

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390436

研究課題名(和文)象牙質再石灰化・再生技術を基盤とした新規う蝕治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel strategy for caries treatment based on techniques of dentin remineralization and regeneration

研究代表者

齋藤 隆史(SAITO, TAKASHI)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：40265070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：象牙質再石灰化技術及び象牙質再生技術により新規の齲蝕治療材料・方法を開発することを目的とした本研究成果は以下のとおりである。CMETの石灰化誘導能を確認し、CMET配合接着性材料の高い再石灰化誘導活性、接着界面の長期耐久性を明らかにした。さらにフォスフォリンRGD含有ペプチドが象牙芽細胞分化を促進し、in vivoで修復象牙質形成を誘導することを明らかにした。このことからこれらの材料の新規齲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 results of this research having the purpose of developing novel caries treatment materials, method based on dentin remineralization technology and dentin regeneration technology are as follows; Firstly, the mineral induction ability of CMET was confirmed and the high remineralization activity and the long-term durability at the adhesion interface of CMET containing adhesive materials were clarified. Furthermore, it was demonstrated that phosphoporyn RGD-peptides promoted odontoblast-differentiation in vitro and the reparative dentin formation in vivo. From these results, it was suggested the high possibility of these materials as novel caries treatment materials.

研究分野：歯科保存学

キーワード：保存修復学 齲蝕治療 象牙質再石灰化 修復象牙質誘導

1. 研究開始当初の背景

高齢社会を迎え、歯を長年にわたり口腔内に維持し機能させる意義は大きい。齲蝕は歯周病と並び歯を喪失する大きな原因となっている。齲蝕は歯のエナメル質、象牙質、歯髄へと進行し、最終的には歯槽骨を侵していく。そこで齲蝕の進行を停止させて、再石灰化・再生技術を用いて歯の健康を維持させるために、象牙質・歯髄複合体への新たな介入方法を開発する必要がある。

まず第一に、象牙質に対しては齲蝕によって脱灰された細菌感染部(う蝕象牙質外層)を完全に除去して修復処置を行うのではなく、minimal intervention (MI)のコンセプトをさらに発展させ、再石灰化技術により修復処置を完了することができれば、歯の口腔内寿命を延伸することができる考えた。そのために、象牙質の再石灰化に強く関与する接着性モノマーカルシウム誘導体 calcium 4-methacryloxyethyl trimellitate (CMET)が有望であり、これによる象牙質再石灰化メカニズムを明らかにするとともに、CMETを添加した材料による効果的な再石灰化を誘導する方法についての検討が必要である。

次に、齲蝕の進行に伴う歯髄喪失によって、機械的脆弱化による破折、変色、根尖性歯周炎の罹患、感覚機能喪失、齲蝕抵抗性の低下など種々の問題点が発生し、明らかに健康歯髄の存在が歯の喪失防止につながっていることから現在の歯髄保存治療を予知性の高い確実な治療法に改良する必要がある。これまで歯髄保存治療で主に用いられてきた水酸化カルシウムは強アルカリ性であるため、歯髄為害性が高く慢性炎症・内部吸収発生の可能性など種々の問題点が指摘されてきた。そのために、硬組織形成誘導活性を持つ象牙質フォスフォオリンが有望であり、特に硬組織形成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および適切なドラッグデリバリーシステムを利用することにより象牙芽細胞から修復象牙質形成誘導を促し、その詳細なメカニズムの解明と効果的な誘導法についての検討が必要である。

最終的には高品質で安全性の高い新規深在性齲蝕治療材料及び治療法の確立をめざすことを目的として、本研究の発想に至った。

2. 研究の目的

(1) 接着性モノマーカルシウム誘導体 calcium 4-methacryloxyethyl trimellitate (CMET)の象牙質再石灰化誘導活性を確認するとともに、CMET配合接着性材料およびCMETの構成成分であるカルシウムイオン配合材料の機械的性質および象牙質再石灰化能、接着界面の長期耐久性について in vitro 実験系について検討すること

(2) フォスフォオリンN末端に存在し、RGD配列を含む合成ペプチドを合成して in vitro 細胞分化実験, in vivo 動物直覆実験を実施することにより修復象牙質形成誘導メカニズムを明らかにして、強力に効果的な象牙質再生が得られるような条件を見出すこと

(3) さらに、これらの知見を総合して生体に安全で高品質な新規齲蝕治療材料の開発の一助とすること

3. 研究の方法

(1) CMETによる石灰化誘導活性の確認とCMET配合・カルシウムイオン配合接着性材料の in vitro 実験系での物性・接着性能等の検討

in vitro 実験系を用いて、CMETの石灰化誘導活性を確認するとともに、接着性材料(ハイブリッドコート、サンメディカル)に配合して、機械的性質、象牙質接着性能、脱灰象牙質の再石灰化誘導活性などを調査した。さらにカルシウムイオン配合接着性材料についても予備的に調査した。

