

平成 22 年 6 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19209061

研究課題名（和文） 機能性インプラントのためのセメント質誘導ペプチド創製

研究課題名（英文） Creation of Cementum Inducing peptide for functional Implant

研究代表者

井上 孝（INOUE TAKASHI）

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20125008

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、天然歯に類似したシャーピー線維様構造を持たせた機能性インプラントを開発するために、セメント質誘導性機能性ペプチドを開発することである。その結果、共同研究者の芝らが開発した研究により、細胞のインテグリンなどと結合する RGD モチーフのタンパク質とチタンに結合するタンパク(TBP-1)を応用し、チタン上に両モチーフを含む合成タンパク質を Molclraft により作製した。そして、in vitro によるデータを重ねその証拠を Biomacromolecules(2008)にも発表した。この結果、従来タンパク質がつくことの無かったチタンインプラントの表面に TBP-1 を介して様々なタンパク質をつけることが可能となった。将来的に、支持骨との間に歯根膜様構造を持つ機能性インプラントを作るのが可能となった。また、研究途中にチタンに代わるジルコニアが注目され、研究機関中に、ジルコニアに結合する人工タンパク検索も行った。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to create the cementum inducing peptide for functional implant which have a cementum with sharp's fibers just same manner as natural tooth. We produced the artificial protein with Titanium-binding protein (TBP-1) which bind to the titanium, and RGD motif which connected to the integrin of the cells using Molclraft. We published these in vitro results on the Biomacromolecules (2008). From these results suggest that we could bind the various kinds of protein on the titanium surface on the titanium surface by TBP-1. In the near future, we could make a functional implant which have a periodontal ligament-like structure. In the mean time, Zirconium have given attention to implant materials instead of titanium, we investigate Zirconium binding protein as well as TBP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	26,900,000	8,070,000	34,970,000
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	35,100,000	10,530,000	45,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：インプラント、チタン、人工ペプチド、チタン結合ペプチド、セメント質、RGDモチーフ、融合タンパク、細胞接着

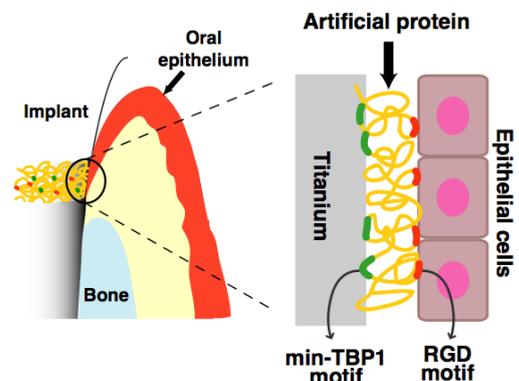
1. 研究開始当初の背景

21世紀となり、インプラントにより欠損歯列を持つ患者の QOL は著しく向上したが、インプラントは天然歯と同一口腔内で使用される機会が多く、支持および周囲組織の相違から様々な不具合が生じているのも事実である。この原因は、インプラントの研究がインプラント材料、デザイン、表面改質に負うところが主で、インプラント周囲にセメント質・歯根膜様の機能性組織を付与し天然歯に近づけようとするコンセプトが欠落し、生物学的・科学的な表面改質技術については研究が少ない点にあった。もし、インプラントが天然歯の機能に近いものとなれば、予知性はより向上し、生体との調和も得られアンチエイジングにも貢献できるものと考えられる。本研究では、機能的インプラントとして、セメント質・歯根膜機構を持たせる、『機能的インプラントシステムの確立』を目指した。

2. 研究の目的

当該研究の学術的特色は、インプラント周囲の生物学的・科学的な表面改質技術により発生期に近い真のセメント質と歯根膜をインプラント表面に創製することであった。現在の天然硬組織誘導ペプチドはそのサイズが大きく、アミノ酸が修飾などの問題点も指摘されている。従って理想的には、配列が短く、活性が高く、インプラントに固着し、細胞に効果的な機能性ペプチド配列を用いるのが望ましい。このような条件を満たす理想化ペプチドの合成は、従来のような曖昧な塗り薬的なものから脱却し、確実に治療に貢献することが期待される。本研究で行なう研究は、インプラント表面に応用した人工タンパク質上に生物機能を再構成する技術開発を

