

令和 2 年 8 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11802

研究課題名(和文) オッセオインテグレーションを構成するコンドロイチン4硫酸の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of chondroitin sulfate consists of osseointegratoin

研究代表者

土屋 周平 (Shuhei, Tsuchiya)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20569785

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)：本研究ではC4ST-1がチタン上の骨形成に与える影響を調べた。C4ST-1はチタン板上で1、2週間培養した骨髄間葉系幹細胞(BMSC)の細胞増殖能および骨形成能に影響を与えなかった。一方、C4ST-1はチタン上のプロテオグリカン層は面積を減らした。また、C4ST-1はBMSCが分泌する成長因子を変化させ、その成長因子はマクロファージを組織修復作用を有するM2型マクロファージの遺伝子発現を上昇させた。以上の結果から、C4ST-1は骨とチタンの間にあるプロテオグリカン層の形成に重要な役割を果たし、チタン周囲の間葉系幹細胞およびマクロファージの免疫寛容能に影響を与えることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、チタン上に形成されるプロテオグリカン層の機能の1つを明らかにしたことである。これは、歯科インプラント学の最重要事項であるオッセオインテグレーションの基本原理の一部を解明することができた。

本研究の重要性は、生体材料の周囲で引き起こされている生物学的な反応を明らかにすることによって、チタンのみではなく、臨床で使われている生体材料の安全性および効能効果の評価項目に応用することができる。

研究成果の概要(英文)：Human marrow mesenchyma stem cell which was controlled Chondroitin 4-O-Sulfotransferase 1 (C4ST-1) gene expression by the gene silencing method(sh-BMSCs) was used in this study and cultured it on a titanium disc. sh-BMSCs has character of stem cell. After culturing sh-BMSCs on a titanium disc one and two weeks, cell proliferation and osteogenic differentiation was not significant difference. After culturing sh-BMSCs for two weeks, and observing the proteoglycan layer which intervened between titanium and BMSCs, the area of proteoglycan was decreased. Gene expression of IDO of sh-BMSCs which I cultured with a titanium board and IL-6 decreased in comparison with BMSCs. In addition, the growth factor which sh-BMSCs which cultured with a titanium disc secreted reduced gene expression of the M1 macrophage inflammation-shaped with a macrophage. C4ST-1 in BMSCs on titanium play an important role of proteoglycan layer on titanium, it makes affect immune tolerance ability.

研究分野：生体材料

キーワード：オッセオインテグレーション コンドロイチン4硫酸 骨髄由来間葉系幹細胞 プロテオグリカン

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療はすでに広く普及しており、多くの患者の咀嚼機能再建に貢献している。インプラント治療の成功には、オッセオインテグレーションの獲得が必須であるが、臨床では、それを証明する検査項目はなく、咬合力に耐えていることによるのみ証明されている。“安心・安全”なインプラント治療するためには適切な検査が必要であるが、最も重要な検査項目がないといっても過言ではない。一方、オッセオインテグレーションの定義は“光学顕微鏡レベルで骨とインプラント体表面が接触している状態”という組織学的評価のみである。そこで、臨床応用が可能な評価方法として、生化学的検査があげられる。そのためには、オッセオインテグレーションの生化学的な定義の確立が必要である。本研究の最終目的は、インプラント治療の適否を判断できる生化学的マーカーの探索である。

骨とチタンの界面を電子顕微鏡で観察すると 50-500nm のプロテオグリカンが豊富に含まれている層がある。プロテオグリカンはコアタンパク質に糖鎖が結合しており、そのコアタンパクへの糖鎖付加は糖転移酵素によって制御されている。これまでの研究成果から、デコリン、パイグリカンなどのプロテオグリカンが、二酸化チタンに直接結合することをタンパク質レベルで明らかにした。しかしながら、これらプロテオグリカンのコアタンパク、もしくは糖鎖がチタンに結合しているかは明らかにされていない。過去の報告では、各種糖鎖の中でコンドロイチン 4 硫酸 (C4S) が、チタンに直接結合することが明らかにされている。そして C4S は、Chondroitin 4-0-sulfotransferase-1, -2, -3 (C4ST ファミリー) によって付加が制御されている。

以上のことから本研究の着想に至った経緯は、タンパク質レベルではなく、糖鎖レベルで二酸化チタンに直接結合する C4S の発現と機能を解析することにより、オッセオインテグレーションのメカニズムの解析の一助になると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アモルファスレイヤーに存在する C4S がオッセオインテグレーション獲得のために果たす役割を解明することである。

3. 研究の方法

本研究で使用した細胞は、UE7T-13 (骨髄間葉系幹細胞の細胞 (BMSCs)) 細胞である。培地は Dulbecco's Modified Eagle Medium に 10% の牛胎児血清を加えたものを使用した。細胞培養をするためのチタン板は純チタン Gradell を加工して使用した。BMSCs における C4ST-1 遺伝子の機能解析をするために RNA 干渉法を使って遺伝子発現をノックダウンした。遺伝子発現解析では、リアルタイム RT-PCR 法、タンパク質発現解析では免疫組織化学染色、ウェスタンブロット法、組織学的解析では透過型電子顕微鏡を使用した。免疫寛容能の解析ではヒト単核球細胞株である THP-1 をマクロファージに分化させたのちに M1 マクロファージおよび M2 マクロファージの分化解析をした。

