

令和元年5月18日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05518

研究課題名(和文) スマートナノバイオマテリアルの開発と口腔領域における臨床応用への展開

研究課題名(英文) Development of smart nano-biomaterials and investigation of possibility on their clinical application for dentistry

研究代表者

横山 敦郎 (Yokoyama, Atsuro)

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：20210627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、カーボンナノマテリアル(CNMs)の臨床応用を視野に、カーボンナノホーン(CNHs)の生体内分解性の観察を行い、CNHsへの抗生剤(ミノサイクリン)やグロースファクター(骨形成タンパク)の担持ならびに徐放性制御とその効果を確認した。さらに、CNHsを表面に修飾したチタンを開発した。また、局所に埋入したカーボンナノチューブ(CNTs)の体内動態を追跡し、そのほとんどが局所に留まることを明らかにした。以上の結果、使用用途に応じて多機能化したスマートナノバイオマテリアルの創製と口腔領域への応用の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内分解性と多機能性を有するスマートナノバイオマテリアルの創製により、例えば、インプラント臨床において最も重要な課題であるインプラント周囲の早期の骨形成とオッセオインテグレーションの早期確立、さらにはインプラント周囲炎に対する治療としての骨再生が可能となり、安全で安心なインプラント治療の確立に貢献するのみならず、骨代謝機能の低下した高齢者や有病者に大きな福音をもたらすことが期待できる。また、ナノマテリアルを用いた生体材料の開発を目的とした一貫した研究は、広く再生療法に寄与するとともに、ナノ物質のバイオ領域への応用といった新しい研究、産業の発展に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to provide the carbon nanomaterials (CNMs) for clinical application of the dentistry, we observe the biodegradability of carbon nanohorns (CNHs) and modify antibiotics (minocycline) and growth factors (bone morphogenetic proteins) to CNHs. The control of sustained release by LED irradiation of them and their effects were confirmed. Furthermore, we developed titanium with CNHs modified on the surface. We also observed in vivo kinetics of carbon nanotubes (CNTs) locally implanted in mice and suggested that CNTs remain at the site of implantation and do not accumulate in detectable quantities in other organs. These proof-of-concepts will promote future studies on the application of CNMs as smart Nano-Biomaterials which are multifunctionalized for the dentistry.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：カーボンナノ物質 スマートナノバイオマテリアル カーボンナノホーン 薬剤担持 デンタルインプラント 骨形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カーボンナノチューブ(CNTs)に代表されるカーボンナノマテリアル(CNMs)は、炭素原子のみから構成される新素材であり、その特性を利用して、様々な材料・製品へ応用が進められている。医学領域への応用についても研究が進められているが、生体材料、特に再生医療への応用に関する研究は、漸く端緒についたばかりである。我々は、2003年よりCNMsの生体材料への応用を目的に基礎研究を行い、細胞毒性が低く、生体内での起炎性が低いこと、長期埋入後も発ガンや強い炎症などの問題を生じないこと、骨芽細胞が強固にCNTsに結合するといったCNMsの生物学的特性を明らかにし、この生物学的特性を活かして骨芽細胞培養用スキャホールドの開発や培養用ディッシュの製品化、Guided Bone Regeneration(GBR)用膜への応用、ポリ乳酸への表面処理、チタンへの表面修飾、FGFによる修飾について報告してきた。これらの基礎的研究成果により、CNMsを用いた有機ならびに金属材料に対する表面処理は、骨形成を促進し、骨再生を目的とした生体材料としての可能性が示された。しかし臨床応用への展開を考えた場合、単純なCNMsの表面修飾や複合では十分とは言い難く、例えばインプラント周囲炎に対する骨再生、デンタルインプラントへの表面修飾、骨造成のためのGBR膜など目的に応じた生体材料への応用には、CNMsの生体内分解性を制御するとともに、複数の薬剤やグロースファクターを担持し、その徐放性をコントロールすることが必須であると考えた。即ち、使用用途に応じた機能を持つスマートナノバイオマテリアルを創製し、その効果と生体内での分解代謝を含めた安全性を検討するという考えに至った。