行うことで機能性インプラントの開発を実現化させる独創的のものであった。また予想される結果と意義は、本プロジェクトの実現により、天然歯と混在して使われるインプラントの予知性を確実なものとするができる。つまり、従来の骨結合型インプラント独特の概念を構築するのではなく、100年以上従来から積み重ねられた天然歯を対象とした歯科医学をインプラントにも応用発展させることができ、アンチエイジングにも寄与できる意義深いものと考えた。



3. 研究の方法

(1) セメント質誘導機能性ペプチドの合成およびその活性体のスクリーニング

共同研究者の芝は、既に上皮接着タンパクなどに共通する RGD モチーフのタンパク質を作製している。平成 19 年度には、まず本研究の目的であるセメント質誘導モチーフを探った。

現在、我々の研究を含め、Malassez の上皮残遺内に含まれる歯原性上皮にセメント質誘導能を持つタンパクがあると考えられ、EMD(Emdogain)などが開発販売されている。しかし、天然のタンパク質はサイズが大きく、アミノ酸も就職されている。理想化したペプチド配列（短くて、活性高く、セメント芽細胞分化に効果大）を用いるのが望ましい。天然のセメント質誘導タンパクの部分配列か

ら、このような条件を満たす短い配列を、合成ペプチドを用いたセメント質誘導アクセイから理想化ペプチドを次の方法を用いて探した。

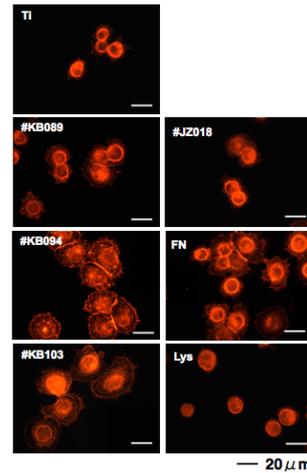
(2) 融合ペプチドの機能発現の *in vitro* 検討
既に骨誘導タンパクである BMP-2 のアミノ酸配列の中で、骨誘導を直接になるアミノ酸配列部は 68~87 番目に活性があると報告されている(宮崎, 2004)。また、実際に芝らが、チタンに特異的に結合するペプチド (TBP: Titanium binding protein) モチーフである RKLPGA(Sano, K et al.: 2005)のタンパクを作製していた。そして現在、BMP-2 モチーフ機能ペプチド(Bone Inducing Functional Peptide: BIFP)と TBP を MRP 法(Shiba K.; PNAS USA 1997, Vol 94: 3805-3810.)により、融合させることに成功したが、その機能評価は行っていなかった。本研究によりセメント質を誘導するモチーフが解析された場合にも、TBP との融合ペプチドの検討が必要になることは明らかであった。

(3) 融合ペプチドの機能発現の *in vivo* 検討

平成20年度の *in vitro* の実験結果を受け、実際の生体内 (*in vivo*) において、作製された TBP-BMP (CIFP) の機能発現について検討し、将来的な臨床応用への総括を行う。具体的には、市販されている SLA 表面を持つインプラントを購入し、その表面に機能性ペプチドを融合付着させ動物実験を行った。

