

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18510

研究課題名（和文）ハイブリット組み換えPhosphophorynを応用した新規歯髄保存療法の開発

研究課題名（英文）Development of conservative treatment of dental pulp applying hybrid recombinant Phosphophoryn

研究代表者

中西 惇（Nakanishi, Jun）

広島大学・病院（歯）・助教

研究者番号：20848064

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究によって、象牙質に含まれるPhosphophoryn(PP)とDentin Matrix Protein-1(DMP-1)の2つのタンパク質の機能領域を有する新たなハイブリット組み換えタンパク質（ハイブリット組み換えPP）の精製法が確立された。また、ハイブリット組み換えPPは細胞接着活性および抗炎症機能活性を有すること、また硬組織誘導機能活性BMP-2誘導性の異所性骨形成モデルにおいて異所性骨形成を促進する傾向を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

深在性齲蝕による細菌感染や偶発露髄が生じ外部からの刺激に曝露されることによって炎症を起こした歯髄組織において、本研究によって示されたハイブリット組み換えPPのもつ細胞接着活性、抗炎症機能活性および硬組織誘導機能活性等の細胞制御機能を応用することによって歯髄組織の消炎および露髄面に象牙芽細胞を呼び込み被蓋硬組織の形成を促進し外部からの刺激遮断することで歯髄保存を可能とする新たな歯髄保存療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study established a new method for purifying a hybrid recombinant protein (hybrid recombinant PP) that has the functional domains of two proteins, Phosphophoryn (PP) and Dentin Matrix Protein-1 (DMP-1), contained in dentin. In addition, the hybrid recombinant PP had cell adhesion activity and anti-inflammatory activity, and showed a tendency to promote ectopic bone formation in a model of ectopic bone formation induced by BMP-2.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：組み換えタンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯の健全な機能維持において歯髄の保存は極めて重要な因子である。しかしながら、歯髄は周囲を内側から象牙質、続いて、エナメル質あるいはセメント質の硬組織に被覆され、栄養を根尖孔からのわずかな血流に依存する閉塞した環境に存在することから、う蝕等の歯牙硬組織疾患により惹起された歯髄組織の炎症反応は容易に歯髄の全域に波及し、その結果、歯髄保存が不可能な病態に至ってしまう。

露髄や深在性う蝕に対する歯髄保存療法として最も一般的なものとして水酸化カルシウム製剤やMTAセメントを用いた覆髄法が挙げられる。これらは被蓋硬組織形成による歯髄組織の保護を目的とするが、形成された硬組織は菲薄であり原生象牙質と比較すると石灰化度が低く、脆弱であることが報告されている(Leye Benoist F et al., 2012)。よって、既存の歯髄保存療法により形成された被蓋硬組織では歯髄への刺激遮断が不十分となり、歯髄の炎症反応の制御および歯髄保存が困難となる症例が生じることが想定される。

2. 研究の目的

本研究では従来の歯髄保存療法の問題点を改善する新たな歯髄保存療法の開発を目指すべく、象牙質に最も多く含まれる非コラーゲン性タンパク質であり象牙質の石灰化に寄与し、LPS誘導性マクロファージ炎症モデルにおいて抗炎症機能活性を有することが報告されているPhosphophoryn(PP) (Kobuke et al., 2015) (Nakanishi et al., 2020)、および同じく象牙質に含まれる非コラーゲン性タンパク質であり細胞接着活性を有することが報告されているDentin Matrix Protein-1(DMP-1) (Suzuki et al., 2014)の2つのタンパク質に着目した。これら2つのタンパク質の有する機能を併せ持つ新たなハイブリット組み換えタンパク質(ハイブリット組み換えPP)の精製法の確立、およびハイブリット組み換えPPのもつ細胞接着能、石灰化誘導能および抗炎症機能を*in vitro* および*in vivo* で解析することによって、ハイブリット組み換えPPの覆髄剤としての有用性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究に用いるハイブリット組み換えPPは液体クロマトグラフィーシステムを併用した陰イオンクロマトグラフィーおよびHis-tagアフィニティーカラムを用いた方法によって精製を行った。ハイブリット組み換えPPのもつ細胞接着活性についてはヒト骨芽細胞株MG63細胞を用いた*in vitro* 細胞接着アッセイによって検討を行った。ハイブリット組み換えPPの石灰化誘導能および抗炎症機能について当初計画ではマウス歯髄炎モデルを用いた*in vivo* モデルを用いた検討を行う予定であった。しかしながらマウス歯髄炎モデルの病理組織学的評価を行ったところ、サンプル間での露髄面の大きさおよび歯髄組織内に生じている炎症の程度について個体間の差が大きく、本研究の目的とする歯髄炎が惹起された歯髄組織におけるハイブリット組み換えPPの石灰化誘導能および抗炎症機能を検討することが困難であると判断した。よって当初計画を変更し石灰化誘導能に関しては骨形成誘導活性を示す組み換えBMP-2タンパク質をコラーゲン担体に吸着させマウス背部皮下組織に移植することで異所性に骨を形成するBMP-2マウス背部移植異所性骨形成*in vivo* モデルを用いて、ハイブリット組み換えPPをBMP-2と同時にコラーゲン担