2. 研究の目的

本研究においては、以下の4点を目的とした。

- (1) CNMs、特にカーボンナノホーン(CNHs)の生体内分解性の制御とその確認
CNHsの酸化より分解性の変化を確認する。
- (2) CNMsへの薬剤、タンパクの担持と徐放性の制御
抗生剤や骨成長因子のCNMsに担持させ徐放性を制御する。
- (3) スマートナノバイオマテリアルの創製
(1) および(2)で作製したCNMsを用いて、コラーゲンと複合した骨再生用ゲルやチタン表面修飾を行ったデンタルインプラント、GBR膜等のスマートナノバイオマテリアルを創製し、*in vitro*ならびに*in vivo*において評価する。
- (4) スマートナノバイオマテリアルの有効性と安全性の確認
CNMsの生体内での臓器移行と体外への排出を検討する。

3. 研究の方法

- (1) CNMs、特にカーボンナノホーン(CNHs)の生体内分解性の制御とその確認
CNHsを550、575で大気酸化したものを(それぞれCNHox550, CNHox575)を、コラーゲンゲルと混和して、ラット皮下に埋入した。埋入7日後に埋入部位を周囲組織ごとサンプリングし、細胞内のCNHsを透過型電子顕微鏡(TEM)により観察した。
- (2) CNMsへの薬剤ならびにタンパクの担持と徐放性の制御
CNHsのミノサイクリン(MC)担持による静菌性の付与と徐放性の制御
MCを未処理のCNHs(As-CNHs)、CNHox550、CNHox575と混和して、MCを担持したCNHs(MC/CNHs)を作成した。熱重量解析によりMCとCNHsの吸着を確認し、吸光度測定にてMC/CNHs中のMCの吸着について比較した。MC/CNHsを添加した培地で*Actinobacillus actinomycetemcomitans*(Aa)菌を培養し、細菌増殖抑制効果を確認した。さらに、MC/CNHox550を混和した培地に、近赤外光(850nm)を照射し、550nmの吸光度によってMCの徐放量を比較した。
CNHsの骨形成タンパク(Bone Morphogenetic Protein; BMP)の担持
BMPとCNHox550を混和してBMP/CNHを作成し、培地に添加してマウス骨芽細胞(MC3T3-E1)を培養した。培養7日後にALP活性/DNA量を測定した。
- (3) CNH/ANTiの創製と*in vitro*および*in vivo*での評価
泳動電着法により陽極酸化チタン(ANTi)表面にCNHsを吸着させたCNH/ANTiを作成した。CNH/ANTiディスク上で骨芽細胞様細胞Saos2を培養し、走査型電子顕微鏡(SEM)観察を行い、ALP活性を測定した。また、CNH/ANTiワイヤーをラット大腿骨に埋入し、周囲組織の反応と骨形成について光学顕微鏡にて観察するとともに、新生骨付近の細胞とCNHsについてTEM観察を行った。
- (4) SWNTの体内動態の観察
生体透過性が高く生体イメージングに適した近赤外(NIR)光の波長域である1000-1300nmにおいて蛍光を発する単層カーボンナノチューブ(SWNT)をコラーゲンゲルと混和し、マウス頭蓋部骨膜下組織に埋入した。全身の発光を56日後まで観察し、SWNTの分布を検索した。また、近赤外顕微鏡を使用して、各臓器の発光強度を測定するとともに、埋入部位の組織をTEM観察した。

4. 研究成果

(1) CNMs、特にカーボンナノホーン(CNHs)の生体内分解性の制御とその確認

ラット皮下埋入7日後の組織TEM像を図1に示す。As-CNHs (図1a, d)、CNHox550 (図1b, e)、CNHox575 (図1c, f)は、酸化度が異なるため、CNHsの構造がそれぞれ異なっているが、埋入7日後では構造の変化は見られなかった。また、As-CNHは酸化CNHsと比較して細胞内で凝集している状態がみられた。今後は長期埋入後の観察を行い、CNHsの構造の変化を検索する予定である。

