

令和 5 年 4 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21069

研究課題名（和文）sFRP1由来機能性ペプチドを応用した革新的直接覆髄法の開発

研究課題名（英文）Development of the new direct pulp capping material based on sFRP1-derived peptides

研究代表者

一法師 啓太 (Keita, Ipposhi)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：10910838

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに申請者らは、sFRP1タンパクが原性象牙質に類似した修復象牙質形成を促進することを明らかにしてきた。また、sFRP1の活性部位が1-117番目のアミノ酸であること、および1-31番目のアミノ酸配列はシグナルペプチドであることが明らかとなっている。本研究ではこの報告を基に、32-117番目のアミノ酸配列から、活性部位の情報に基づき、11から20アミノ酸から形成されるsFRP1ペプチド（sFRP1-PEP）を、7種類合成することに成功した。現在これらのsFRP1PEPを歯髄細胞へと添加し、培養したのちそれらの表現型に対して検証を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在臨床応用されている直接覆髄剤として、水酸化カルシウム製剤およびMTAセメントが挙げられるが、それらは操作性に乏しいことや、十分量のRD形成に時間を要するなどの欠点を持つ。さらに、MTAセメントにて形成誘導されたRDには、原生象牙質と異なりトンネル状の空隙が認められることが報告されている。sFRP1は原生象牙質に類似したRDを形成誘導できることを報告してきたが、タンパクは不安定かつ高価である。本研究で生成したsFRP1ペプチドはタンパク質のこれらの欠点を補うことができる可能性を有している。これらのペプチドの応用により、これまで以上に歯髄を保存でき、歯の寿命を延長できることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that sFRP1 protein had the potential to induce primary-dentin like reparative dentin. Therefore, we tried to generate the sFRP1-peptides because peptide is easier to generate, more stable, and cheaper than protein. Previous reports showed that functional amino acid sequence was 32 to 117, therefore we generated 7 sFRP1-peptide based on the functional sequence. These were consisted of 11 to 20 amino acids. We added them to the primary human pulp cells and are trying to investigate their phenotypes.

研究分野：歯科保存学分野

キーワード：修復象牙質 原性象牙質 sFRP1 ペプチド 直接覆髄

## 1. 研究開始当初の背景

歯髄組織は知覚、栄養供給、免疫応答等、様々な役割を担う重要な組織である。そのため、歯髄が除去された失活歯では、細菌感染に対する抵抗性が低下することに加え、歯根破折を生じる可能性が増加することが報告されている。したがって、歯髄組織を保存することは、歯を長期に機能させる上で極めて重要な意味を持つ。う蝕除去や歯の破折により原生象牙質が欠失し、歯髄が露出（露髄）した場合、歯髄組織の保存を目的として、露髄部を歯内治療材料にて被覆する「直接覆髄」が行われる。直接覆髄を行った場合、歯髄中に存在する幹細胞および前駆細胞が象牙芽細胞様細胞へ分化したのち、露髄面直下に修復象牙質（RD）を形成する。この RD の形成には様々なシグナルの関与が示唆されているが、Scheller らは、Wnt/beta-catenin シグナルの活性化が、歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化を抑制することを明らかにしている。secreted Frizzled-related protein (sFRP) family の一つである sFRP1 は、Wnt シグナルの阻害を介して、様々な細胞の増殖や分化を調節する。また sFRP1 は、マウス臼歯発生時の象牙芽細胞においても発現が確認されている。これらの結果から、sFRP1 を応用することで、原生象牙質に類似した RD を形成誘導できる、革新的な直接覆髄剤を開発できるのではとの着想に至った

