

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17018

研究課題名（和文）帯電による結合作用を利用した新規石灰化促進タンパク質製剤の開発

研究課題名（英文）Development of new pharmaceutical protein preparations for mineralized tissue regeneration using electric charge mechanism

研究代表者

長崎 敦洋 (Nagasaki, Atsuhiro)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：20890528

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）：新規硬組織再生療法開発のため、石灰化を強力に促進するアルカリフォスファターゼ（ALP）のアイソザイムである組織非特異的アルカリフォスファターゼ（TNAP）に着目し、アスパラギン酸残基（Asp）付加による帯電効果を利用して、硬組織に強力に結合できるように修飾し、その効果を検討した。本研究にて、Aspを6つあるいは8つ付与したAsp-TNAPが石灰化能を有することおよび代表的硬組織疾患である歯周炎モデルマウスの歯周組織再生を促進することを明らかにした。さらに、recombinant TNAPが、歯周炎による炎症を抑制することを明らかにした。今後、臨床への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界に先駆けて超高齢化社会を迎えた日本において、歯周炎や骨粗鬆症等の硬組織疾患に罹患する患者が急増している。これまでの硬組織疾患治療薬は、限られた細胞種やメカニズムを標的にした薬剤が多く、硬組織代謝を阻害してしまうことにより、骨壊死や意図しない臓器の石灰化による機能不全等、多くの副作用が報告されている。本研究により、骨代謝を促進して石灰化を促すTNAPの有効性と、帯電効果による硬組織結合力付与という画期的な方法により、新たな硬組織再生療法の可能性が示唆された。今後、安定的製造方法や効果的な投与方法を確立し、新規硬組織再生療法の確立を図る。

研究成果の概要（英文）：To develop new strategy for mineralized tissue regeneration, we have focused on tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) which is isozyme of alkaline phosphatase (ALP) and promotes biological apatite crystallization. An acidic oligopeptide-tagging approach generated negatively charged TNAP resulting in more efficient delivery to positively charged mineralized tissue. This study aimed to determine the effects of TNAP tagged with 6 or 8 aspartic acid residues (Asp; Asp-TNAP) on mineralized tissue regeneration. This study demonstrated that Asp-TNAP successfully promoted mineralization and periodontal tissue regeneration in periodontitis mouse model. Furthermore, recombinant TNAP significantly inhibited inflammation periodontitis mouse model. This study suggested that electrically charged TNAP is a therapeutic agent that can be applied for mineralized tissue regeneration including periodontal tissue regeneration.

研究分野：補綴歯科学

キーワード：骨 セメント質 歯周組織 再生医療 リン酸/ピロリン酸代謝 帯電効果 アルカリフォスファターゼ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

代表的硬組織疾患である歯周炎は、歯の喪失原因の約 40%を占め、喪失原因の第 1 位であり、50 歳以上では 50%以上が歯周炎に罹患していることが報告されている。歯周炎は、歯の植立に不可欠な硬組織である歯槽骨や歯根表面に存在するセメント質を破壊することにより、歯の動揺や脱落を引き起こす。この際、局所で増殖した病原細菌やリポ多糖 (Lipopolysaccharide; LPS) 等の病原因子は血流を介して遠隔臓器へと到達し、心疾患や肝疾患等の全身疾患にも影響を与える (Nagasaki A, et al., *Sci Rep.* 2020., Nagasaki A, et al., *J Clin Periodontol.* 2021.)。さらに、歯の喪失は咀嚼や嚥下等の口腔機能を低下させ、フレイルやサルコペニア等の全身状態にも大きな影響を与える。このため、局所での感染制御や口腔機能維持・回復が極めて重要である。

これまでに種々の歯周組織再生治療薬が開発されてきたが、血液や唾液に富む病変部の特徴から、局所に安定的に作用させるのが困難であり、複数回の投与による副作用のリスク上昇や医療費の問題等、多くの課題が指摘されている (図 1)。

硬組織の形成は、石灰化を促進するリン酸 (Phosphate; P_i) と石灰化を抑制するピロリン酸 (Pyrophosphate; PP_i) により厳密に制御されている。 P_i/PP_i 代謝を制御する分子として、1) 細胞内の PP_i を細胞外に輸送する Progressive ankylosis protein (ANK) 2) Adenosine triphosphate (ATP) から PP_i と Adenosine monophosphate (AMP) を産生する Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1) 3) PP_i から P_i を産生する Alkaline phosphatase (ALP) が知られている (図 2)。