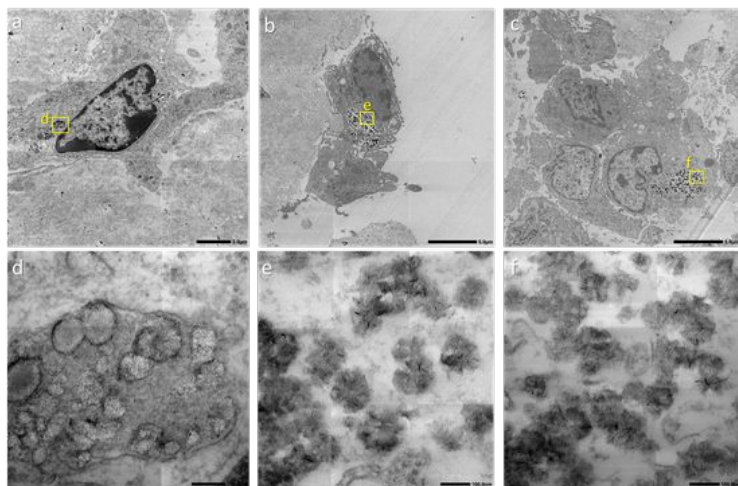


図1. ラット皮下埋入7日後の周囲組織のTEM観察像。
a. As-grown CNHs,
b. CNHox550,
c. CNHox575,
d. aの拡大像、
e. bの拡大像、
f. cの拡大像

(2) CNHsへの薬剤、タンパクの担持と徐放性の制御

CNHsのミノサイクリン(MC)担持による静菌性の付与と徐放性の制御
CNHsの分散性はMC水溶液と混和することで向上した。吸光度測定と熱重量解析の結果、CNHsに吸着するMCの存在が確認され、処理方法にて吸着に差異が認められた。

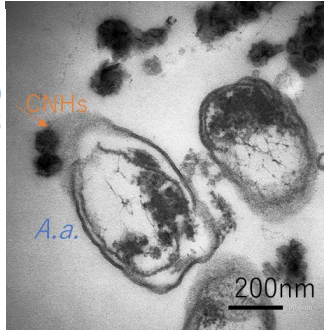
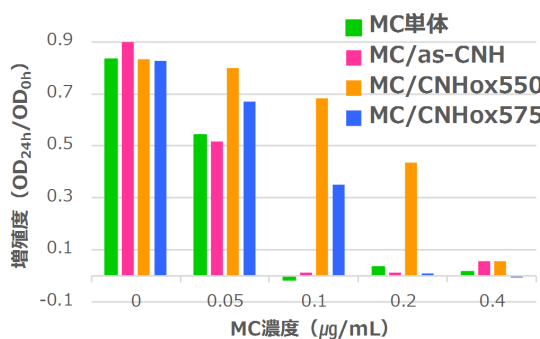
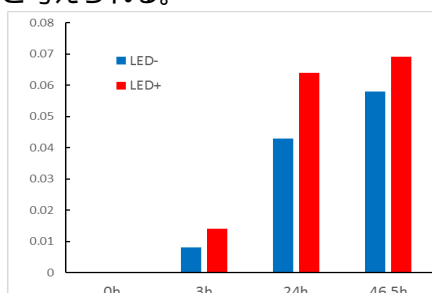


図2.
a: 各 MC/CNHsを混和した培地でのAa菌の増殖度
b: MC/CNHox550と培養したAa菌のTEM像

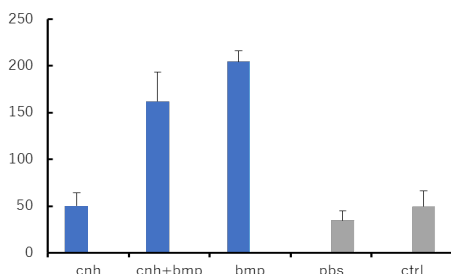
図2aで示すように、MC/as-CNHはMC単体と同等の細菌増殖抑制効果を示すのに対し、MC/CNHox575・550の順に効果は減弱した。細菌培養後のTEM観察像(図2b)より、細菌周囲にCNHsが存在していたことから、MC/CNHs表面のMCが静菌効果を示したと考えられる。



