

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19040

研究課題名（和文）接着タンパク質とコラーゲン自己生成ペプチドを用いた歯-歯肉間接着技術の確立

研究課題名（英文）Establishment of tooth-gingival adhesion method using adhesion protein and collagen self-assembly peptide

研究代表者

前野 雅彦（Maeno, Masahiko）

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：20736334

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：硬組織-軟組織（歯と歯肉）間の結合喪失は、健全な天然歯列の維持の大きな課題であるため、硬組織-軟組織間Bio-adhesionの生成手法確立を目指した。コラーゲン自己生成ペプチドを活用した手法を検討したが、定着量・範囲について十分な硬組織-軟組織間接着を達成するには乏しく、光機能化による被着面改質を検討した。各種被着体には光機能化による一定の効果を認めたものの、歯質に対する効果は十分ではないことが判明したため、歯面をターゲットとしたシーリング方法を検討し、有用な知見が得られた。しかし、軟組織に対して有用な効果を得るためには未だ課題が残されている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

硬組織-軟組織間の結合喪失は、その治癒の困難さから細菌の再侵入を許しやすく、最終的には支持組織の喪失によって歯の抜去に至るため、健全な天然歯列維持の大きな課題であり、これを解決することは健全な歯列・咬合の維持に大きく貢献する。本研究の過程から、光機能化による一定の効果を推察されたものの、歯質および軟組織に対する応用実現には課題が残った。一方で、並行して行った研究から、硬組織と対象としたシーリング法において歯と修復物の強固な一体化を通じ、象牙質歯髄複合体を保護する有用な手法が見いだされた。硬組織の損傷拡大は最終的に硬組織-軟組織間の結合喪失を意味するため、予防的な観点で意義ある成果と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Loss of hard tissue-soft tissue adhesion is a major challenge in maintaining a healthy natural dentition. In this study, we aimed to establish a method for generating bio-adhesion between hard and soft tissue. A method utilizing collagen self-generating peptides was investigated, but the amount and extent of fixation were insufficient to achieve adhesion between hard and soft tissues, so modification of the adherend surface through photofunctionalization was examined. Although a certain effect of photofunctionalization was observed for various restorative materials, the effect on tooth structure was found to be insufficient. Therefore, a sealing method targeting the tooth surface was investigated and useful findings were obtained. However, there are still issues to be addressed in order to obtain useful effects on soft tissues.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：接着タンパク質 コラーゲン自己生成ペプチド 歯-歯肉間接着 光機能化 シーリング法

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会にある本邦では、健康寿命の延伸が強く望まれている。歯科の分野においては、QOL向上のため、摂食機能、構音、発語、さらに審美性の担保による社会的・心理的效果を見込み、健全な天然歯列の維持が代表的な取り組みとして進められている。健全な天然歯列に不備が生じる第一歩は歯の喪失である。その原因としては、主として齲蝕と歯周疾患とが挙げられる。この両者は口腔内常在細菌による感染・炎症の惹起によって生じ、古くから歯科では細菌および感染部位の除去、喪失部位の材料による補填、外科的処置による軟組織の回復を通じて、予防および治療が行われてきた。これらの方法は口腔機能の回復に有用であるものの、再発・再治療を繰り返すたびに治療範囲が拡大するという問題を有し、現在の医療に求められる Minimal intervention Dentistry のコンセプトとは反する。また、現時点において歯に代表される硬組織の修復方法、もしくは歯肉に代表される軟組織の修復方法はある程度確立されているものの、硬組織と軟組織とを結合させる処置は生体治癒に頼るもののみである。硬組織 - 軟組織間の結合喪失は、その治癒の困難さから細菌の再侵入を許しやすく、最終的には支持組織の喪失によって歯の抜去に至るため、健全な天然歯列の維持のためには大きな課題であると言える。もし、生体材料の効果によって硬組織と軟組織を接着させることができれば、現在の課題を解決し、更に将来的には本来の生体組織に付加価値を付与することができると考えられた。

