

令和元年5月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11582

研究課題名(和文)メカノバイオリジカルなインプラント周囲骨形成における分子機構の解明

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanism of mechanobiological bone formation around implant

研究代表者

松井 裕之 (Matsui, Hiroyuki)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・講師

研究者番号：10547277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ジルコニア表面における生体親和性と細胞の形態変化の関連をメカノバイオリジの観点から解明することを目的とした。イットリア安定型ジルコニア(Y-TZP)およびセリア安定型ジルコニア(NANOZR)ではいずれも骨芽細胞は紡錘形を呈し、これはインテグリン阻害で損なわれた。一方、Y-TZP上ではインテグリン $\alpha 2\beta 1$ は増殖を負に制御していた。また細胞のヘパリン処理は形態を損なったが、増殖への影響はNANOZR特異的であった。これらの結果から、骨芽細胞は異なる材料に異なる様式で接着しながら、その反応を細胞増殖に統合する何らかの機構を備えていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジルコニアはアレルギーがなく強度に優れており、金属に代わる歯科用材料として注目されている。特に近年、CAD/CAMによる加工技術の進歩が臨床応用の幅を広げている。このことは同時に、ジルコニア材料の改質や新たな表面修飾を有するジルコニアの開発の必要性を示している。一方、ジルコニアの生体親和性の分子メカニズムはほとんど不明である。本研究はこれをつぶさに解明し、新材料開発の礎を築くことに意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to identify the relation between cell morphology and biocompatibility on zirconia surface from mechanobiological perspectives. Osteoblasts showed sharp spindle shape on both yttria-stabilized zirconia (Y-TZP) and ceria-stabilized zirconia (NANOZR). This shape form was inhibited both by integrin inhibition and heparin treatment, however, cellular reaction was different. Briefly, integrin  $\alpha 2\beta 1$  negatively regulates proliferation only on Y-TZP, but heparin-sensitive protein positively regulates proliferation on NANOZR. These results suggest that osteoblast possesses multiple specific adhesion molecule against specific substrate, however, they integrate cellular context to proliferation by unknown mechanism.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：メカノバイオリジー ジルコニア 生体親和性 ナノジルコニア

## 1. 研究開始当初の背景

ジルコニアは機械的強度にすぐれ、生体親和性が高いため歯科金属アレルギー患者の歯冠修復に使用可能である。CAD/CAM テクノロジーの発展とともにジルコニアの加工技術も進歩し、歯科領域での適応も拡大している。モノリシックジルコニアによる歯冠修復や、Porcelain fused zirconia のコーピングの他、義歯のフレームワークやインプラントのアバットメント、さらにはインプラントのフィクスチャーもジルコニアの製品が登場している。

歯科用材料としてのジルコニアはイットリア安定型のもの (Y-TZP) が従来使用されてきた。これに対し近年、セリア安定型ジルコニアにナノサイズのアルミナを加えたナノジルコニア (NANOZR) が商品化された。NANOZR は Y-TZP に比べ韌性に優れている。両者の違いは部分安定化に用いる導入粒子の違いであるが、ジルコニア材料は今後、強度・韌性などの機械的特性を求める改良と、光透過性や色調を求める改良が進んでいくことが予想される。

一方、生体親和性の分子機構についてはこれまで、ほとんど研究対象となつてこなかったのが実際である。これは、ガラスを含めたセラミクスに対する細胞の生体親和性も同様であるが、その接着分子が特定されていないことに大きな原因がある。