また、図3で示すように、LEDを照射した後のMC/CNHからのMC徐放量を測定したところ、照射無しと比較して、3時間後より徐放量が増加し、24時間後には30%以上徐放量が増加した。波長や照射時間を変化させることによって徐放量がコントロールできることが示唆された。

図3. MC/CNHのLED照射無(青)、照射有(赤)におけるMC徐放量(350nm吸光度)

CNHsの骨形成タンパク(Bone Morphogenetic Protein; BMP)の担持
CNH/BMP存在下で培養したMC3T3E1細胞の7日目のALP/DNAを比較した(図4)。



CNHs単独ではALP/DNAの増加はみられなかったが、BMP/CNHでは、ALP/DNAの増加がみられBMPと同等の効果を示した。

図4. MC3T3E1細胞培養7日後のALP/DNA

(3) CNH 担持陽極酸化チタンの創製と *in vitro* および *in vivo* での評価

7日間培養後の Saos2 の SEM 像(図 5)では CNH/AnTi 上で良好に細胞が付着しており、細胞の仮足は CNHs に直接接して伸展していた。 AnTi と比較して、CNH/AnTi に付着した細胞の DNA 量は有意に高く($p < 0.01$)、ALP 活性は有意差が認められなかった($p > 0.01$)。これにより、CNH/AnTi 上では細胞の増殖が促進され、分化には影響を与えないことが示された。

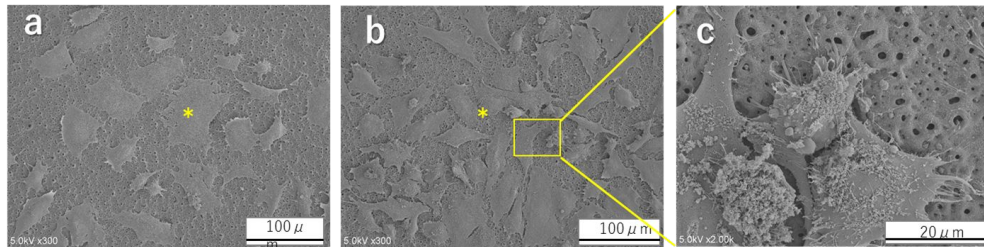


図 5 . Saos2 培養 24 時間後の SEM 像

AnTi および CNH/AnTi ワイヤを大腿骨に埋入した 7 日後の光学顕微鏡観察では、Ti 周囲に骨芽細胞が整列し幼若な新生骨組織が観察された(図 6a)。また、新生骨の一部は直接 Ti に付着しており、CNH/AnTi の骨接触率(BCR)は、AnTi と比較して有意に高かった($p < 0.05$) (図 6b)。埋入 28 日後では、7 日後と比較して、両サンプルとも Ti 周囲に形成された骨量は増加していた。また、新生骨上に観察された CNHs を TEM により観察したところ、一部が骨基質と接して存在していることが確認された(図 6c, d)。以上の結果から、CNHs は骨組織との適合性を有することが明らかになった。