体を吸着させ移植した際における骨形成へ与える影響について検討を行った。また抗炎症機能に関してはD-ガラクトサミン/LPS 誘導性マウス敗血症 *in vivo* モデルを用いて、D-ガラクトサミン/LPS 投与 1 時間前にハイブリット組み換え PP 投与を行い、敗血症モデルマウスに与える影響について検討を行った。

4 . 研究成果

本研究に供する組み換えタンパク質として、陰イオンクロマトグラフィーおよび His-tag アフィニティーカラムを用いた従来の組み換えタンパク質の精製法に液体クロマトグラフィーシステムを併用した精製を行うことで、従来の精製法と比較してより高純度なハイブリット組み換え PP を精製した。

細胞接着活性について、ハイブリット組み換え PP は組み換え DMP-1 と同様に MG63 細胞に対して細胞接着活性を有することが示された。組み換え PP は細胞接着活性を示さなかった。

石灰化誘導能について、強い骨形成活性を有する BMP-2 をマウス背部移植し形成される異所性骨のサイズや内部領域の骨密度について、ハイブリット組み換え PP を BMP-2 と同時移植を行った群では BMP-2 単独移植群と比較して形成された骨のサイズや内部領域の骨密度が高値となる傾向を示した。

抗炎症機能活性について、D-ガラクトサミン/LPS 誘導性敗血症モデルにおいて D-ガラクトサミン/LPS 投与 1 時間前にハイブリット組み換え PP を前投与した群では、マウス致死率を改善することが示された。また組み換え PP 前投与群においてもハイブリット組み換え PP と同様に致死率の改善傾向を示したが、組み換え DMP-1 前投与群では致死率の改善はみられなかった。本研究から、ハイブリット組み換え PP の細胞接着活性について、ハイブリット組み換え PP および組み換え DMP-1 群では細胞接着活性を示す一方で、組み換え PP では細胞接着活性が見られなかったことから、ハイブリット組み換え PP の有する DMP-1 型の RGD 配列周囲のアミノ酸配列が機能領域となりインテグリン依存的な細胞接着活性を示していることが考察される。石灰化誘導活性については PP の有するアミノ酸配列中の高度にリン酸化修飾されたセリン セリン アスパラギン酸の長い繰り返し配列がカルシウムイオンとの高い親和性を示すこと、あるいは先述の細胞接着活性に起因して骨形成を行う細胞を担体へ遊走させる因子として機能している可能性が考察される。抗炎症機能についてはマウス敗血症モデルにおいてハイブリット組み換え PP および組み換え PP を前投与することで敗血症による致死率を改善する傾向を示したのに対し、組み換え DMP-1 前投与では改善効果を示さなかったことから、致死率の改善に寄与したハイブリット組み換え PP の抗炎症機能を示す機能領域については、ハイブリット組み換え PP および組み換え PP に共通するアミノ酸配列の領域に存在する可能性が考察される。

以上の結果から深在性齶蝕や露髄を伴い歯髄炎が惹起された歯髄組織に対し細胞接着活性、抗炎症機能活性および硬組織誘導活性の多機能を有するハイブリット組み換え PP を応用することで、既存の治療法の課題を克服し、従来では歯髄の保存を図ることが困難であった症例にも適応することができる新たな歯髄保存療法開発の可能性が示唆された。

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 Shirawachi Satomi, Takeda Katsuhiko, Naruse Tomoya, Takahashi Yohei, Nakanishi Jun, Shindo Satoru, Shiba Hideki | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Oxidative stress impairs the calcification ability of human dental pulp cells | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 BMC Oral Health | 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） 10.1186/s12903-022-02467-w | 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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 中西 惇, 鈴木 茂樹, 吉田 和真, 平田-土屋 志津, 佐藤 瞭子, 山田 聡, 柴 秀樹 |
| 2. 発表標題 BMP-2誘導性骨形成にハイブリッド組み換えPPの抗炎症機能が及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第157回日本歯科保存学会2022年度秋季学術大会 第24回日韓歯科保存学会学術大会（国際学会） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中西 惇, 鈴木 茂樹, 吉田 和真, 平田-土屋 志津, 山田 聡, 柴 秀樹 |
| 2. 発表標題 ハイブリッド組み換え PP を応用した硬組織再生療法の開発 |
| 3. 学会等名 第155回日本歯科保存学会2021年度秋季学術大会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|