研究代表者はこれまでに、シリコンゴム製の細胞培養チャンバーにコラーゲン処理を行い、その上に骨芽細胞を播種し伸展または圧縮刺激を行う実験系を用いてきた。これを用いて、(1) 骨芽細胞の反復伸展刺激では ERK, JNK および p38 が活性化される (2) ごく弱い力で活性化される ERK は骨芽細胞分化に関与している (3) 強い力で活性化される JNK および p38 は骨芽細胞分化に抑制的に機能している (4) 強い力で活性化される JNK は TNF 受容体ファミリーの一員である Fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) の発現を誘導し、細胞周囲に存在するリガンドへの感受性を獲得させることによりアポトーシスを引き起こす (5) Fn14 の発現は一過性であり、これは 109 番目のリジン残基に対するポリコピキチン化とそれに引き続くプロテアソーム系での分解に依っている (6) p38 はケモカイン Monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3) の発現を誘導し、前駆破骨細胞の局所遊走を促進する (7) MCP-3 の分泌は 1~7 番目のアミノ酸配列 (MRISATL) 依存的に、細胞膜界面での切り離しにより間質へ放出される、いわゆる Shedding により行われる (8) 弱い力で活性化される ERK の上流には異なる 2 つの MAP3K, A-Raf および C-Raf が存在する (9) A-Raf は細胞膜界面に存在する非選択性陽イオンチャネル P2X<sub>7</sub> を介して活性化され、骨芽細胞の分化そのものを制御している (10) 上流因子の同定には至らなかったが、C-Raf はメカニカルストレスの負荷に対する耐性を獲得させ Survival に向かわせる (11) 長時間の伸展刺激に対し、骨芽細胞は伸展方向に伸びるように配向を獲得し配列されたが、この挙動と ERK, JNK および p38 の関連は不明である ことが見出された。

この培養基質上での骨芽細胞に比べ、Y-TZP, NANOZR および商業用チタン (CpTi) 上の骨芽細胞はシャープな紡錘形を呈しており、接着状態も良いように思われた。このことは、これまでの結果を参照すると特に (3) および (11) より、メカノバイオリジカルな形態変化を介した持続的な ERK の活性化と骨芽細胞分化の関連が示唆された。

## 2. 研究の目的

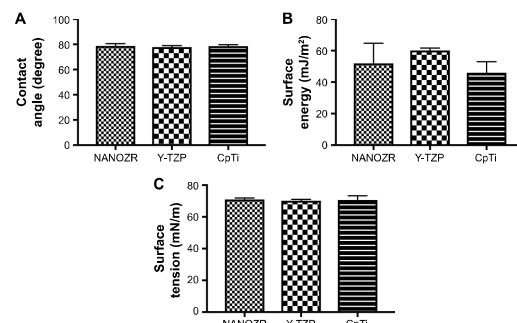
そこで本研究では、細胞の形状と分化・増殖をメカノバイオリジカルな視点から解析することで、ジルコニアの生体親和性を司る分子を同定することを目的とした。特に、細胞接着を様々な薬剤で阻害することにより、目的とする分子を囲い込むスクリーニングを行うこととした。

## 3. 研究の方法

骨芽細胞を用いた実験に先立ち、Y-TZP, NANOZR および CpTi の表面性状に関する走査電子顕微鏡観察、表面粗さおよび表面ぬれ性上の測定を行った。通常の培養シャーレ、Y-TZP, NANOZR および CpTi の試験片上に骨芽細胞 MC3T3-E1 を播種し、ファロイジン染色にて細胞骨格の観察を行った。また、接着状態について SEM での観察を行った。細胞増殖は CCK-8 キットを用いた比色測定で評価した。この他、インテグリン阻害は RGD-peptide (Selleck Chemicals),  $\alpha_2\beta_1$  インテグリン阻害はモノクローナル抗体 MAB1998 (Millipore), Heparin (Sigma Aldrich) を使用し処理を行った。