4. 研究成果

本研究の結果、従来タンパク質がつくことの無かったチタンインプラントの表面に TBP-1 を介して様々なタンパク質をつけるその機能発現が明らかとなった (図)。



つまり、これらのことは、上皮性の強固な結合を可能にし、外部からの細菌侵入にたいして、リスクを減らすこととなり、加えて、骨誘導タンパクを応用することができれば、骨粗鬆症や骨量不足の患者にも、インプラントを応用することが可能となる。しかし、課題も残り、創傷の治癒を考えたとき、出血・凝固、白血球による創内浄化、肉芽組織による組織再生、そして再構築の適切な時期に、必要なタンパク質が徐放され、細胞に働く必要がある。そのためには、Drug Delivery system の構築が要求され、適切な時期に適切なタンパクがインプラント周囲の細胞に働く必要がある。また、本当にこれらチタンに結合したタンパク質が生体内において、その機能を発揮するか否かを早急に検討する必要がある。そのために、動物実験を行い、検証していく必要があった。先ず、従来より良く知られている BMP などを使い、実証し、その後タンパク質誘導タンパクの検索と、その応用を同様に行っていく必要がある。

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 41 件)

1: Yoshinari, M., Matsuzaka, K., Inoue, T., 他 5 名. Controlled release of simvastatin acid using cyclodextrin inclusion system, Dental Materials Journal 査読有, Vol26, 2007, 451-456.

2: Wei, J., Yoshinari, M., 他 5 名 Adhesion of

mouse fibroblasts on hexamethyldisiloxane surfaces with wide range of wettability, Journal of Biomedical Materials Research 査読有, Vol 81B, 2007, 66-75.

3: Amemiya H, Matsuzaka K, Inoue T, 他 2 名 Cellular responses of rat periodontal ligament cells under hypoxia and re-oxygenation conditions in vitro, J Periodont Res 査読有 Vol 43,2007, 322-327.

4: Tanaka S, Matsuzaka K, Inoue T, 他 1 名 Characteristics of newly formed bone during guided bone regeneration; Analysis of Cbfa-1, osteocalcin, and VEGF expression. Journal Oral Implantology, 査読有, Vol 33, 2007, 321-326.

5: Pugdee, K., Yoshinari, M., 他 5 名 Gene expression of MC3T3-E1 cells on fibronectin-immobilized titanium using tresyl chloride activation technique. Dental Materials Journal, 査読有, 2007, 647-655.

6: Markiewicz, M.R., Yoshinari, M., 他 7 名 Draining orocutaneous fistula associated with a failing subperiosteal implant: report of a case. Journal of Oral Implantology, 査読有, Vol 33, 2007, 347-352.

7: Matsuzaka, K., Inoue, T., 他 4 名 Effect on the amount of bone-implant contact when splinting immediate-loaded dental implants, Implant Dentistry, 査読有, Vol 16, 2007, 309-316.

8: M.Saitoh, T.Inoue, Y.Abiko 他 10 名 Increased expression of β -defensin-2 and -3 during the development of autoimmune sialoadenitis in MRL/lpr mice, Med Mol Morphol, 査読有, Vol 43, 2007, 157-162.

9: M.K.Kim, T Inoue, S.H.Choi, 他 3 名 The effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the osseointegration of

endosseous implant surface, Key Engineering Materials 査読有, Vol 330-332, 2007, 597-600.

10: U.W.Jung, T. Inoue, 他 4 名 Healing of surgically created circumferential gap around non-submerged type implants in dogs: a histomorphometric study, Clin. Oral Impl. Res 査読有, Vol 18, 2007, 171-178.

11: Shimotoyodome, A Inoue, T. 他 7 名 Reduction of streptococcus mutans adherence and dentin biofilm formation by surface treatment with phosphorylated polyethylene glycol, Antimicrobial agents and chemotherapy 査読有, Vol 51, 2007, 3634-3641.

12: Y Kurashige, T Inoue, Y Abiko, 他 7 名 Profiling of differentially expressed genes in porcine epithelial cells derived from periodontal ligament and gingiva by DNA microarray, Archives of Oral Biology, 査読有, Vol 53, 2008, 437-442.

13 : Endoh T., Sato D., Matsuzaka K., Inoue T. Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor attenuate angiotensin- II -induced facilitation of calcium channels in acutely dissociated nucleus tractus solitarii neurons of the rat, Arch. Oral Biol. 査読有 Vol 53, 2008, 1192-1201,

14: Kokubun K., Kashiwagi K., Yoshinari M., Inoue T., Shiba K., Motif-Programmed artificial extracellular matrix., Biomacromolecules, 査読有 Vol 9, 2008, 3098-9105.

