

機関番号：30110

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 年度 ～ 2010 年度

課題番号：20390484

研究課題名（和文）

ヒトフォスフォリン由来 RGD 含有ペプチドを用いた新しい蝕治療材料の開発研究

課題名（英文）

Development of new materials for caries treatment using human phosphophoryn-derived RGD-containing peptide

研究代表者

斎藤 隆史 (TAKASHI SAITO)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：40265070

研究成果の概要（和文）：

象牙質誘導活性を保持したフォスフォリン（象牙質リンタンパク質）の N 末端に存在し RGD 配列を含む合成ペプチドを合成した。フォスフォリンの担体として生体親和性を有する I 型コラーゲンを使用することにより高品質で安全性の高い新しい深在性う蝕治療材料および治療法の確立を目的として研究を行った。その結果、Peptide I が緻密性の高い修復象牙質を多量に誘導することが明らかとなり、Peptide I・コラーゲン複合体の新しいう蝕治療材料としての可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to development of new materials and method for deep-caries treatment which is reliable and safe. First, we synthesized peptide including RGD existing in N-terminal of phosphophoryn (dentin phosphoprotein) that possesses dentin induction activity. As a carrier of phosphophoryn, we used type I collagen indicating biocompatibility in this study. As a result, peptide I was found to induce large amount of reparative dentin having high density. Therefore, it was suggested that peptide I/collagen composite may be possible to be used as a new material for deep-caries treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2009 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：歯科保存学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：保存修復学、フォスフォリン、RGD、う蝕治療、象牙質再石灰化、象牙質再生

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

深在性う蝕に対して古くから歯髄保存治療（覆髄・断髄）が試みられ、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は高アルカリ性であるため、歯髄為害性が高く、慢性炎症や内部吸収を引き起こすこともあり、さらに、修復象牙質が多孔性なため再感染の危険性が懸念されている。実際に水酸化カルシウムを用いた覆髄の治療成績は必ずしも満足できるものではないため、深在性う蝕における露髄症例に対して抜髄処置が選択されることが少なくない。

我々はこれまで、ウシ由来フォスフォオリン・コラーゲン複合体の高い石灰化誘導活性および骨および歯周組織誘導活性について報告してきた。まず第一に、フォスフォオリン・コラーゲン複合体の石灰化誘導活性を石灰化誘導時の基質・結晶間の界面張力を用いて定量化して、その高さを実証したこと、脱リン酸化により石灰化誘導能を失うことからリン酸基がフォスフォオリンによる石灰化に必須であること、次に、フォスフォオリン・コラーゲン複合体を動物の大腿骨欠損部、歯周病モデルとしての歯槽骨欠損部に移植してそれらの組織再生に対する高い誘導活性を示したことは世界で最初であった。特に、歯槽骨再生実験においては、歯槽骨のみならずセメント質再生、さらに再生された歯槽骨とセメント質の間には、歯周病治療のキーポイントとなる歯根膜再生が認められた。さらに、ブタフォスフォオリン・コラーゲン複合体をラット、イヌの人工露髄面に移植し覆髄実験を行ったところ、早期に細管構造を有する緻密な修復象牙質の形成誘導が認められた。しかも歯髄に炎症がほとんど認められず、強力な修復象牙質形成誘導活性と生体親和性を兼ね備えた覆髄材料であることが明らかになった。

しかし数年前からのBSE問題の浮上により、より安全な組織再生材料の開発が重要課題となっている。そこで、硬組織誘導活性を保持したフォスフォオリンのN末端に存在しRGD配列を含む合成ペプチドを合成し、さらに、担体として生体親和性を有するI型コラーゲンを使用することにより高品質で安全性の高い新しい深在性う蝕治療材料および治療法の確立をめざすという発想に至った。

2. 研究の目的

フォスフォオリンのN末端に存在しRGD配列を含む数種類のペプチドを合成して、I型コラーゲンとの複合体を作製する。本複合体の石灰化誘導活性を確認し、修復象牙質誘導活性のメカニズムを明らかにして、短期間