2. 研究の目的

現在、歯 - 歯肉間の結合に対しては、主に歯周病学の分野が取り組んでいる。その処置としては、生体膜材料による組織再生のスペース確保、もしくは歯肉や骨の治癒を促進する製剤の応用が行われている。これら手法は組織の再生・結合の回復といった観点において、一定の効果を挙げている。しかし、その適応としては骨が喪失し陥凹した部分の再生が主であり、いわゆる接着材のように歯に歯肉を接着させる材料手法は存在していない。

本研究で試験した接着方法としては、有用な官能基を複数種有する Mussel inspired Adhesive Proteins による Bio-adhesion 能である。これらタンパク質は水分存在下での耐久性を有するだけでなく、有機・無機・金属全てへの接着性を有する。苛酷な口腔内環境において、歯肉との親和性を担保しつつ歯質へ修飾を行うのに適した性質であるといえる。さらに、このタンパク質にコラーゲン生成の起点となるコラーゲン自己生成ペプチドを結合させることで、歯質側を起点とする歯肉側に向けての結合腕を生成し、接着を達成することを試みた。

過去の歯 - 歯肉間の結合においては、歯肉および骨の組織再生に焦点が当てられており、もう一方の被接着対象である歯に対しては、酸処理による清掃および粗造化が行われる程度であった。本研究では、十分な検討が行われていない「歯 - 歯肉間の結合再生療法における、歯に対しての処理」を、「接着性タンパク質」と「コラーゲン自己生成ペプチド」を用いて行い、さらに従来の組織再生療法と融合させることで、新規治療法として確立させていくことが本研究の当初の目的であった。

3. 研究の方法

(1) Mussel inspired Adhesive Proteins (MAPs) の歯面定着手法の確認

Lee らの手法¹⁾に基づき、作成した歯質切片試料を MAPs 溶液に浸漬することで歯質表面に MAPs コーティングを行った。

(2) MAPs へのコラーゲン自己生成ペプチドの結合

MAPs コーティング試料表面に対して、Kar らの報告するコラーゲン自己生成ペプチド^{2, 3)}を、Sugawara らの手法⁴⁾に基づき結合、定着させた。

(3) MAPs を介したペプチドの結合によるコラーゲン生成の確認

(1)および(2)の過程を経て生成した試料をインキュベートし、歯質切片試料表面へのコラーゲン自己生成状況を確認した。

(4) 光機能化

現段階で MAPs およびコラーゲン自己生成ペプチドによって効果的な歯表面の修飾は困難であったため、紫外光を活用した光機能化について検討を行った。歯質を含む数種材料に対して処理を行い、接着について検討を行った。

(5) 象牙質シーリング法の確立

光機能化による一定の効果は確認したものの、口腔内を想定した臨床的環境での活用には課題が残ったため、口腔内の歯面に対する効果的なシーリング方法に着目した。歯の実質欠損の修復過程における象牙質歯髄複合体の露出をカバーする効果的な数種のシーリング方法について、修復後の接着を評価することで有用な手法を検討した。

