

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 28 日現在

機関番号：32650

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659892

研究課題名（和文） 創製した人工ペプチドのバイオミネラル化能による挑戦的歯髄治療

研究課題名（英文） Dental Pulp treatment using artificial protein with biomineralization

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、ウ蝕や歯牙外傷を受け、歯牙硬組織が障害を受けた時に、患者の疼痛の問題から保存することが困難な歯髄を挑戦的方法を用いて保存することであった。なぜなら、従来行われている抜髄処置は、残髄、感染源、根充材などから2次的に根尖病巣を作る場合が多い。そこで本研究では、抜髄操作なしに歯髄をそのまま石灰化させ、新しい疾患を産ませないというコンセプトで始めた。そのために、歯髄の構成要素の大部分を占めるコラーゲン、神経線維および血管に結合しバイオミネラル化を起こすペプチドアプタマー（特定の分子と特異的に結合するペプチドなど）を創製し、歯髄内に投与することで、歯髄の生体内石灰化を促し目的を達成させようとした。我々は、チタンやジルコニアに指向性をもったアプタマー（特定の分子と特異的に結合する核酸分子やペプチド）の創製に成功し既に発表した（*Biomacromolecules*, 9: 3098-3105, 2008, *Dental Materials Journal* 30: 935-940, 2011）。またそれを応用した人工タンパクの応用に *in vivo* でも成功し誌上発表し受理された（*J Biomed. Materials. Res.* 2013 in press）。研究期間内には、コラーゲン、神経繊維、血管に結合するペプチドアプタマーを創製し、バイオミネラル化を起こすアプタマーを選定し、*in vitro* でその機能を確認した。さらに、*In vivo* における歯髄のバイオミネラル化を確認したが、ペプチドアプタマー複数存在し、最良のものを選定までは至らなかった。今後その選定と、臨床への応用を考えて研究を継続する予定である。

研究成果の概要（英文）：When the tooth received the obstacle owing to dental caries or externally caused injury, it was difficult to save the dental pulp tissue because of a patient's pain. However, dental-pulp-extraction disposal makes a peri-apical lesion such as radicular cyst in many cases. The purpose of this project was to make a pulp calcify itself. Therefore, the peptide aptamer (peptide specifically combined with a specific molecule) which starts biomineralization combines with the collagen which occupies most components of a pulp chamber, a nerve fiber, and a blood vessel. We tried to urge calcification of the pulp chamber in the living body. We already published the paper in which we develop the aptamer bind either titanium or zirconium, directivity

(Biomacromolecules, 9: 3098-3105, 2008, Dental Materials Journal 30: 935-940, 2011). Moreover, also by in vivo, the paper was received by J Biomed. Materials. Res. 2013. Within study duration, the peptide aptamer combined with collagen, a nerve fiber, and a blood vessel was invented, the aptamer which starts biomineralization was selected, and the function was checked by in vitro. Research is due to consider clinical application to be the selection and to be continued from now on.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：ペプチドアプタマー、バイオミネラリゼーション、歯髄、石灰化

1. 研究開始当初の背景

歯髄は、歯牙硬組織に閉じ込められた low compliance な膠様結合組織である。そのため、歯牙に、う蝕や外傷などの障害を受けると、炎症が起こり、その生体反応は、全て患者の疼痛という形で現れてくる。その為、障害歯髄を除去する様々な処置があるものの、成功立は決して高くなく、抜髄処置を施した場合には、治療後に根尖病巣を作ってしまうリスクを排除することはできなかった。そのリスクを減ずるために、四苦八苦してきたのが事実である。数年前より、財団法人癌研究会蛋白創製研部長の芝清隆先生と共同で研究を始め（井上、橋本、國分）、人工タンパクの応用ができないかと言うことで、相談し連携研究者となつて頂き、本プロジェクトを考案した。橋本、國分も協力を仰いだ。