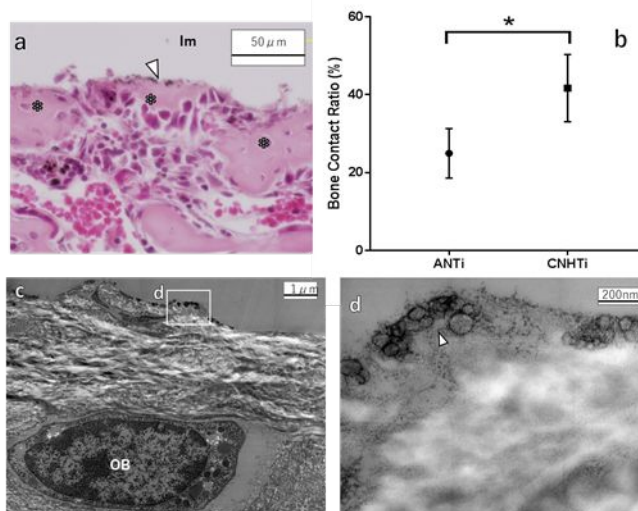


図 6 .CNH/ANTi ワイヤ埋入 7 日後
a: 光学顕微鏡像 (*: 新生骨、白矢頭: CNH)
b: チタン表面との骨接触率
c: 新生骨周囲組織の TEM 像
d: c の拡大像 (白矢頭: CNH)

(4) SWNT の体内動態の観察

頭蓋部骨膜下に埋入した SWNT は埋入部に蛍光が観察された。肝臓をはじめとする他の臓器では蛍光が観察されず、組織切片においても蛍光は認められなかった。埋入部の蛍光強度は経時的に減少が見られたが、56 日後においても鮮明に観察された。また、埋入部位の組織を TEM 観察したところ、細胞内に CNTs が取り込まれている状態が観察された。以上より、図 7 に示すように、局所埋入した SWNT は、他の臓器にほとんど移行せず、埋入部位に留まることが示唆された。

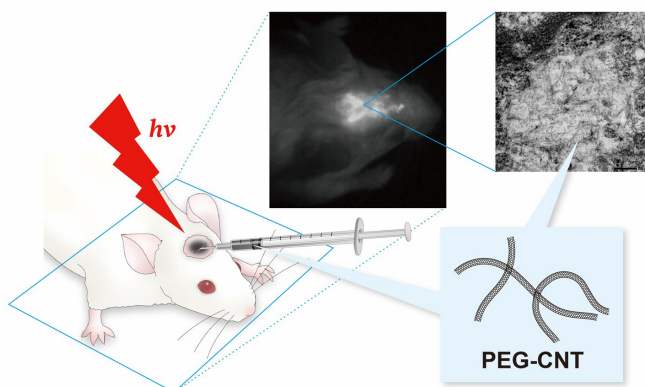


図 7 . SWNT を頭蓋部に埋入した模式図

Hirata E et al. Fate of Carbon Nanotubes Locally Implanted in Mice Evaluated by Near-Infrared Fluorescence Imaging: Implications for Tissue Regeneration, ACS Applied Nano Materials, 2019, 2, 1382-1390

研究成果の総括

本研究により、MC や BMP を担持した CNHs の創製が可能となった。MC/CNHs は静菌性を有し、BMP/CNHs は骨芽細胞の分化を促進することが明らかとなった。また、MC/CNHs に近赤外光を照射することにより、徐放性制御の可能性が示唆された。泳動電着により CNHs を付着した CNH/ANTi は骨組織との適合性を示した。局所に埋入した CNTs は、そのほとんどが局所に留まること明らかになった。以上の本研究の成果から、担持した抗生剤や成長因子の徐放を制御しうるデンタルインプラント、すなわちスマートナノバイオマテリアルの創製と口腔領域への応用の可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