我々のグループは、 P_i/PP_i 代謝が異所性石灰化を含む生体内の石灰化をはじめ、セメント質および歯槽骨の形成に非常に重要であることを見出し、歯周組織の発生や再生に非常に重要な役割を果たすことを明らかにした (Chu E, et al., *Bone.* 2020., Nagasaki A, et al., *J Dent Res.* 2021.)。さらに、これらの分子のうち、ALP のアイソザイムのひとつである組織非特異的アルカリリフォスファターゼ (TNAP) が、骨やセメント質の再生を強力に促進することを明らかにした (Nagasaki A, et al., *J Dent Res.* 2021.)。興味深いことに、TNAP は、細菌由来病原因子であるリポ多糖 (Lipopolysaccharid; LPS) やその刺激伝達経路を抑制し、抗炎症効果を有することも示唆されている (Graser S, et al., *Int J Mol Sci.* 2021.)。

ところで、硬組織は陽性に帯電していることが知られている。一方、タンパク質は、アミノ酸残基付加により陰性に帯電し得ることが明らかとなっている (Nishioka T, et al., *Mol Genet Metab.* 2006.)。そこで、アミノ酸のひとつであるアスパラギン酸残基 (Asp) を付加した TNAP (Asp TNAP) は、帯電効果により強力に硬組織に結合し、硬組織の再生を強力に促進するのではないかとこの着想を得た。さらに、ALP/TNAP の歯周炎における抗炎症能に関する検討を行った。

2. 研究の目的

本研究では、これらの効果を応用し、硬組織に強力に結合し、硬組織再生能を有する新規 Asp TNAP を作製し、その石灰化能や歯周炎における ALP/TNAP の抗炎症能について検討することとした (図 3)。

3. 研究の方法

(1) Asp6, 8 TNAP の作製方法の確立

本研究では、下記の特徴を有する Asp TNAP を製作することとした。

産生効率向上：ヒト TNAP 遺伝子配列を用い、宿主細胞からの分泌促進および産生効率向上のため、GPI anchor signal peptide sequence の削除および Export signal sequence の付加を行う。

硬組織結合力の付与：硬組織結合力付与のため、末端に Asp を 6 つもしくは 8 つ付加する。

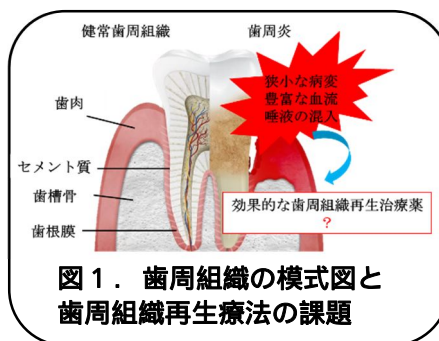


図 1. 歯周組織の模式図と歯周組織再生療法の課題

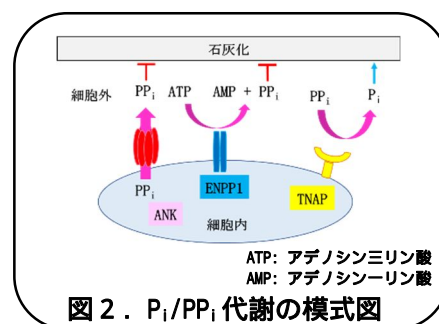


図 2. P_i/PP_i 代謝の模式図

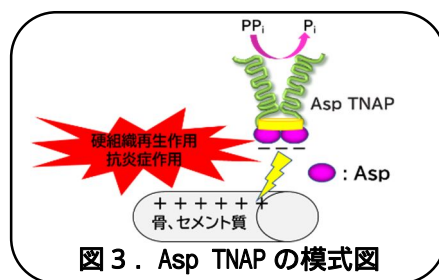
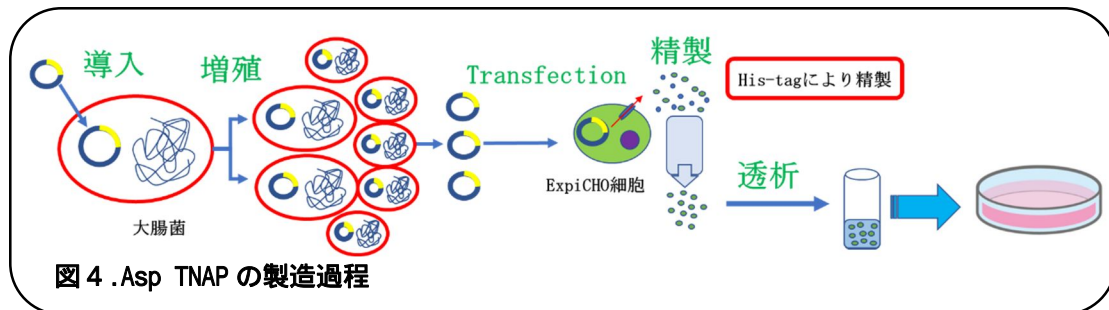


