

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22717

研究課題名（和文）バイオミネラル生成プロセスへの蛋白分解酵素の導入とエナメル質再生修復への応用

研究課題名（英文）Introduction of proteolytic enzyme into biomineralization process and its application to tooth enamel regeneration

研究代表者

谷本 幸太郎（Tanimoto, Kotaro）

広島大学・医系科学研究科（歯）・教授

研究者番号：20322240

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,600,000円

研究成果の概要（和文）：エナメル蛋白アメロゲニンを用いた結晶誘導をさらに継続できるかどうかを検証するために、HAP結晶誘導の阻害の原因と考えられる残留蛋白をMMP-20、KLK-4を用いて分解することとした。ナノスフィアを構成するrh174には、MMP-20による複数の分解箇所があり、分解により大小のフラグメントが形成される。そのうち、分解されないC-terminalドメインを含むフラグメントは成長中のHAP表面に残存するが、さらにKLK-4を作用させることにより、更なる分解が生じることが本実験により明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

初期う蝕や軽度のエナメル質形成不全に対して、生体のエナメル質形成過程を模した人為的なバイオミネラリゼーションを生じさせることにより、修復治療を達成することさせることが本研究の最終目標である。本研究では、持続的な結晶成長の阻害となる結晶表面の残存蛋白を分解酵素により除去し、新たな結晶誘導を生じさせるための分解条件を明らかにした。完全分解には2種類の酵素が必要であることが示されたことに学術的意義があると思われる。

研究成果の概要（英文）：We decided to use MMP-20 and KLK-4 to degrade residual proteins that are thought to be the cause of inhibition of HAP crystal induction using amelogenin, an enamel matrix protein, in order to verify whether crystal induction can be continued or not. The rh174 that constitutes the nanosphere has multiple recognition sites of MMP-20, and large and small fragments are formed by the degradation. Among them, the fragment containing the undegraded C-terminal domain remains on the growing HAP surface, but it was clarified by this experiment that further degradation occurs by further treatment with KLK-4.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：バイオミネラリゼーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カリエスは細菌感染症であり、原因菌が産生する酸による歯の溶解を特徴とする。したがって、原因菌を口腔内から完全に駆逐してしまうことも考えられるが、現実には非常に困難である。しかも、エナメル質は歯の表層にあって、生命維持にきわめて重要な咀嚼機能に影響するにもかかわらず、骨折が治癒するような自己修復機能が備わっていない。そのため、一度エナメル質が損傷してしまうと、人工材料で補修するしか方法がないのが学術的な現状である。金属や樹脂など多種多様な歯の人工修復材料が開発されてきたが、本研究技術は人工材料で補填するのではなく、これまで困難であったエナメル質の再生修復を可能とするまったく新しい治療法が必要である。

人体で最も硬い組織であるエナメル質の形成時には、エナメル芽細胞が産生する数種類のエナメル蛋白により、高度なハイドロキシアパタイト(HAP)結晶誘導制御(バイオミネラリゼーション)が行われる。

申請者は、エナメル質の形成過程の解明を目的として、本分野において先進的研究機関の一つである米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校(UCSF)との共同研究により機能解析を進めてきた。エナメル基質の90%以上を占め、HAP結晶生成の重要因子であるアメロゲンに着目し、ナノスフィア形成とHAPとの相互作用(Tanimoto K et al. J Dent Res 87(1): 39-44, 2008)を明らかにした。その後、MMP-20の酵素活性の検討(Tanimoto K et al. J Dent Res 87(5): 451-5, 2008)では、独自の環状ペプチドを用いた酵素活性計測法やSPRによる蛋白相互作用の検討を用いることにより、HAP表面に付着したナノスフィアが酵素による分解を受けにくくなる機構の一端が解明された。さらに、MMP-20とKLK4の協働によるHAP結晶表面ナノスフィアの分解機序が明らかとなったことから(Zhu L et al., Front Physiol 24(5): 268, 2014)、ナノスフィアによるHAP結晶誘導実験において、障害となっていた残留蛋白の処理法開発の端緒となった。申請者は、酸処理により作製したエナメル質の損傷部をバイオミネラリゼーションで再生修復する独自の方法を検討してきた(谷本幸太郎、エナメル質再生キット、特許第5757612号、2015)。しかし、アメロゲンの集合体であるナノスフィアで形成された空間が生成した結晶で満たされた時点で以降の結晶成長は抑制され、反応溶液を補充しただけでは結晶生成を継続できない欠点があり、実用化に至っていない。結晶誘導の限界は、これまでの方法にナノスフィアの分解過程が含まれていないことが原因であることから、本申請研究ではMMP-20とKLK4によるナノスフィア分解をバイオミネラリゼーションに取り入れ、実用に適したサイズのHAP結晶をエナメル質表面に誘導することを着想するに至った。