15: Endoh T., Matsuzaka K., Inoue T. 他 4 名, Galanin inhibits calcium channels via $G\alpha_i$ -protein mediated by GalR1 in rat nucleus tractus solitarii, Brain Research, 査読有 Vol 1229, 2008, 37-46.

- 16: . Tsuruoka M., Matsuzaka K., Inoue T 他 3 名 T., Morphological and molecular changes in denture-supporting tissues under persistent mechanical stress in rats J Oral Rehabilitation, 査読有 Vol 35, 2008, 889-897.
- 17: Kashiwagi K, Tsuji T, Shiba K. , Directional BMP-2 for functionalization of titanium surfaces. Biomaterials 査読有 Vol 30, 2008, 1166-1175.
- 18: Ikezoe Y, Shiba K. 他 5 名. Giant growth of two-dimensional crystal of protein molecules from a three-phase contact line. Langmuir 査読有 Vol 24, 2008, 12836-12841.
- 19: Tsuji T, Shiba K 他 3. Direct transformation from amorphous to crystalline calcium phosphate facilitated by motif- programmed artificial proteins. PNAS, 査読有, Vol 105, 2008, 16866- : 16870.
- 20: Sano K, Shiba K. J Stepwise accumulation of layers of aptamer-ornamented ferritins using biomimetic Layer-By-Layer (BioLBL). Mater Res 査読有 Vol 23, 2008, 3236-40.
- 21: Ishikawa K, Shiba K. 他 5 . Adsorption properties of a gold-binding peptide assessed by its attachment to a recombinant apoferritin molecule. Applied Physics Express 査読有 Vol 1, 2008, 034006.
- 22: Saito H, , Shiba K. 他 2 , Motif-programmed artificial protein induces apoptosis in several cancer cells by disrupting mitochondria. Cancer Science 査読有 Vol 99(2) , 2008, 398-406 .
- 23: Matsuzaka, K. 他 5 Low-level (gallium-aluminum-arsenide) laser irradiation of Par-C10 cells and acinar cells of rat parotid gland. Onizawa, K., Lasers Med Sci. 査読有 Vol 24, 2009. 155-161
- 24: Matsuzaka, K., Inoue, T. 他 9 Changes in the homeostatic mechanism of dental pulp with age: Expression of CBFA-1, dentin SP, VEGF, HSP-27 mRNAs. J Endodontics, 査読有 Vol 34 , 2008, 818-821.
- 25: Yamawaki, K., Inoue T 他 2, Effects of epidermal growth factor and/or nerve growth factor on Malassez's epithelial rest cells in vitro. J Periodont. Res. 査読有 Vol 45, 2010, 421-427.
- 26: Soumiya, H., Matsuzaka, K. Inoue, T. 他 1 名 Molecular and morphological analyses of the osteogenic activity of rat cultured periosteum cells in vivo and in vitro. Oral Med Pathol, 査読有 Vol 14, 19-28, 2009.
- 27: Cha J. Y., Lim, J. W., Inoue T. 他 6 Influence of the length of the loading period after placement of orthodontic mini-implants on changes in bone histomorphology. Int. J Oral Maxillofac Implants, 査読有 Vol 24:842-849, 2009.
- 28 : Naito K., Inoue T. 他 2 名 Mechanical force promotes proliferation and early differentiation of bone marrow derived osteoblast-like cells in vitro, Oral Med Pathol 査読有 Vol 13, 143-149, 2009.
- 29: Kokubu E., Hamilton D. W., Inoue T., Brunette D. M., Modulation of human gingival fibroblast adhesion, morphology tyrosine phosphorylation, and ERK 1/2 localization on polished, grooved and SLA substratum topographies, J Biomed Mater Res. 査読有, Vol 91A. 2009, 663-670.
- 30: Kokubu E., Yoshinari, M., Matsuzaka K., Inoue T. Behavior of rat periodontal ligament cells on fibroblast growth factor-2-immobilized titanium surfaces treated by plasma modification, J Biomed Mater Res. 査読有, Vol 91A, 2009, 69-75.
- 31: Yoshinari M., Kato T, Matsuzaka K., Hayakawa T, Shiba K. Prevention of biofilm formation on titanium surfaces modified with conjugated molecules comprised of antimicrobial and titanium-binding peptides. Biofouling 査読

有 Vol 26, 103-110, 2009.

