

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390468

研究課題名(和文)セメント質・歯根膜複合体再生を目指した人工タンパクの開発

研究課題名(英文)Development of artificial protein for cementum-periodontal ligament complex

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：今回の実験に当たり、象牙質並びにセメント質に結合するペプチドアプタマーを選定し、生化学的検証を行った。本研究の目的達成の予備実験的に、チタン結合アプタマーとBMPにの融合より人工タンパクを作製し、筋肉内に移植したところ、筋肉内において軟骨性仮骨形成を認め、RT-PCR法により3日目から骨関連タンパク質のmRNA発現を確認した。精製は不十分なが象牙質およびセメント質に結合するペプチドアプタマーとBMPの融合タンパクを用い、予備実験と同様の研究を行ったところ、わずかながら骨関連タンパクの上昇を認めた(未発表)。

研究成果の概要(英文)：Peptide aptamer which combines in dentin and cementum were selected and biochemistry-like inspection was performed. As pilot study, artificial protein which consist of titanium binding aptamer and BMP has been just transplanted in the muscle. Both cartilage and bone like tissues were admitted and the expression of bone related protein mRNA was confirmed from the 3rd day by RT-PCR method. Although the refinement was insufficient, when it was studied just same as a pilot study using fused protein of peptide aptamar which combines in dentin and cementum and BMP, slight expression of bone related protein was admitted (un published data).

研究分野：実験病理学

キーワード：人工タンパク 象牙質質 セメント質 歯根膜細胞 再生 増殖因子 骨関連タンパク 歯周治療

## 1. 研究開始当初の背景

歯周組織の再生の目的は、失われた歯槽骨を再生させることは勿論のこと、歯周治療により除去された感染セメント質下の露出した象牙質表面に新生セメント質を沈着させ、再生した歯槽骨と新生したセメント質の間に機能性歯根膜組織を作ることである。しかし、従来の研究では、治療後に長い付着上皮の形成されたり、歯根膜の完全再生を成し遂げるには至らなかった。仮に歯根膜様の構造ができて、マラッセの上皮残遺がないために、アンキローシスに陥ることも報告されてきた。

つまり、セメント質 歯根膜 歯槽骨の関係を完成させて、初めて歯周組織の再生と言えるわけだが、実現するには至らなかった。我々はこの関係を、セメント質・歯根膜複合体と称し、人工タンパクによるその再生を目指してきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、歯根膜の再生と分化の解明として、「歯根膜細胞は骨原性線維芽細胞で、創傷時セメント質を形成し、その恒常性はマラッセの上皮残遺により維持される」ことを報告してきた (*J Jpn J Oral Biol*, 37:58-69,1995. *Anat Embryol*, 206:13-20,2002,*J Periodont Res*, 41:280-287,2006. *Cell Tissue Res*. 342:221-231,2010) 一方、最近では無機質と細胞を仲介する人工タンパクの創製に成功した (*Biomacromolecules* 9:3098-3105,2008, *Dental Material J*. 2011 in press)。本研究課題では、前述の2つのテーマ( )に基づき、治療システム開発に向けた基盤エビデンスの構築を目的とする。その内容としては、  
1) セメント質と歯根膜細胞を仲介する人工タンパクの創製、および2) セメント質・歯根膜複合体誘導システムの開発

を推進することである。

## 3. 研究の方法

平成 24 年度

象牙質片とセメント質片を人およびビーグル犬の抜去歯牙から作製する。その後、ペプチド・ファージ・ライブラリーを用いて、標的分子(象牙質・セメント質)に特異的に結合するアミノ酸配列を提示するファージを単離・回収する。ペプチドのアミノ酸配列の情報は、DNA 情報としてファージゲノムに保存されており、ファージゲノムからペプチドのアミノ酸配列をシーケンスすることができ、このアミノ酸配列を用い象牙質およびセメント質結合ペプチドを作製する。