で効果的に象牙質を再生するための条件を整理する。これをもとに強力な象牙質再生能を有する生体に安全な新規覆髄材の規格化を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ブタ由来フォスフォオリン・I型コラーゲン複合体の活性の確認

ブタ由来フォスフォオリン・I型コラーゲン複合体を作製し、I型コラーゲンスポンジの形状、多孔性に関して規格化を行った。その後、複合体をラットおよびイヌ歯に移植して象牙質誘導活性を確認した。

(2) ヒトフォスフォオリン由来 RGD 含有ペプチドの作製

ヒトフォスフォオリンのN末端に存在しRGD配列を含む硬組織誘導活性を有すると推測されるペプチドを合成した。

(3) ヒトフォスフォオリン由来 RGD 含有ペプチドを用いた象牙質分化・誘導実験

ヒトフォスフォオリンのN末端に存在しRGD配列を含む生物活性を有する3種類のRGD含有合成ペプチドを作製して研究に用いた。これらのペプチドをラットおよびイヌ歯に移植して2～4週および2ヶ月後に抜歯して、病理組織学的解析あるいは電子顕微鏡による微細構造解析により本ペプチドの象牙質分化・誘導活性を確認した。

4. 研究成果

まず、ブタ由来フォスフォオリン・I型コラーゲン複合体の高い象牙質誘導活性を再確認するとともに、誘導された修復象牙質の高い緻密性について明らかにした。さらに、ヒトフォスフォオリンのN末端に存在しRGD配列を含む合成ペプチドの場合、実験に用いたペプチド全て(Peptide I～III)に象牙質誘導活性が認められ、その中でもPeptide Iが緻密性の高い修復象牙質を多量に誘導しており、in vitro実験系における結果を裏付ける結果が得られた。今後さらに、複合体等の形状、操作性に関して規格化を行い、実用化を目指す予定である。Peptide I・コラーゲン複合体の実用化が実現すれば、短期間で効果的に修復象牙質を誘導することが可能になり、深在性う蝕治療を生物学的治療法に大きく変換させることができるものと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 24 件)