1. Hirata E, Yudasaka M, Ushijima N, Sakaguchi N, Maeda Y, Tanaka T, Kataura H, Yokoyama A, Carbon Nanotubes Locally Implanted in Mice Evaluated by Near-Infrared Fluorescence Imaging: Implications for Tissue Regeneration, *ACS Applied Nano Materials*, 2019, 2, 1382-1390 査読有 DOI: 10.1021/acsnm.8b02267
2. Fozza C, Russier J, Leon V, Orecchioni M, Hirata E, Viridis P, Sgarrella F, Cuniberti G, Prato M, Vázquez E, Bianco A, Delogu LG, FEW-LAYER GRAPHENE SELECTIVELY KILLS MONOCYTIC NEOPLASTIC CELLS FROM PATIENTS WITH AML AND CMML, *HAEMATOLOGICA*, 102: 68, 2017 査読有
3. 平田恵理:「ナノカーボンと骨再生」 特集 ナノカーボンとバイオの接点 *生物工学会誌* 95(12): 712-714, 2017 査読無
https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9512/9512_tokushu_3.pdf
4. Russier J, Leon V, Orecchioni M, Hirata E, Viridis P, Fozza C, Sgarrella F, Cuniberti G, Prato M, Vázquez E, Bianco A, Delogu LG, Few-Layer Graphene Kills Selectively Tumor Cells from Myelomonocytic Leukemia Patients, *Angew Chem Int Ed* 56: 3014-3019, 2017 査読有 DOI: 10.1002/anie.201700078
5. Hirata E. Carbon nanomaterials for bone tissue regeneration. *Hokkaido Journal of Dental Science* 38: 99-103, 2017 査読有
6. Hirata E, Miyako E, Hanagata, N, Ushijima N, Sakaguchi N, Russier J, Yudasaka M, Iijima S, Bianco A, Yokoyama A. Carbon nanohorns allow acceleration of osteoblast differentiation via macrophage activation. *Nanoscale*. 30:14514 – 14522, 2016 査読有 DOI: 10.1039/c6nr02756c

[学会発表](計15件)

1. Eri Hirata, Masako Yudasaka, Yukari Maeda, Takeshi Tanaka, Hiromichi Kataura, Atsuro Yokoyama: Near-infrared photoluminescent imaging of carbon nanotubes locally implanted in mice. the 256th American Chemical Society National Meeting, 2018. 8.21 Boston MA
2. Sadahito Kimura, Eri Hirata, Sari Takada, Masatoshi Sakairi, Masako Yudasaka, Atsuro Yokoyama. Macrophage behavior on the carbon nanohorn coated anodized titanium. 2018 The 11th Congress of AAO 2018.11.10-11 Seoul, KOREA Page19
3. Sadahito Kimura, Eri Hirata, Sari Takada, Masatoshi Sakairi, Masako Yudasaka, Atsuro Yokoyama. Activation of macrophage on the carbon nanohorn functionalized anodized titanium. The 66th Annual meeting of JADR, 2018.11.18 Sapporo, Japan Page100
4. Eri Hirata, Masako Yudasaka, Yukari Maeda, Takeshi Tanaka, Hiromichi Kataura, Atsuro Yokoyama. In vivo Kinetics of Carbon Nanotubes Locally Implanted in Mice The 66th Annual meeting of JADR, 2018.11.18 Sapporo, Japan Page 20
5. 平田恵理, 湯田坂雅子, 前田由佳利, 田中丈志, 片浦弘道, 横山敦郎. Biodistribution of carbon nanotubes after local implantation of mice 第54回 フラレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム 2018年3月10日 東京都
6. 前田由佳利, 平田恵理, 高田紗理, 坂入正敏, 木村貞仁, 横山敦郎. 静菌作用を付与したカーボンナノホーンの開発. 日本バイオマテリアル学会 北海道ブロック第3回研究会 札幌. (2018.05)
7. 木村貞仁, 高田紗理, 坂入正敏, 湯田坂雅子, 平田恵理, 横山敦郎. 骨伝導性向上を目的としたカーボンナノホーンによる陽極酸化チタンの表面修飾. 日本バイオマテリアル学会 北海道ブロック第3回研究会, 札幌. (2018.05)
8. 木村貞仁, 平田恵理, 高田紗理, 坂入正敏, 湯田坂雅子, 横山敦郎. カーボンナノホーン修飾陽極酸化チタン上でのマクロファージの活性. 2018年9月 仙台 第八回ナノカーボンバイオシンポジウム プログラム・抄録集 Page18
9. 前田由佳利, 平田恵理, 小松原浩実, 山本悟, 横山敦郎. ミノサイクリンを担持したカーボンナノホーンの開発. 第47回日本口腔インプラント学会学術大会(第37回日本口腔インプラント学会東北・北海道支部学術大会併催) 2017年9月 仙台 日本口腔インプラント学会誌第30巻特別号 Page56(2017.09)
10. 高田紗理, 平田恵理, 前田由佳利, 小松原浩実, 山本悟, 横山敦郎. カーボンナノホーン修飾陽極酸化チタン上の骨形成. 第47回日本口腔インプラント学会学術大会 2017年9月 宮城 日本口腔インプラント学会誌 30巻特別号 Page47(2017.09)
11. Eri Hirata, Eijiro Miyako, Masako Yudasaka, Alberto Bianco, Atsuro Yokoyama. The effect of carbon nanohorns on human monocyte and mesenchymal stem cells. 17th International Conference on the Science and Application of Nanotubes, 2016. 8. 13 Vienna, Austria Page 235
12. Sari Takada, Eri Hirata, Atsuro Yokoyama. The Electrodeposition of Anodized Titanium with