(2) フォスフォオリン RGD 含有ペプチド (RGD-1, RGD-2, RGD-3, RGD-4, RGD-5等)の合成

ヒトフォスフォオリンN末端に存在し、RGD配列を含む硬組織形成誘導活性が見込まれる数種類の合成ペプチドを作成した。

(3) フォスフォオリン RGD 含有ペプチドによる象牙芽細胞の分化・石灰化誘導の検討

ヒトフォスフォオリンN末端に存在し、RGD配列を含む硬組織形成誘導活性が見込まれる数種類のペプチドを用いて in vitro 細胞培養実験で、象牙芽細胞の増殖・分化・石灰化に対する影響を調査した。さらに in vivo 動物直覆実験で、それぞれのペプチドの活性を調査した。

4. 研究成果

まず最初に、CMETによる高い石灰化誘導能を in vitro 石灰化誘導実験で確認した。また、CMETをハイブリッドコートに添加した際の至適配合量が1.5%であることを見出し、これを用いて象牙質接着試験を行ったところ、微小引張り強さが向上し、樹脂含浸層直下の硬さが上昇し、接着界面で良好な接着状態が得られることがわかった。さらに、カルシウムをスーパーボンド C&B (サンメディカル)に添加して再石灰化実験を行ったところ、配合量依存的に石灰化が促進されることが明らかになり、エックス線回折からヒドロキシアパタイトが誘導されることが示された。次に象牙質接着試験を行ったところ、6か月後の引張り強さ試験で良好な接着強さを示し

たことから、CMETの各種性能はカルシウムに依存していることが予想された。

次に、ヒトフォスフォリン RGD 含有ペプチドを用いて *in vitro* 細胞培養実験を行ったところ、DSPP, DMP-1 に加え、ALPase, OPN, OCN など細胞分化に関する mRNA の発現促進が認められ、さらに石灰化誘導も認められた。また、担体として魚由来型コラーゲンが効果的であることも認められた。

以上の結果から、石灰化誘導性モノマー CMET および象牙質形成誘導性ペプチド RGD を利用した接着性材料は有用な齲蝕治療材料となり得ることが示唆された。今後さらに安全で効果的な基質の開発を行い、実用化へ向けた研究を行う予定である。

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 10 件)

1. Koike T, Polan, MMA, Izumikawa, Saito T. Induction of reparative dentin formation on exposed dental pulp by dentin phosphophoryn/collagen composite. *BioMed Res Intl*, 01/2014; 2014:745139. DOI:10.1155/2014/745139. 査読有
2. Polan MAA, Handa K, Saito T. Dentin phosphophoryn promotes odontoblast differentiation *in vitro* and induction of mineralized tissue-like matrix *in vivo*. *J Oral Tissue Engin.* 11, 201-212, 2014. 査読有
3. Nakagaki S, Iijima M, Handa K, Koike T, Yasuda Y, Saito T, Mizoguchi I. Micro-CT and histologic analyses of bone surrounding immediately loaded miniscrew implants: Comparing compression and tension loading. *Dent Mater J.* 33, 1-7, 2014. 査読有
4. Handa K, Koike T, Hayashi K, Saito T. Application of high-frequency radio waves to direct pulp capping. *J Endod.* 39, 1147-1150, 2013. 査読有
5. Hayashi K, Handa K, Koike T, Saito T. The possibility of genistein as a new direct pulp capping agent. *Dent Mater J.* 32, 976-985, 2013. 査読有
6. Iijima M, Ito S, Nakagaki S, Muguruma T, Saito T, Mizoguchi I: Effects of the addition of fluoride to a 4-META/MMA-TBB based resin adhesive on fluoride release and cariostatic potential. *Dent Mater J* 32, 156-164, 2013. 査読有
7. Ito S, Iijima M, Motai F, Mizoguchi I, Saito T: Effects of calcium salts of acidic monomers on mineral induction of phosphoprotein-immobilized to agarose beads. *J Biomed Mater Res part A* 100, 2760-2765, 2012. 査読有
8. Izumikawa M, Hayashi K, Polan MAA, Tang J, Saito T. Effects of Amelogenin on Proliferation, Differentiation, and Mineralization of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells *in Vitro*. *TheScientificWorldJournal*, Article ID 879731, 8pages, 2012. 査読有
9. Izumikawa M, Hayashi K, Polan MAA, Tang J, Saito T. Quantitative Analysis of Dentin-related mRNA Expression in Human Dental Pulp Cells Stimulated by Amelogenin. *J Oral Tissue Engineering*, 9, 10-16, 2011. 査読有
10. 齋 富美子、伊藤修一、塚本尚弘、齋藤隆史. 知覚過敏抑制剤の象牙質接着強さと象牙質封鎖性. *接着歯学* 29: 69-76, 2011. 査読有