1. Ito S, Iijima M, Hashimoto M, Tsukamoto N, Mizoguchi I, Saito T: Effects of surface pre-reacted glass-ionomer fillers on mineral induction by phosphoprotein. J Dent. 39:72-79, 2011. 査読有り.
2. Yasuda Y, Tatematsu Y, Fujii S, Maeda H, Akamine A, Torabinejad M, Saito T: Effect of MTAD on the Differentiation of Osteoblast-like cells; J Endod 36, 260-263, 2010. 査読有り.
3. 小池俊之、半田慶介、林敬二郎、Mohammad Ali Akbor Polan、斎藤隆史: ラット上顎臼歯におけるBMP-石灰藻由来ハイドロキシアパタイト複合体の修復象牙質形成. 北海道医療大学雑誌29:183-189, 2010. 査読有り.
4. 安田善之、斎藤隆史: 炭酸ガスレーザー照射と象牙芽細胞の石灰化誘導. 日本レーザー歯学雑誌21:197-202, 2010. 査読有り.
5. Yasuda Y, Kawamorita T, Yamaguchi H, Saito T: Bactericidal effect of Nd:YAG and Er:YAG lasers in experimentally infected curved root canals; Photomed Laser Surg. 28 Suppl2:S75-78, 2010. 査読有り.
6. Nishida M, Imazato S, Takahashi Y, Ebisu S, Ishimoto T, Nakano T, Yasuda Y, Saito T: The influence of the antibacterial monomer 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide on the proliferation, differentiation and mineralization of odontoblast-like cells; Biomaterials. 31(7):1518-32, 2010. 査読有り.
7. Ito S, Hoshino T, Iijima M, Tsukamoto N, Pashley DH, Saito T: Water sorption/solubility of self-etching dentin bonding agents; Dent Mater, 26:617-626, 2010. 査読有り.
8. 伊藤修一, 塚本尚弘, 甕 富美子, 斎藤隆史: 塗付法がワンステップ象牙質接着システムの接着強さと封鎖性に与える影響; 接着歯学27(3), 125-134, 2009. 査読有り.
9. 半田慶介、小池俊之、清野透、斎藤隆史: 不死化イヌ歯髓細胞株の樹立とその特性の解析; 日本歯科保存学雑誌52(3), 288-294, 2009. 査読有り.
10. Yasuda Y, Ohtomo E, Tsukuba T, Okamoto K, Saito T: Carbon dioxide laser irradiation stimulates mineralization in rat dental pulp cells; Int Endod J 42, 940-946, 2009. 査読有り.
11. Yasuda Y, Inuyama H, Maeda H, Akamine A, Nör JE, Saito T: Cytotoxicity of one-step dentin-bonding agents toward dental pulp and odontoblast-like cells; J Oral Rehabil 35, 940-946, 2008. 査読有り.
12. Yasuda Y, Kamaguchi A, Saito T: In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a new-resin-based endodontic sealer against endodontic pathogens; J Oral Sci 50, 309-313, 2008. 査読有り.
13. Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T: Effect of mineral trioxide aggregate (MTA) on mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. J Endod 34, 1057-1060, 2008. 査読有り.
14. Yasuda Y, Koike T, Kawamorita T, Saito T: Adiponectin induces dentin sialophosphoprotein in rat dental pulp cells: an in vitro study; J Endod 34, 679-683, 2008. 査読有り.
15. Yasuda Y, Izumikawa M, Okamoto K, Tsukuba T, Saito T: Dentin phosphophoryn promotes cellular migration of human dental pulp cells; J Endod 34, 575-578, 2008. 査読有り.
16. 島一也, 前田英史, 後藤康治, 畦森雅子, 安田善之, 和田尚久, 藤井慎介, 友清淳, 吉嶺嘉人, 斎藤隆史, 赤峰昭文: EDTAならびにNaOClによる根管洗浄後のSEM観察-超音波洗浄との比較-; 日本歯内療法学雑誌29(1), 15-19, 2008. 査読有り.
17. Iijima M, Ito S, Yuasa T, Muguruma T, Saito T, Mizoguchi I: Bond strength comparison and scanning electron microscopic evaluation of 3 orthodontic bonding systems; Dent Mater J 27, 392-399, 2008. 査読有り.
18. 疋田一洋, 舞田健夫, 川上智史, 遠藤一彦, 大野弘機, 伊藤修一, 斎藤隆史: CAD/CAMハイブリットレジンプロックに対する接着性レジンの接着効果; 接着歯学26, 124-128, 2008. 査読有り.
19. 湯本泰弘, 伊藤修一, 森 真理, 尾立達治, 中島啓介, 斎藤隆史, 古市保志: 歯根縦破折歯に対する接着性根管用シーラーの応用-in vitro における基礎的検討 -; 日本歯科保存学雑誌51, 514-522, 2008. 査読有り.

[学会発表] (計 35 件)