Carbon Nanohorns. The 11th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration, 2016. 6.3-4, Bangkok, Thailand. Page 57

13. 平田恵理, 都英次郎, Alberto Bianco, 湯田坂雅子, 横山敦郎. カーボンナノホーンを用いた骨形成フラレン・ナノチューブ・グラフェン学会ナノカーボンバイオシンポジウム 東京都 第5回ナノカーボンバイオシンポジウムプログラム Page12(2016.09)
 14. 高田紗理, 平田恵理, 横山敦郎. カーボンナノホーンの陽極酸化チタンへの泳動電着. 第4回 ナノカーボンバイオシンポジウム フラレン・ナノチューブ・グラフェン学会ナノカーボンバイオシンポジウム 東京都 第4回ナノカーボンバイオシンポジウムプログラム Page16(2016.02)
 15. 高田紗理, 平田恵理, 小松原浩実, 山本悟, 横山敦郎. カーボンナノホーンコーティング陽極酸化チタンの開発. 日本補綴歯科学会第125回学術大会 2016年7月 石川 日本補綴歯科学会誌 8巻 125回特別号 Page288(2016.07)
- 〔その他〕受賞等
1. 前田由佳利: 北海道バイオマテリアル研究会ポスター賞「ミノサイクリンを担持したカーボンナノホーンの開発」
 2. 前田由佳利: 「ミノサイクリンを担持したカーボンナノホーンの開発」 第47回 公益社団法人 日本口腔インプラント学会学術大会 デンツプライシロナ賞

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 赤坂 司
ローマ字氏名: Akasaka Tsukasa
所属研究機関名: 北海道大学
部局名: 大学院歯学研究院
職名: 准教授
研究者番号(8桁): 00360917

研究分担者氏名: 山本 悟
ローマ字氏名: Yamamoto Satoru
所属研究機関名: 北海道大学
部局名: 大学院歯学研究院
職名: 助教
研究者番号(8桁): 10344524

研究分担者氏名: 平田 恵理
ローマ字氏名: Hirata Eri
所属研究機関名: 北海道大学
部局名: 大学院歯学研究院
職名: 助教
研究者番号(8桁): 10722019

研究分担者氏名: 佐藤 義倫
ローマ字氏名: Sato Yoshinori
所属研究機関名: 東北大学
部局名: 環境科学研究科
職名: 准教授
研究者番号(8桁): 30374995

研究分担者氏名: 東野 史裕
ローマ字氏名: Higashino Fumihito
所属研究機関名: 北海道大学
部局名: 大学院歯学研究院
職名: 准教授
研究者番号(8桁): 50301891

研究分担者氏名: 湯田坂 雅子
ローマ字氏名: Yudasaka Masako
所属研究機関名: 国立研究開発法人産業技術総合研究所,
部局名: 材料・化学領域
職名: 招聘研究員
研究者番号(8桁): 70159226

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: Bianco Alberto
ローマ字氏名: Bianco Alberto

研究協力者氏名: 高田 紗理
ローマ字氏名: Takada Sari

研究協力者氏名: 前田 由佳利
ローマ字氏名: Maeda Yukari

研究協力者氏名: 木村 貞仁
ローマ字氏名: Kimura Sadahito

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。