図 3. Asp TNAP の模式図

簡便な精製：タンパク質精製効率化のため、ヒスチジンタグ配列 (His-tag sequence) を付加する。

作製過程

上記遺伝子配列を有するプラスミドを作製し、Chinese hamster ovary cells (ExpiCHO 細胞) を用いて Asp TNAP を作製する。精製には His-tag を用いる (図 4)。



(2) Asp TNAP の石灰化促進効果および歯周組織再生効果の検討

in vitro: マウス由来セメント芽細胞様細胞株 (OCCM.30) に Asp6, 8 TNAP を作用させ、石灰化促進および石灰化関連遺伝子発現に与える効果を定量的に検討した。石灰化促進効果の評価方法として、Alizarin red staining を用いた。また、qPCR を用いて石灰化関連遺伝子発現に与える効果を定量的に評価した。

in vivo: 歯周組織再生への評価として、硬組織の低石灰化や菲薄化したセメント質、歯根膜の歯根からの剥離等により、歯周炎に類似した脆弱な歯周組織を呈する骨シアロタンパク (Bone sialoprotein; BSP/*Ibsp*) 欠損マウス (*Ibsp*^{-/-}) および野生型マウス (WT) の歯周組織に下顎骨開窓術を用いて Asp6, 8 TNAP を局所的に作用させ、MicroCT (骨量および石灰化密度測定) を用いた形態学的検討や組織染色による組織形態学的検討を行った。

(3) ALP/TNAP の抗炎症効果の検討

in vitro: マウスマクロファージ様細胞株 (J774A.1) に ALP を前作用させ、主たる歯周病原細菌である *P. gingivalis* 由来 LPS により誘導される炎症反応を抑制し得るかを検討した。検討には、qPCR 法を用い、*Tnf*⁻ や *Il-1* 等の炎症性サイトカイン発現に着目して定量的に評価した。

in vivo: WT マウス臼歯に絹糸を留置し、人工的に歯周炎を誘導した実験歯周炎モデルを作製し、recombinant TNAP を局所的に作用させることにより、抗炎症効果の検討を行った。評価は、実験 (2) と同様に MicroCT や組織染色を用い、形態学的および組織形態学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) 作製した Asp TNAP の確認

上記の方法にて、Asp TNAP を作製したところ、Coomassie staining および Western blotting 法にて、Asp TNAP が作製されたことが確認され、これらが強力なアルカリフォスファターゼ酵素活性を有することが明らかとなった。

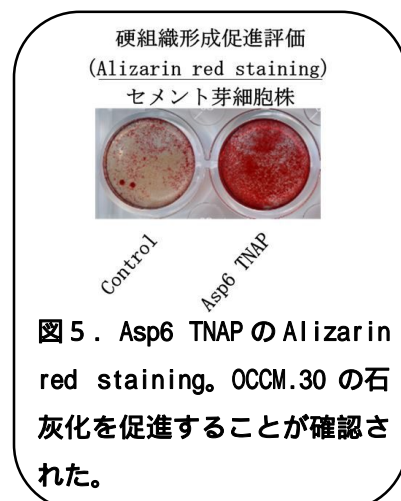
(2) Asp TNAP の石灰化促進効果および歯周組織再生効果検討の結果

in vitro: Asp TNAP が OCCM. 30 の石灰化を強力に促進することが明らかとなった。さらに、Asp TNAP が石灰化関連遺伝子発現を有意に増加させることが明らかとなった。

in vivo: Asp TNAP 局所投与群が、control 群と比較して、*Ibsp*^{-/-} および WT マウスの下顎骨骨量および骨密度を増加させることが明らかとなった。特に、*Ibsp*^{-/-} マウスにおいては、歯根表面にセメント質様組織の誘導が観察され、歯根膜の付着も観察された。