32: Patwardhan P, Shiba K,他 4 名. ACS Synthesis of functional signaling domains by combinatorial polymerization of phosphorylation motifs. Chem Biol 査読有 Vol 4, 751-758, 2009.

33: Matsukawa N., Shiba K, Yamashita I.他 2 名 Hexagonal close-packed array formed by selective adsorption onto hexagonal patterns. Langmuir 査読有 Vol 25, 3327-3330, 2009.

34: Miyawaki J, Iijima S, Shiba K, Yudasaka M. 他 10 Biodistribution and ultrastructural localization of single-walled carbon nanohorns determined in vivo with embedded Gd₂O₃ labels. ACS Nano 査読有 Vol 3, 1399-1406, 2009.

35: Matsumura S, Shiba K,他 5 名 Prevention of carbon nanohorn agglomeration using a conjugate composed of comb-shaped polyethylene glycol and a peptide aptamer. Mol Pharm 査読有 Vol 6, 441-447, 2009.

36: Nakagawa, E., Matsuzaka, K., Inoue, T.他 2 名 Effects of nicotine on Malassez' epithelial rest cells in early primary culture: cell proliferation and mRNA expression of heat shock protein 70 and vascular endothelial growth factor. Oral Med Pathol 査読有, Vol 13, 41-45, 2009.

37: Naruse, S., Matsuzaka, K., Inoue, T. Rat periodontal ligament cells following heavy mechanical stress. J. Jpn. Assoc. Dent. Traumat. Vol15, 査読有, 2009, 1-8.

38: Senzui, S, Matsuzaka, K., Inoue, T.他 1 名 Responses of immature dental pulp under hypoxic conditions in vitro. Oral Med Pathol 査読有, Vol.14, 2010, p107-111

39: Matsuzaka, K., Yoshinari, M. Inoue, T.他 5 名 Age-related differences in the expression of heat shock protein 27 by rat periodontal ligament cells in culture. Oral Med Pathol. 査読有, Vol. 14, 2010, 113-114.

40: X.J. Wang, Inoue, T.: 他 4 名 Functional expression of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in human periodontal ligament fibroblasts and rat periodontal tissues. Cell Tissue Res., 査読有, Vol 340, 2010,

[図書] (計 4 件)

- 1: 吉成正雄 (共著), 学建書院, 新編歯科理工学 第4版 金属材料, 歯科用陶材, メタル・セラミックス, インプラント用材料, 2007, 306.
- 2: 井上 孝 (共著), 永末書店, 齶蝕学, チェアーサイドの予防と回復のプログラム, 2008, 256.
- 3: 井上 孝, 武田孝之, 南山堂, 口腔インプラントの常態と病態, 2008, 124.
- 4: 井上 孝, 松坂賢一, 矢島安朝, 武田孝之, デンタルダイヤモンド, インプラントのセーフティネット, 2009, 112

[学会発表] (計 65 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

[http://portal.tdc.ac.jp/\(English\)](http://portal.tdc.ac.jp/(English)),
Department of Clinical Pathophysiology)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 孝 (INOUE TAKASHI)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 20125008

(2) 研究分担者

芝 清隆 (SHIBA KIYOTAKA)
癌研究所蛋白創製研究部・部長
研究者番号: 40196415

(3) 連携研究者

吉成 正雄 (YOSHINARI MASAO)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 10085839

(4) 連携研究者

松坂 賢一 (MATSUZAKA KENICHI)
東京歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 70266568