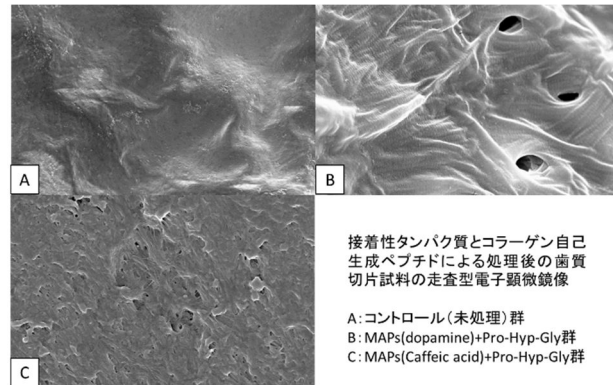
4. 研究成果

(1) Mussel inspired Adhesive Proteins (MAPs) の歯面定着手法の確認

(2) MAPs へのコラーゲン自己生成ペプチドの結合

(3) MAPs を介したペプチドの結合によるコラーゲン生成の確認

MAPs 溶液への浸漬による MAPs コーティング試料製作、およびコラーゲン自己生成ペプチドの試料への定着を経て、試料のインキュベートを行った後の走査型電子顕微鏡像を右に示す。明確な構造物が存在せず、歯質切片試料の表面のみが認められるコントロール群(A)に対して、Leeら、および Sugawara らの手法に則って実施した実験群(B)では、対照群と比較して試料表面にコラーゲンの明確かつ十分な生成を認めた。しかし、(B)の条件で使用する MAPs および MAPs とコラーゲン自己生成ペプチドを結合する処理過程は生体への使用を



見据えた場合には変更する必要があるため、使用する MAPs を変更して行った実験群(C)では、試料の表面性状の変化は認められるものの、コラーゲンの十分な生成は得られなかった。歯質表面への MAPs コーティングは確認されていたため、MAPs とコラーゲン自己生成ペプチドとの化学的結合が達成されなかったものとする。上記の実験に追加して、近似組成を有する数種の MAPs を用いて試験を行ったが、B 群のようなコラーゲンが豊富に生成される結果は得られなかった。以上から、生体内での処理を考慮しない条件であればコラーゲンの生成が可能であるものの、「歯 - 歯肉間の結合再生療法」を見据えた手法としては残念ながら現時点で具現化が困難と判断し、他の手法の模索に着手した。

(4) 光機能化

紫外光を利用した光機能化について、(1)-(3)と同様の歯質切片試料および、将来的な拡張性を見越して各種歯冠修復材料を用いて接着試験を行った。歯質を含めてベースラインと比較した有意な接着向上が得られた。口腔内で安定的かつ局所的に紫外光を投射する方法を確立することは困難であり、現実的な運用には機器もしくは遮蔽手法の改善が必要と考えられる。

(5) 象牙質シーリング法の確立

接着を達成するための表面改質としては、シーリングやコーティングが挙げられる。歯の修復過程で露出する象牙質は外来刺激に対して敏感であり、被覆保護する必要性が高い。本課題の一端を担う硬組織への対応の一つとして、歯の実質欠損の修復過程における 2 種シーリング方法が接着に及ぼす効果について検討を行ったところ、接着システムに加えて低粘性のレジン材料を採用したコーティング方法によって最も優れた信頼性・耐久性を具備する接着が獲得できることが判明した。硬組織の損傷拡大は最終的に硬組織 - 軟組織間の結合喪失を意味するため、予防的な観点において一定の意義ある成果と考える。

1) Lee: Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings, Science, 19;318(5849), 426-30, 2007

2) Kar K, Amin P, Bryan MA, Persikov AV, Mohs A, Wang YH, Brodsky B: Self-association of collagen triple helix peptides into higher order structures, J Biol Chem, 281(44), 33283-33290, 2006

3) Kar K, Ibrar S, Nanda V, Getz TM, Kunapuli SP, Brodsky B: Aromatic interactions promote self-association of collagen triple-helical peptides to higher-order structures, Biochemistry, 48(33), 7959-7968, 2009

4) Sugawara S, Maeno M, Lee C, Nagai S, Kim DM, Da Silva J, Nagai M, Kondo H: Establishment of Epithelial Attachment on Titanium Surface Coated with Platelet Activating Peptide, PLoS One, 14;11(10), e0164693, 2016

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakazawa Miwa, Maeno Masahiko, Komoto Mei, Nara Yoichiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Appropriate Immediate Dentin Sealing to Improve the Bonding of CAD/CAM Ceramic Crown Restorations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 4541 ~ 4541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym14214541	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

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------