[学会発表](計 30 件)

1. Nomann NA *et al.* Effect of 4-META/MMA-TBB resin containing CaCl₂ on dentin mineralization. 第 33 回北海道医療大学歯学会、2015 年 3 月 7 日、北海道医療大学サテライトキャンパス(北海道、札幌)
2. Tang J *et al.* Effect of type I collagen on MDPC-23: an *in vitro* comparative study of collagen derived from porcine skin and tilapia fish scale. 第 33 回北海道医療大学歯学会、2015 年 3 月 7 日、北海道医療大学サテライトキャンパス(北海道、札幌)
3. 伊藤修一ら: CaCl₂ 添加 4-META/MMA-TBB レジンの象牙質接着性及び象牙質再石灰化に対する影響. 第 33 回日本接着歯学会、2014 年 12 月 13 日、ニチイ学館神戸ポートアイランドセンター(兵庫県、神戸)
4. Nomann NA *et al.* Effect of 4-META/MMA-TBB resin containing CaCl₂ on dentin mineralization. 第 141 回日本歯科保存学会、2014 年 10 月 30 日、山形テルサ(山形県、山形)
5. 伊藤修一ら: 新規バイオアクティブセメントの開発. 第 12 回日本再生歯科医学会、2014 年 8 月 26 日、徳島大学(徳島県、徳島)
6. Saito T: Dentin regeneration by human phosphophoryn-derived RGD peptides. Seminar in Sun Yat-sen University (招待講演)、2014 年 6 月 27 日、中山大学光華口腔医学院(中国、広州)
7. Saito T: Novel strategy for caries treatment -Development of dentin remineralization/ regeneration therapy-. 4th Research week -International symposium of oral medicine in Taipei Medical University- (招待講演) 2014 年 5 月 24 日、台北医

- 学大学(中華民国、台北)
8. Saito T: Dentin regeneration by human phosphophoryn-derived RGD peptides. 6th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells-2013. 2013年10月12-14日、大連(中国)
 9. Koike T *et al.* Micro morphological study of reparative dentin induced by phosphophoryn. 2nd Meeting of IADR-Asia Pacific Region, Aug. 21-23, 2013, Bangkok(Thailand)
 10. Saito T: Novel strategy for dentin remineralization in Adhesive Dentistry. 5th International Congress on Adhesive Dentistry(招待講演), June 13-14, 2013, Philadelphia(USA)
 11. 伊藤修一ら: 新規モノマーCMET配合シーリングコート材の象牙質接着性への影響. 第138回日本歯科保存学会、2013年6月27-28日、福岡国際会議場(福岡県、福岡)
 12. 林敬次郎ら: ラット歯髄細胞の増殖・分化に及ぼすゲニステインの影響. 第9回世界歯内療法会議、2013年5月23-26日、東京国際フォーラム(東京都、東京)
 13. 半田慶介ら: 直接覆髄への高周波の応用. 第9回世界歯内療法会議、2013年5月23-26日、東京国際フォーラム(東京都、東京)
 14. 小池俊之ら: フォスフォフォリンにより形成されたラット修復象牙質の微細構造の研究. 第9回世界歯内療法会議、2013年5月23-26日、東京国際フォーラム(東京都、東京)
 15. Ito S et al. Effect of bonding agents containing S-PRG filler in dentin mineralization. 91st IADR, March 20-23, 2013, Seattle (USA)
 16. Tang J *et al.* Effects of phosphophoryn-derived RGD peptide on the proliferation and differentiation of odontoblasts. 第31回北海道医療大学歯学会、2013年3月9日、北海道医療大学サテライトキャンパス(北海道、札幌)
 17. Polan MAA *et al.* Effect of dentin phosphophoryn on odontoblast differentiation in vitro. 第31回北海道医療大学歯学会、2013年3月9日、北海道医療大学サテライトキャンパス(北海道、札幌)
 18. 小池俊之ら: フォスフォフォリン/アルギン酸ゲル複合体によるラット修復象牙質の微細形態学的観察. 第60回日本歯科理工学会、2012年10月13-14日、九州大学医学部百年講堂(福岡県、福岡)
 19. Polan MAA *et al.* Effect of dentin phosphophoryn on odontoblast differentiation in vitro. 第10回日本再生歯科医学会、2012年9月1-2日、二

- チイ学館神戸ポートアイランドセンター(兵庫県、神戸)
20. 伊藤修一ら: 歯髄温存療法覆髄材が象牙質石灰化に及ぼす影響. 第136回日本歯科保存学会、2012年28-29日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県、宜野湾)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[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

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

別所 和久 (KAZUHISA BESSHO)
京都大学・医学研究科・教授

半田 慶介 (KEISUKE HANDA)
北海道医療大学・歯学部・講師
研究者番号: 40433429
(移動のため、平成23年度~25年度のみ研究分担者として本研究に参加)