(3) ALP/TNAP の抗炎症効果の検討

in vitro: ALP を J774A.1 細胞に前作用させ、主たる歯周病原細菌である *P. gingivalis* の LPS



を作用させると、炎症性サイトカイン *Tnf-* や *Il-1* の遺伝子発現が有意に抑制された。
in vivo: 実験歯周炎モデルマウスに recombinant TNAP を局所的に作用させると、歯槽骨の有意な増加が認められた。組織学的には、好中球等の炎症細胞浸潤が抑制されていた。

これらの結果から、Asp TNAP が歯周組織再生に有効である可能性が示唆された。今後、Asp TNAP の抗炎症効果の検討や、付加した Asp 残基数の違いによる効果の詳細な検討を行い、より効果的な構造を決定し、種々の硬組織疾患に応用し得るか検討を行う予定である。

なお、本 Asp TNAP に関し、国際的な特許を出願し、受理されている。

No. E-186-2019. TNAP Locally Administered for Promoting Periodontal Health., International Application No. PCT/US2020/067697, International Publication No. WO2021/138581 A1, International Filing Date 2020.12.31., Publication Date 2021. 8. 7. US Patent (Publication Date 2023. 6. 29.), European Patent (Publication Date 2022. 9.11.), Japan Patent (Publication Date 2023. 3. 13.).

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 0件）

1. 著者名 Nagasaki A., Nagasaki K., Kear B.D., Tadesse W.D., Thumbigere-Math V., Millan J.L., Foster B.L., Somerman M.J.	4. 巻 9
2. 論文標題 Delivery of Alkaline Phosphatase Promotes Periodontal Regeneration in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 993-10011
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/00220345211005677	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Muhammad Dimas Aditya Ari, Atsuhiko Nagasaki, Hiroshi Egusa
2. 発表標題 Electrically Charged Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase Promotes Periodontal Tissue Regeneration for an Optimal Fixed Prosthodontics Treatment
3. 学会等名 The 14th Biennial Congress of the Asian Academy of Prosthodontics（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 長崎敦洋
2. 発表標題 骨シアロタンパク質の骨免疫機構に着目した新規硬組織再生療法の開発
3. 学会等名 第2回器官再生・幹細胞研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Muhammad Dimas Aditya Ari, Atsuhiko Nagasaki, Masahiro Yamada, Tsuyoshi Kimura, Hiroshi Egusa
2. 発表標題 A Novel Therapy for Mineralized Tissue Regeneration Using Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase Utilizing an Electric Charge Mechanism
3. 学会等名 令和5年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 長崎敦洋, 江草 宏
2. 発表標題 骨・セメント質再生におけるリン酸/ピロリン酸代謝の役割と再生療法への応用
3. 学会等名 日本補綴歯科学会 Prosthodontic Meeting for Next Generation 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長崎敦洋, Muhammad Dimas Aditya Ari, 鹿内陽樹, 楠山譲二, 江草 宏
2. 発表標題 Development of new therapy for periodontal tissue regeneration using electric charge mechanism
3. 学会等名 TI-FRIS/FRIS Symposium 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長崎敦洋, 鹿内陽樹, 楠山譲二, 江草 宏
2. 発表標題 酵素タンパク質の荷電制御に基づく硬組織再生の新機軸
3. 学会等名 2nd TI-FRIS Symposium / FRIS Annual Meeting
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長崎敦洋, 江草 宏
2. 発表標題 アルカリフォスファターゼの硬組織結合制御による新規歯周組織再生療法の開発
3. 学会等名 日本歯科医学会 第37回「歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sarah Brock, Atsuhiko Nagasaki , Martha Somerman
2. 発表標題 Alkaline Phosphatase, a Targeted Mineral Enzyme Therapy, Promotes Periodontal Tissue Regeneration
3. 学会等名 Postbaccalaureate Poster Day 2021, National Institutes of Health (NIH) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 TNAP Locally Administered for Promoting Periodontal Health.	発明者 Nagasaki A, Somerman MJ etc	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/US2020/067697	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>【受賞】 優秀発表賞 日本歯科医学会 第37回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い、2022年 アルカリフォスファターゼの硬組織結合制御による新規歯周組織再生療法の開発 長崎敦洋, 江草 宏</p>

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