平成 25 年度

平成 24 年度に作製スクリーニングされた、硬組織結合ペプチドに分化・増殖因子(BMP など)を結合させ人工タンパク質を創製する。創製した人工タンパク質が *in vitro* において、ビーグル犬より得られた培養歯根膜細胞を用いて生化学的、形態学的に確認する。培養後経時的に、走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡などにより形態学的に観察する。ついで、RT-PCR により mRNA レベルの発現を検討する。BMP を付けた人工タンパクにおいては、ビーグル犬の筋肉組織、皮下結合組織、歯根膜組織などが、内軟骨仮骨を起すかを検討する。

平成 26 年度

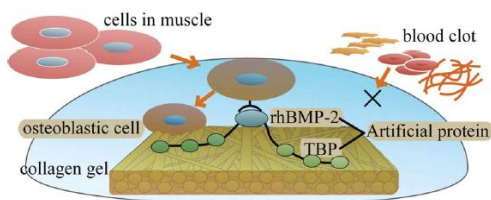
平成 25 年度に *in vitro* にて確認した人工タンパクの機能発現をビーグル犬において、*in vivo* の発現があるか検討する。具体的には、静脈麻酔下において、ビーグル成犬の片側の上下前歯、前臼歯の歯肉を開き(フラップ形成)し、歯根面を露出させ歯根膜組織のみを除去した群(セメント

質群)とセメント質を除去し人工的に象牙質が露出する群(象牙質群)を作製する。創製された人工タンパク溶液を塗布する(培養条件に則る)。対照群は、何も塗布しない物、とセメント質結合ペプチドまたは象牙質結合ペプチドのみを塗布したものとす。塗布後には GTR 膜を応用し歯肉組織の侵入を避けフラップを戻し縫合閉鎖する。経時的に組織学的、SEM,TEM,RT-PCR,生体染色,共焦点レーザー顕微鏡で再生状態を確認する。トランスレーショナルリサーチの実現に向け検討を行い、臨床応用へつなげる準備に入る。

#### 4. 研究成果

今回の実験に当たり、先にジルコニアに結合するペプチドアプタマーの選定に成功しており(K.Hashimoto,*Dental Material J.* 2011)。本研究においても、同様の方法を用いて、象牙質並びにセメント質に結合するペプチドアプタマーを選定した。その後、これらのアプタマーに対する生化学的検証を行ったが、初年度では、十分に精製されたものは獲得できなかった。

本研究の目的達成の予備実験的に、チタンに結合するペプチドアプタマー応用実験 K.Kokubun,*Biomacromolecules*, 9: 3098 - 3105, 2008 に習って、チタン結合アプタマーと BMP にの融合より人工タンパクを作製し、筋肉内に移植したところ、筋肉内において、7日目に軟骨性仮骨形成を認め、RT-PCR 法により3日目から骨関連タンパク質の mRNA 発現を確認し、論文発表した(Yuasa, *J Biomed Material Res.* 図)



実際に精製は不十分ながら、予備実験と同

様の研究を行ったところ、わずかながら骨関連タンパクの上昇を認めたが、データとして十分なものではなかった。

最終的に in vivo における実験に着手し、動物の顎骨内における人工タンパクの応用を試みたが、未だ継続中である。

#### 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13件)

1. Kimura Y., Matsuzaka K., Yoshinari M., Inoue T.  
Initial attachment of human oral keratinocytes cultured on zirconia or titanium  
*Dent Mater J* 31(3), 346-353, 2012.
2. Hara T., Matsuoka K., Matsuzaka K., Yoshinari M., Inoue T.  
Effect of surface roughness of titanium dental implant placed under periosteum on gene expression of bone morphogenic markers in rat  
*Bull Tokyo Dent Coll* 53(2), 45-50, 2012.
3. JC Hung, Kokubu E., Matsuzaka K., Inoue T.  
Formation of gap junctions and expression of connexin 43 in cultured malassez's epithelial rest cells  
*Clinical Dentistry and Research* 36(2), 3-9, 2012.
4. Matsuzaka K., Kokubu E., Inoue T.  
The effects of epithelial rests of malassez cells on periodontal ligament fibroblasts against centrifugal forces *in vitro*  
*J Oral Maxillofac Surg*, 46(1), 30-39, 2013.
5. Matsuoka K., Matsuzaka K., Yoshinari M., Inoue T.

