については結果を得た。

また、エナメル質に結合するアプタマーと歯肉結合組織に結合するアプタマーによる人工タンパクの創製の検討が行われ、既存の同系統のアプタマーを用いた人工タンパクを用いながら実験に供したが、完全にエナメル質と歯肉細胞に結合する人工タンパクの創製には

至っていない。

この結果、保護的に接着性レジンを用い、人工タンパク質により、エナメル質と歯肉の結合を再生させ、その結果臨床的に有用な歯周治療となることが示唆されたが結果が不十分であり、更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakauchi Ayano, Inoue Takashi et al	4. 巻 60
2. 論文標題 Expression of Cytokeratin in Experimentally Created Inflammatory Cyst in Vivo and in Vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bulletin Tokyo Dental College	6. 最初と最後の頁 267-277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2209/tdcpublication.2018-0059	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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上 孝
2. 発表標題 歯周病・インプラント周囲炎の病態論
3. 学会等名 日本臨床歯周病学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	國分 克寿 (Kokubun Katsutoshi) (90535808)	東京歯科大学・歯学部・講師 (32650)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------