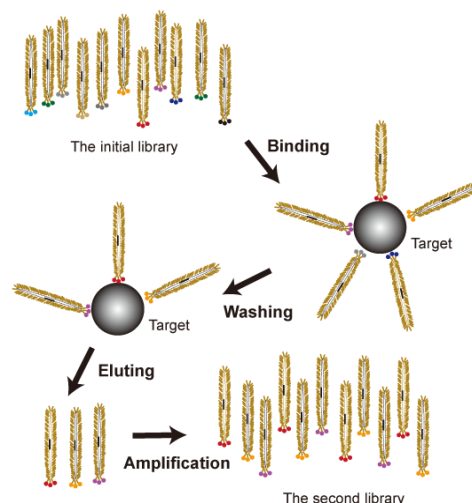
2. 研究の目的

上記のような背景を受け、歯髄は象牙質を作るといふ機能を持つことから、障害を受けた歯髄を全て石灰化させてしまえばという化説から、歯髄の構成要素である、コラーゲン、血管、神経などと特異的に付くペプチドアプタマーを選定し、かつそれが自ら石灰化を起こせば、歯髄自体全体が石灰化し、自然な根充が完成すると考えた。つまり、本研究の目的はこれらのアプタマーを見つけ、生体応用を可能にすることである。

3. 研究の方法

歯髄の構成組織に結合するペプチドアプタマーをファージディスプレイ法により検索、創製し、その中でもバイオミネラリゼーション能の高いものを選び、歯髄に応用し生体内石灰化を実現させた。平成 22 年には、ビーグル犬より、臍や太い神経、血管を採取し、

それらの組織に結合するペプチドを検索し、その中で最も結合力の強いものをスクリーニングする。同時に歯髄よりコラーゲン線維、神経線維、血管を分離することを試み、同様に結合するペプチドを検索した。その中で、体液に近いリン酸カルシウムを添加した人工体液中でバイオミネラリゼーション能の高いものをスクリーニングする。平成 23 年には、スクリーニングされたバイオミネラリゼーション能を持つ組織結合ペプチドの機能を in vivo の動物実験において検討した。その後は、トランスレーショナルリサーチを念頭に、実際の臨床への応用計画を立案した。

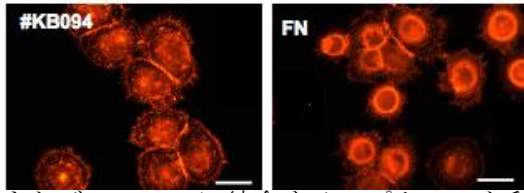


ファージディスプレイ法を示すイラスト。

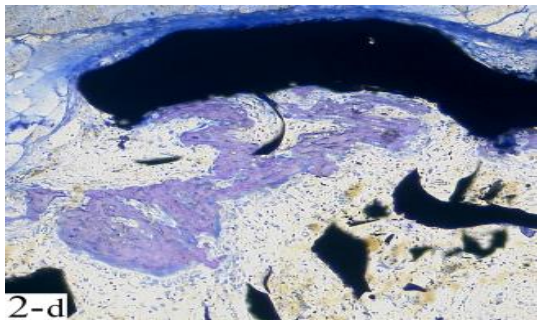
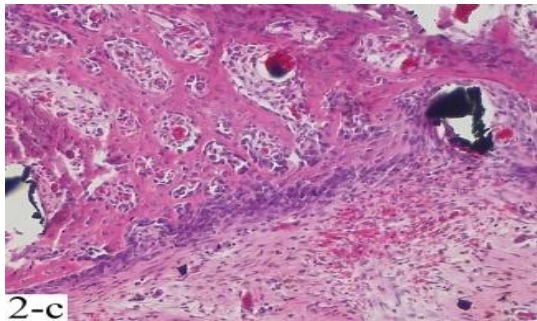
4. 研究成果

コラーゲン、神経、血管に特異的に結合するアプタマーは、ファージディスプレイ法により選定したが、複数存在しているため、再良の物を選び出す必要性が残っている。

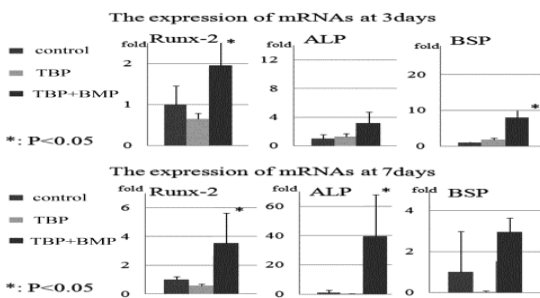
予備として、先に発見した、チタンと細胞接着蛋白を含む人工タンパク質は、in vitroにおいて、有意に細胞伸展を示した。