- Tenascin-C promotes differentiation of rat dental pulp cells *in vitro*  
Int Endod J 46(1), 30-39, 2013.
6. Khan SZ., Sasaki N., Sasaki N., Sasaki K., Matsuzaka K., Inoue T.  
Detection of predominant subgingival periopathogens around submerged and non-submerged hydroxy-apatite implants.  
Journal of Dental Implants 3(2), 111, 2013.
- 7. Chowdhury, M.M., Danoy, M., Rahman, F., Shinohara, M., Kaneda, S., Shiba, K., Fujita, N., Fujii, T., Sakai, Y. Adhesion of pancreatic cancer cells in a liver-microvasculature mimicking co-culture correlates with their propensity to form liver-specific metastasis in vivo. Biomed Res Int in press (2014)**
8. Matsumura, S., Yuge, R., Sato, S., Tomida, A., Ichihashi, T., Irie, H., Iijima, S., Shiba, K., & Yudasaka, M. **Ultrastructural localization of intravenously injected carbon nanohorns in tumor. Int J Nanomedicine in press (2014)**
9. Yuasa K., Kokubu E., Kokubun K., Matsuzaka K., Shiba K., Kashiwagi K., Inoue T. An artificial fusion protein between bone morphogenetic protein 2 and titanium binding peptide is functional in vivo. Journal of Biomedical Materials Research Part A 102(4), 1180-1186, 2014.
10. Kenmotsu M., Matsuzaka K., Inoue T.  
Angioleiomyoma of the lower lip: Report of a case and review of the literature.  
Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology 26(2), 252-254, 2014.
11. Kokubu E., Kokubun K., Matsuzaka K., Kashiwagi K., Shiba K., Inoue T.  
Ishihara K., Yoshinari M.  
The effect of artificial recombinant bone morphogenetic protein 2 with titanium-binding peptide on a Ti graft in vivo.  
Journal of Oral Tissue Engineering, 12(1), 1-7, 2014.
11. Matsuzaka K., Kokubu E., Inoue T.  
Effect of epithelial rests of Malassez'cells on RANKL mRNA expression and ALP activity by periodontal ligament fibroblasts stimulated with sonicated Porphyromonas gingivalis in vitro.  
Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 26(4), 554-557, 2014.
12. Soejima Y., Matsuzaka K., Kokubun K., Kaketa A., Inoue T.  
Analysis of bone marrow stem and SP cells derived from the femur, humerus and ilium of aged and young rats.  
Journal of Japanese Society for Evidence and Dental Professional 6(1), 58-65, 2014.
13. Oshima M., Inoue K., Nakajima K., Tachikawa T., Yamazaki H., Isobe T., Sugawara A., Ogawa M., Tanaka C., Saito M., Kasugai S., Takano-Yamamoto T., Inoue T., Tezuka K., Kuboki T., Yamaguchi A., Tsuji T.  
**Functional tooth restoration by next-generation bio-hybrid implant as a bio-hybrid artificial organ replacement therapy.**  
Sci. Rep 4, 1-10, 2014.
- [学会発表](計10件)
1. Hashimoto K., Yoshinari M., Kobayashi F., Takeda Y., Nakajima K., Kokubun K., Murakami S., Matsuzaka K., Inoue T.  
Identification of zirconia binding peptide