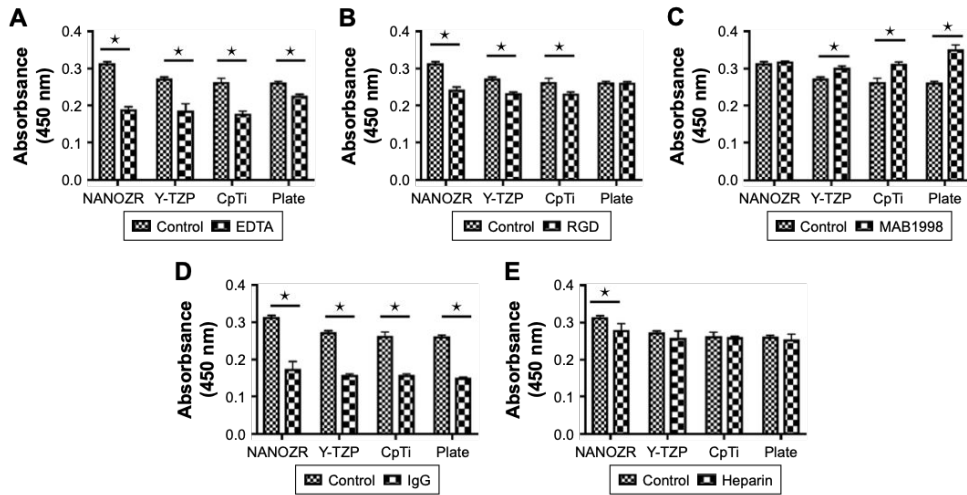
## 4. 研究成果

同一の研磨性の条件下において、3 種の材料感でのぬれ性に有意差は認められなかった(右図) が、CpTi のみ表面の粗さが高いことがわかった。骨芽細胞はいずれの材料にも接着し安定な紡錘形を呈した。EDTA および無血清培地を用いた検討により、この接着には細胞外  $Ca^{2+}$  および血清蛋白の介在が必要であることがわかった。また、この条件下では細胞増殖が顕著に抑制された。RGD ペプチドによるインテグリンの阻害

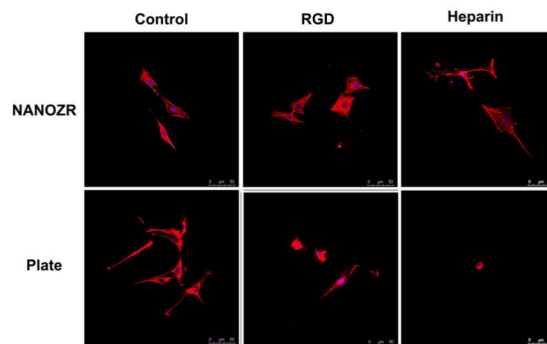


様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

は細胞突起と細胞骨格ストレスファイバーの形成と細胞増殖を阻害した。一方、Y-TZP および CpTi 上では Non-RGD 型の  $\alpha_2\beta_1$  インテグリンの阻害は逆に細胞増殖を促進したことから、インテグリンはその組み合わせにより細胞挙動を精緻に制御していることが示唆された。また、ヘパリン処理では細胞突起を維持しながらストレスファイバー形成が阻害され、NANOZR 上で増殖阻害が観察された。このことから、NANOZR への細胞接着コンポーネントによる初期接着の成立後に、ストレスファイバーからの何らかのシグナルにより骨芽細胞のコンテクストが決定されることが示唆された。これらの結果は、ジルコニア材料の改質・開発がこれまでの物性依存的な視点でなく、生物学的視点を加味すべきであることを示唆している (Luo F. et.al., 2018)。



各種試験片上における細胞増殖試験



NANOZRにおけるストレスファイバー形成

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Luo F., Hong, G., Matsui H., Endo K., Wan Q. and Sasaki K.  
Initial osteoblast adhesion and subsequent differentiation on zirconia are regulated by integrins and heparin-sensitive molecule.  
*International Journal of Nanomedicine*, 査読有り, Vol13; 7657-7667, 2018, DOI:10.2147/IJN.S17536

〔学会発表〕(計2件)

(1) Luo F., Hong, G., Matsui H., Endo K., Wan Q. and Sasaki K.  
Heparin-sensitive molecule regulates osteoblast adhesion and proliferation on zirconia surface.  
*European association of osseointegration*, 2018.

(2) Luo F., Hong, G., Matsui H., Endo K., Wan Q. and Sasaki K.  
Effect of RGD peptide on Cellular Morphology and Adhesion.

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

*International association of dental research, 2017.*

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：佐々木 啓一

ローマ字氏名：(Sasaki, Keiichi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学院歯学研究科

職名：教授

研究者番号 (8桁)：30178644