現段階では、エナメル質の損傷に対してのみ有効で、歯の深部まで進んだカリエスの治療には対応できないものの、カリエスが初期段階のうちに本治療を施せば、何度でも歯を元通りに再生し、より重篤なカリエスへの移行を効果的に阻止できることになる。また、酵素反応条件の改善や均一なナノスフィア形成、バイオミネラリゼーション反応を口腔内で安定的に維持するための器材の工夫など、将来の研究余地が多く残されており、今後のさらなる技術開発が期待される分野であると思われる。本研究構想は従来にない発想に基づき、患者負担が少なく効果的なカリエス治療法として一つの選択肢となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯の形成過程で出現する歯胚の内部環境を模倣することにより、エナメル質形成プロセスを再現し、これまで達成不可能であった臨床に応用できる十分なサイズのHAP結晶を生体内で構築する技術を開発することである。具体的には、エナメル蛋白であるアメロゲンの凝集体(ナノスフィア)を用いたHAP結晶誘導に2種類の分解酵素(MMP-20, Kallikrein related peptidase 4; KLK4)によ

るナノスフィア分解過程を統合したまったく新しいバイオミネラリゼーション法を確立する。蛋白分解過程を導入することにより、結晶構造内の残留蛋白を完全除去できることから、持続的に緻密な HAP 結晶生成が可能となる。本技術を用いて人工材料の充填を主体とした従来法とは概念の異なるカリエス治療法を確立する

そのために、本研究では、研究期間内に以下のことを明らかにする。

- 1) ナノスフィア形成および分解反応液の至適条件
- 2) バイオミネラリゼーションにおけるナノスフィア分解の効果
- 3) 生体内に適用した場合の有効性

3. 研究の方法

実験1 ナノスフィア形成および分解反応液の至適条件の検討

エナメル質形成機構の全貌は解明されていないが、アメロゲンinがミセル構造に集積したナノスフィアによりエナメル質の原型が作られ、その空間にカルシウムおよびリン酸イオンが集積することにより過飽和となって HAP 結晶誘導が生じると考えられる。ナノスフィア間隙が結晶で完全に飽和すると結晶成長は停止するため、分解酵素によりナノスフィアが一旦分解された後、次の結晶生成のために再びナノスフィアが集積すると推察される。そこで、本過程を再現するバイオミネラリゼーションプロトコル確立のため、反応溶液の至適条件の検討を行う。

1) ナノスフィア形成条件の検討

アメロゲニン、中性溶液中でナノスフィアを形成し、さらに高次構造を取り結晶形成の鋳型となる。ナノスフィア形成は蛋白濃度と反応液の温度、pH の影響を受ける。そこで、各種反応条件のナノスフィアの粒径分布や分散を動的光散乱法やゼータ電位測定により計測し、至適条件を明らかにする。

2) ナノスフィア分解条件の検討

エナメル基質中に存在するナノスフィア分解酵素には MMP-20 と KLK4 があるが、エナメル質形成における両者の役割の違いについては不明な点が多い。申請者は MMP-20、KLK4 いずれも単独では HAP 表面に吸着したナノスフィアを完全に分解することができず、結晶表面には分解途中の断片が多量に残留することを明らかにした。従来の HAP 結晶誘導法において、飽和により成長が停止した結晶を再び成長させることができなかった理由は、残留蛋白を完全に除去できなかったことによると考えられた。申請者は結晶表面のナノスフィアが MMP-20、KLK4 の順で作用させることにより完全に分解除去されることを見出した。しかし、各酵素の活性制御のための詳細な条件検討はなされていない。そこで、HAP 表面のナノスフィア分解のための MMP-20、KLK4 の至適濃度と作用時間を検討する。ナノスフィア分解様相の検討には Bradford 法と質量分析装置を用いる。

実験2 バイオミネラリゼーションにおけるナノスフィア分解の効果の検討

申請者は、これまでナノスフィアによる HAP 結晶誘導を検討してきたが、結晶反応はすぐに停止してしまい、数百 nm が限界であった。その原因と考えられる残留蛋白を MMP-20、KLK-4 を用いて分解することにより、結晶誘導をさらに継続できるかどうかを実験1で求めた至適条件を用いて検証する。

1) 抜去歯エナメル質表面におけるバイオミネラリゼーション

ナノスフィアを反応液に混合し、37℃で24時間反応させる。バイオミネラリゼーションの反応主体であるカルシウムおよびリン酸イオン濃度条件はエナメル基質に準じる。原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて HAP 結晶サイズを計測し、残留ナノスフィアを Bradford 法で定量、質量分析装置で特定する。

2) HAP 結晶誘導反応後に MMP-20 と KLK4 を反応させ、結晶周囲のナノスフィアを完全に分解除去する。AFM、Bradford 法、質量分析装置を用いて残留蛋白の評価を行う。

実験3 生体内に適用した場合の有効性の検討

ビーグル犬による実験的カリエモデルを用いて HAP 結晶成長誘導サイクルによるエナメル質再生効果を検証する。実験2で検証した方法が生体の口腔内環境においても再現できることを実証する。全身麻酔下で上顎切歯エナメル質表面にリン酸を用いた脱灰処理により擬似カリエスを作製し、脱着可能なポリカーボネート製カバーによりバイオミネラリゼーション反応が可能な閉鎖環境を構築する。24 時間後にカバーを外し、ナノスフィア分解処理を行った後、再び新たな反応液で 24 時間反応させる。本サイクルを複数回繰り返した後、歯を抜去し、HAP 結晶生成を AFM で評価する。