- using phage display program, 18, 2012.  
(2012 Sino-Japan Dental Conference, 成都市, 中国)
2. 國分克寿, 吉成正雄, 芝清隆, 井上 孝  
ナ材料・人工ナハ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, 大阪市)
  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, 小舩 和弘, 金  
子 創  
高機能ゾル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, 大阪市)
  4. 中島啓, 大島正充, 山崎大道, 井上香  
織, 小川美帆, 菅原彩香, 春日井昇平,  
山本照子, 井上孝, 齋藤正寛, 辻孝  
歯周組織を有する次世代型機能性イン  
プラントの開発  
日本再生歯科医学会誌, 10, p61.  
第 10 回日本再生歯科医学会学術大会,  
2012 年 9 月 1-2 日, ニチイ学館神戸ポ  
ートアイランドセンター, 神戸市
  5. Nakajima K., Oshima M., Sugawara  
A., Ogawa M., Kasugai S., Yamamoto  
T.T., Inoue T., Saito M., Tsuji T.  
Development of a fully functioning  
dental implant formed periodontal  
tissue  
program, 2013.  
91<sup>st</sup> General Session & Exhibition of  
the IADR, Seattle, Washington, USA.
  6. 大島正充, 中島啓, 井上香織, 小川美帆,  
山本照子, 井上孝, 磯邊友秀, 立川哲彦,  
春日井昇平, 齋藤正寛, 辻孝  
歯周組織を有する新規機能性インプ  
ラントの開発  
日本補綴歯科学会誌 5(122 回特別号),  
pp111.  
日本補綴歯科学会第 122 回学術大会,  
2013 年 5 月 18-19 日, 福岡国際会議場,  
福岡市
  7. 井上 孝  
Surface modification of dental  
implant improves implant-tissue  
interface  
第 5 回インターフェイス口腔健康科学  
国際シンポジウム 生物 非生物イン  
テリジェント・インターフェイス国際  
シンポジウム  
2014 年 1 月 20-21 日 東北大学片平さ  
くらホール 仙台市
  8. Inoue T.  
Surface modification of dental  
implant was made possible to create  
functional periodontal tissues and  
tooth regeneration using embryonic  
cells  
The Research Center for Tooth &  
Periodontal Regeneration The 2<sup>nd</sup>  
international Symposium “Molecular  
and Therapeutic approach for Tooth  
and Periodontal Disease”  
2014 年 2 月 13 日 School of Dentistry,  
Kyng Hee University 韓国、ソウル
  9. Oshima M., Inoue K., Nakajima K.,  
Tachikawa T., Yamazaki H., Isobe T.,  
Sugawara A., Ogawa M., Tanaka C., Saito  
M., Kasugai S., Takano-Yamamoto T.,  
Inoue T., Tezuka K., Kuboki T., Yamaguchi  
A., Tsuji T.  
Functional tooth restoration by next-gen  
eration bio-hybrid implant.  
62<sup>nd</sup> Annual Meeting of Japanese  
Association for Dental Research Program

and abstracts of papers, pp81.

62nd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, December 4-5, 2014, Osaka

10. 井上 孝

骨再生のマイクロコスモス

第5回学術大会・総会プログラム抄録集, p24-25, 2015.

2015年3月29日, バイオインテグレーション学会 第5回学術大会・総会, 国際医療福祉大学大学院東京青山キャンパス, 東京都港区

〔図書〕(計1件)

1. Inoue T., Matsuzaka, K. 著分担

Surface Modification of Dental Implant Improves Implant-Tissue Interface. pp33-44. In Interface Oral Health Science 2014. Springer Open

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称: FZD10 結合性ペプチド

発明者: 飯森祐介、山形瑞恵、塩野智隆、芝清隆

権利者: HOYA 株式会社/公益法人がん研究会

種類: 特願

番号: [2012 - 093982](#)

出願年月日: 2012年4月17日

国内外の別: 国内

名称: E p C A Mに結合するペプチド

発明者: 芝清隆、國分克寿、菅加奈子

権利者: 公益法人がん研究会

種類: 特願

番号: [2012-203464](#)

出願年月日: 2012年9月14日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tdc.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者: 井上 孝 (Takashi INOUE)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 20125003

(2)研究分担者: 芝 清隆 (Kiyotaka Shiba)

公益財団法人がん研究会・がん研究所蛋白創製研究部・部長

研究者番号: 40196415

研究分担者: 松坂賢一 (Kenichi Matsuzaka)

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号: 70266563

(3)連携研究者(0)