またジルコニアに結合するアプタマーを利用し、骨誘導蛋白 (BMP2) を含む人工タンパクを生体内で応用したところ、骨と軟骨の誘導に成功した。(黒い部分がチタン)



また、この周囲組織を遺伝子学的にも有意な差を持って骨関連蛋白の発現が見られた。



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 3 件)

(1) Kazuaki Yuasa, Eitoyo Kokubu, Katsutoshi Kokubun, Kenichi Matsuzaka, Kiyotaka Shiba, Kenji Kashiwagi, Takashi

INOUE. An artificial fusion protein between bone morphogenetic protein 2 and titanium-binding peptide is functional in vivo. J. Biomed Mater. Res. 2013, in press.

(2) Kazuhiko Hashimoto, Masao Yoshinari, Kenichi Matsuzaka, Kiyotaka Shiba, Takashi Inoue, Identification of peptide motif that binds to the surface of zirconia Dental Materials Journal 30: 935-940, 2011.

(3) Kobayashi, M., Tomita, S., Sawada, K., Shiba, K., Yanagi, H., Yamashita, I., & Uraoka, Y. Chiral meta-molecules consisting of gold nanoparticles and genetically engineered tobacco mosaic virus. Optics express 20(22), 24856-24863 (2012).

〔学会発表〕 (計 4 件)

(1) Kazuhiko Hashimoto, Masao Yoshinari, Fumitaka Kobayashi, Yukihiro Takeda, Kei Nakajima, Katsutoshi Kokubun, Satoshi Murakami, Kenichi Matsuzaka, Takashi Inoue, Identification of zirconia binding peptide using phage display. Sino-Japan Dental Conference, 2012

(2) 國分 克寿, 吉成 正雄, 芝 清隆, 井上 孝, ナ材料・人工タンパク質を利用した即時荷重インプラントの最適化日歯医師会誌 65(5), 131, 2012. (第 22 回日本歯科医学会総会,)

(3) 吉成正雄, 井上 孝, 矢島 安朝, 佐藤 亨, 加藤 哲男, 関根 秀志, 松坂 賢一, 三浦 直, 齋藤 健介, 本間 慎也, 佐々木 穂高, 高野 智史, 橋本 和彦, 田辺 耕士, 江川 昌宏, 小山 拓, 渡邊 浩章, 伊藤 寛史, 飯島 俊彦, 小船 和弘, 金子 創, 高機能ゾルコニアインプラントシステムの開発, 日歯医師会誌 65(5), 142, 2012. (第 22 回日本歯科医学会総会)

(4) 松坂 賢一, 国分 栄仁, 國分 克寿, 井上 孝, 口腔アンチエイジングからの生体制御, 日歯医師会誌 65(5), 151, 2012. (第 22 回日本歯科医学会総会)

〔図書〕（計3件）

(1) 井上 孝、武田孝之共著

創傷の治癒、-歯髄・歯根膜・歯槽骨・歯肉
そしてインプラントを病態論から解明する
一医歯薬出版株式会社、p1-p249, 2013

(2) 井上 孝:著分担

インプラント安心基準マシヤ認定基本テキスト
第2章インプラント治療に求められる安全・安心,
株式会社自由工房, 22-84, 2012

(3) 井上 孝:著分担

第2版 よくわかる口腔インプラント学
Ⅲ組織学(骨・軟骨), 医歯薬出版株式会社,
50-60, 2011.

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

特願 2012-093982

【発明の名称】『FZD10 結合性ペプチド』

【特許権者】HOYA 株式会社/公益法人がん研
究会

【発明者】飯森祐介

【発明者】山形瑞恵

【発明者】塩野智隆

【発明者】芝清隆

【出願番号】特願 2012-093982

【出願日】2012年(平成24年)4月17日

特許 2012-203464

【発明の名称】『E p C A Mに結合するペ
プチド』

【特許権者】公益法人がん研究会

【代理人】創成国際特許事務所

【発明者】芝清隆

【発明者】國分克寿

【発明者】菅加奈子

【出願番号】特願 2012-203464

【出願日】2012年(平成24年)9月14日

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 孝 (いのうえ たかし)

研究者番号: 20125008

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

芝 清隆 (しば きよたか)

研究者番号: 40196415