4 . 研究成果

初年度では、ナノスフィア形成および分解反応液の至適条件の検討を行った。エナメル質形成機構の全貌は解明されていないが、アメロゲニンがミセル構造に集積したナノスフィアによりエナメル質の原型が作られ、その空間にカルシウムおよびリン酸イオンが集積することにより過飽和となって HAP 結晶誘導が生じると考えられるため、ナノスフィアの形成とカルシウムおよびリン酸の濃度条件がきわめて重要となる。そこで、バイオミネラリゼーションプロトコール確立のため、反応溶液の至適条件の検討を行い、一定の条件を確立した。すなわち、完全長アメロゲニンを弱酸性条件で溶解したのち、中性まで pH を上昇させることにより、凝集を誘導し、ナノスフィアを形成させる。その後の Ca および P04 濃度条件を変えた検討では、それぞれの濃度の濃さおよび比率(Ca/P 比)が Ra 値に変化を及ぼすことが明らかとなった。最も Ra 値の低下が得られたのは、2 mM の Ca と 2 mM の P04(Ca/P 比 1.0)であった。Ca/P 比 1.0 を維持した場合、他の濃度条件でも低い Ra 値が見られたが、Ca 濃度がこれより高くても低くても Ra 値が上昇する傾向が認められた。また、Ca 濃度が高すぎると Ra 値に有意な変化が生じなくなる。また、Ca 濃度の限界値は、P04 濃度すなわち、Ca/P 比によっても変動する。Ca/P 比が 1.0 あるいは 0.5 であれば Ca 濃度 4 mM 以上では Ra 値は有意に変化しない。また、Ca/P 比が 0.25 であれば Ca 濃度 2 mM 以上では Ra 値は有意に変化しない。さらに、Ca/P 比が 0.125 になると、Ca 濃度 0.5 mM 以上で Ra 値は有意に変化しなくなることが明らかとなった。本研究成果は、2019 年 9 月 19 日に東京で開催された広島大学新技術説明会にて「エナメル質再生法の開発とアメロゲニンペプチド創薬の探索」と題した発表を行った。

次年度では、前年度の検討により、ナノスフィア形成および分解反応液の至適条件が示された。そこで、バイオミネラリゼーションにおけるナノスフィア分解の効果を検討した。これまでナノスフィアによる HAP 結晶誘導において、結晶生成は数百 nm が限界であった。結晶誘導をさらに継続できるかどうかを検証するために、HAP 結晶誘導の阻害の原因と考えられる残留蛋白を MMP-20, KLK-4 を用いて分解することとした。ナノスフィアを構成する rh174 には、MMP-20 による複数の分解箇所があり、分解により大小のフラグメントが形成される。そのうち、分解されない C-terminal ドメインを含むフラグメントは成長中の HAP 表面に残存するが、さらに KLK-4 を作用させることにより、更なる分解が生じることが本実験により明らかになった。

さらに、生体内に適用した場合の有効性の検討として、ビーグル犬による実験的カリエモデルを用いて HAP 結晶成長誘導サイクルによるエナメル質再生効果を検証した。HAP 結晶成長誘導後に酵素による分解を試み、残存するナノスフィアの分解が認められた。しかしながら、一定の分解がみられるものの完全な分解は困難であり、酵素処理前の歯面の洗浄や温度管理など考慮すべき課題があることが示された。

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 0件）

1. 著者名 國松 亮, 吉見友希, 谷本幸太郎	4. 巻 71
2. 論文標題 エナメル質再生法の開発とアメロゲニンペプチド創薬の探索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学工業	6. 最初と最後の頁 666-667
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 角 伊三武, 吉見友希, 國松 亮, 山田 桜, Cynthia CM., 岩井宏次, 谷本幸太郎
2. 発表標題 広島大学病院矯正歯科受診患者におけるカリエスリスク検査に関する調査
3. 学会等名 第63回中・四国矯正歯科学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ando K., Kunimatsu R., Yoshimi Y., Awada T., Tsuka Y., Sumi K., Abe T., Nakajima K., Tanimoto K.
2. 発表標題 Effects of Human Full-length Amelogenin and C-terminal Amelogenin Peptide on the Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue
3. 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress, The 12th Asian Pacific Orthodontic Congress, The 79th Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 国松 亮
2. 発表標題 エナメル質再生法の開発 とアメロゲニンペプチド創薬の探索
3. 学会等名 新技術説明会
4. 発表年 2019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
研究分担者	國松 亮 (KUNIMATSU RYO) (40580915)	広島大学・病院(歯)・講師 (15401)	
研究分担者	加藤 功一 (KATO KOICHI) (50283875)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授 (15401)	
研究分担者	廣瀬 尚人 (HIROSE NAOTO) (50611935)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教 (15401)	

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