1. 小池俊之, 半田慶介, 林敬次郎, 齋藤隆史: フォスフォフォリン誘導性ラット修復象牙質に関する微細形態学的研究; 第132回日本歯科保存学会, 2010年6月4日, (熊本)
2. 甕富美子, 伊藤修一, 塚本尚弘, 齋藤隆史: 知覚過敏抑制材の象牙質封鎖性; 第132回日本歯科保存学会(熊本)2010年6月4,5日.
3. Ito S, Saito T: Water sorption/solubility of self-etching dentin bonding agents; 88th IADR, July 14-17, 2010, (Barcelona)
4. 林敬次郎, 半田慶介, 小池俊之, 成田憲亮, ムハンマド アリ アクバー ポラン, 齋藤隆史: 大豆イソフラボンによるラット歯髄細胞の石灰化誘導について; 日本歯科理工学会 北海道・東北支部夏期セミナー, 2010年7月31日, (札幌)
5. 小池俊之, 半田慶介, 林敬次郎, 齋藤隆史: フォスフォフォリン誘導性ラット修復象牙質に関する微細形態学的研究; 第56回日本歯科理工学会, 2010年10月9日, (岐阜)
6. 半田慶介, 小池俊之, 林敬次郎, 齋藤隆史: 直接覆髄法における高周波ラジオ波メスの応用; 第56回日本歯科理工学会, 2010年10月9日, (岐阜)
7. 半田慶介, 小池俊之, 林敬次郎, 成田憲亮, Mohammad Ali Akbor Polan, 齋藤隆史: 高周波ラジオ波を用いた直接覆髄における修復象牙質の免疫組織学的観察; 第133回日本歯科保存学会, 2010年10月28日, (岐阜)
8. 林敬次郎, 半田慶介, 小池俊之, 成田憲亮, Mohammad Ali Akbor Polan, 齋藤隆史: 大豆イソフラボンによるラット歯髄細胞の分化・石灰化誘導について; 第133回日本歯科保存学会, 2010年10月28日, (岐阜)
9. 半田慶介, 小池俊之, 林敬次郎, 成田憲亮, Mohammad Ali Akbor Polan, 齋藤隆史: 高周波ラジオ波を用いた直接覆髄における修復象牙質の免疫組織学的観察; 第8回日本再生歯科医学会大会, 2010年10月30日, (名古屋)
10. 林敬次郎, 半田慶介, 小池俊之, 成田憲亮, Mohammad Ali Akbor Polan, 齋藤隆史: 大豆イソフラボンによるラット歯髄細胞の分化・石灰化誘導について; 第8回日本再生歯科医学会大会, 2010年10月30日, (名古屋)
11. 伊藤修一, 甕富美子, 塚本尚弘, 齋藤隆史: フッ素徐放性材料が象牙質石灰化に及ぼす影響; 第29回日本接着歯学会, 2011年2月5日, (岡山)
12. 甕富美子, 伊藤修一, 塚本尚弘, 齋藤隆史: 新規接着性モノマー配合知覚過敏抑制剤の象牙質接着性; 第29回日本接着歯学会, 2011年2月5日, (岡山)
13. 林敬次郎, 半田慶介, 小池俊之, 齋藤隆史: 大豆イソフラボンによるラット歯髄細胞の分化誘導について; 第29回北海道医療大学歯学会, 2011年3月5日, (札幌)
14. 安田善之, 齋藤隆史: MTAセメントは歯髄細胞のBMP-2発現を誘導する; 第15回アジア歯内療法学会, 2009年4月25日, (東京)
15. 小池俊之, 半田慶介, 齋藤隆史: Phosphoryn/アルギン酸ゲル複合体によるラット象牙質形成; 第7回日本再生歯科医学会, 2009年9月11日, (北九州)
16. 半田慶介, 小池俊之, 林敬次郎, 齋藤隆史: 直接覆髄法における高周波ラジオ波メスの応用; 第7回日本再生歯科医学会, 2009年9月11日, (北九州)
17. 安田善之: 象牙質フォスフォフォリンによる象牙質再生; 第130回日本歯科保存学会, 2009年6月12日, (札幌)

[その他]

ホームページ

<http://www.hoku-iryo-u.ac.jp/~nihozon/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 隆史 (TAKASHI SAITO)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号: 40265070

(2) 研究分担者

安田 善之 (YOSHIYUKI YASUDA)
北海道医療大学・歯学部・准教授
研究者番号: 80405670

伊藤 修一 (SHUICHI ITO)
北海道医療大学・歯学部・講師
研究者番号: 50382495

半田 慶介 (KEISUKE HANDA)
北海道医療大学・歯学部・講師
研究者番号: 40433429