## 2. 研究の目的

歯周治療においては、重度歯周炎により破壊された歯周組織の再生を目的として EMD や FGF2 などのタンパク製剤が臨床応用されていることから、歯科治療へタンパク等のシグナル因子を応用することは、非常に有効であると考えられる。歯内治療においても、FGF2 や BMP2 などの骨芽細胞分化誘導能を示すタンパクを適応した直接覆髄が試みられてきたが、覆髄面直下に多孔性の骨様象牙質が形成されるのみであり、原生象牙質に類似した RD での露髄面封鎖は生じないことが報告されている。一方、申請者はこれまでに、歯の発生時において、前象牙芽細胞が象牙芽細胞へと分化するのに伴い、sFRP1 の発現量が上昇すること、および sFRP1 タンパクにて被覆した臼歯露髄部直下に、象牙細管を持たない骨様象牙質ではなく、原生象牙質同様に象牙細管を有する RD 形成が誘導されることを明らかにしている。しかしながら、タンパクは機能性に優れるが、合成に多くの費用がかかることや、ロット間での機能のばらつきなどが問題として挙げられる。そこで申請者は、タンパクよりも少数もアミノ酸から構成されるペプチドに着目した。ペプチドは大腸菌を用いて作製するタンパクと異なり、固層法や液層法によって人工的に合成できることから、安定したものを比較的安価に大量合成することが可能である。そこで本研究では、sFRP1 のアミノ酸情報を基に複数のペプチドを合成し、それらの機能評価を行うことで、修復象牙質形成を効果的に誘導する sFRP1 由来機能性ペプチドを創出することを目的とした。

## 3. 研究の方法

sFRP1 の活性部位が 1-117 番目のアミノ酸であること、および 1-31 番目のアミノ酸配列はシグナルペプチドであることが明らかとなっている。この報告を基に、32-117 番目のアミノ酸配列の様々な位置を結合した sFRP1 由来ペプチド (sFRP1-PEP) を数種類合成する。申請者はこれまでに、100 ng/mL の sFRP1 にて 5 日間刺激したヒト歯髄細胞において、非刺激群よりも象牙芽細胞分化が促進することを明らかにしている。この結果を基に、sFRP1-PEP を 100 ng/mL の濃度にてヒト歯髄細胞へと添加し、その象牙芽細胞分化に及ぼす影響を検証する。

#### 4 . 研究成果

CRNPRE および Sequence to Function Annotation Server を用いることで、sFRP1 の 32-117 番目のアミノ酸配列から、立体構造や類似性情報を基に、11 から 20 アミノ酸から形成される sFRP1 ペプチド (sFRP1-PEP) を、7 種類合成することに成功した。これらの sFRP-PEP は、いずれも蒸留水に可溶性であった。そこでこれらを蒸留水にて希釈したのち、100 ng/mL の濃度にてヒト歯髄細胞へと添加し、培養を行った。コントロールとして、蒸留水添加群および、sFRP1 タンパク添加群を用意した。現在これらの細胞の表現型に対して検証を進めている。

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 Keita Ipposhi, Atsushi Tomokiyo, Taiga Ono, Kozue Yamashita, Muhammad Anas Alhasan, Daigaku Hasegawa, Sayuri Hamano, Shinichiro Yoshida, Hideki Sugii, Tomohiro Itoyama, Marina Ogawa, Hidefumi Maeda	4. 巻 10
2. 論文標題 Secreted Frizzled-Related Protein 1 Promotes Odontoblastic Differentiation and Reparative Dentin Formation in Dental Pulp Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	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） 10.3390/cells10092491	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 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keita Ipposhi, Atsushi Tomokiyo, Taiga Ono, Kozue Yamashita, M. Anas Alhasan, Daigaku Hasegawa, Sayuri Hamano, Shinichiro Yoshida, Hideki Sugii, Tomohiro Itoyama, Marina Ogawa, Hidefumi Maeda
2. 発表標題 Secreted frizzled-related protein 1 promotes odontoblastic differentiation and reparative dentin formation in dental pulp cells
3. 学会等名 the 19th JEA-KAE Joint Meeting（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 編：一般社団法人 日本歯内療法学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 クインテッセンス出版株式会社	5. 総ページ数 190
3. 書名 別冊 ザ・クインテッセンス 日本歯内療法学会がすべての歯科医師に贈る最新トレンド 明日の臨床に役立つ知識と技術を徹底解説	

〔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
---------	---------