4. 研究成果

(1) チタン板上で培養した骨髄由来間葉系幹細胞の C4ST ファミリー発現解析

チタン板上で培養した骨髄由来間葉系幹細胞株 (BMSC) における C4ST ファミリーの遺伝子発現は C4ST-1, C4ST-2 の発現が多く、C4ST-3 の発現量は少なかった。

(2) C4ST ファミリー発現を抑制した BMSC の細胞株の樹立

sh-BMSCs の C4ST-1 の遺伝子発現量は N-BMSCs と比較して約 40%であった。

(3) チタン上で培養した BMSC における C4ST ファミリーの機能解析

sh-BMSCs における C4ST-1, C4ST-2, C4ST-3 の発現は N-BMSCs と比較して有意差はなかった。C4ST-3 の発現量は、C4ST-1 および C4ST-2 と比較して有意に少なかった。

(4) チタン板上で培養した BMSC における C4ST ファミリーの機能解析 (細胞接着能、細胞増殖能、チタン板と細胞界面にあるプロテオグリカン層の形態観察)

細胞接着能および細胞増殖能は N-BMSCs と比較して sh-BMSCs において有意差はなかった。一方、1 週目ではプロテオグリカン層は観察されなかったが、2 週目ではチタンと sh-BMSCs の界面にあるプロテオグリカン層は N-BMSCs と比較して有意に少なくなった。一方、プロテオグリカン層の厚みに変化はなかった (図 1)。

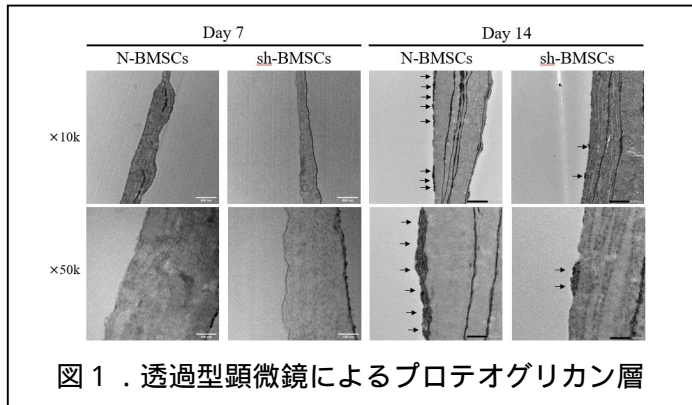


図 1 . 透過型顕微鏡によるプロテオグリカン層

(5) チタン上で培養した BMSC における C4ST ファミリーが骨形成関連遺伝子に与える影響

Runx2, ALP, Col1a1, OCN の遺伝子発現解析の結果は図 2 のとおりであった。

アリザリンレッド S の染色結果は N-BMSCs と sh-BMSCs 間で有意差はなかった。それぞれの遺伝子発現量で有意差があった。一方、C4ST-1 は石灰化能に影響を与えなかった。

この結果から、BMSCs における C4ST-1 は骨形成関連遺伝子に影響を与えるが、そのいずれも範囲は 1.5 倍程度であり、骨形成に大きな影響を与えないと考えられた。

(6) チタン上で培養した BMSC における C4ST-1 が直接的および間接的な免疫寛容能に与える影響

チタン板上で培養した sh-BMSCs は N-BMSCs と比較して免疫寛容能が高くなることが明らかになった。また、sh-BMSCs の分泌したタンパク質は N-BMSCs と比較して炎症型の M1 マクロファージに分化することが明らかになった。このことからチタン板上で培養した BMSCs における C4ST-1 は、骨形成能ではなく直接的には免疫寛容能を高くし、間接的には下げることが明らかになった (図 3)。

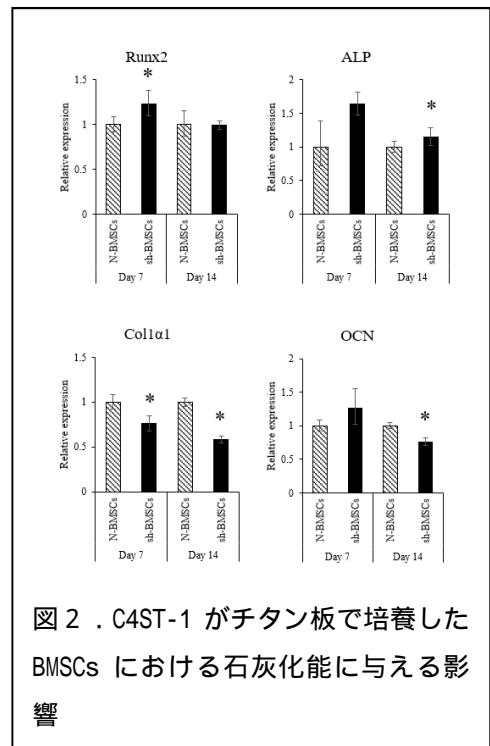


図 2 . C4ST-1 がチタン板上で培養した BMSCs における石灰化能に与える影響

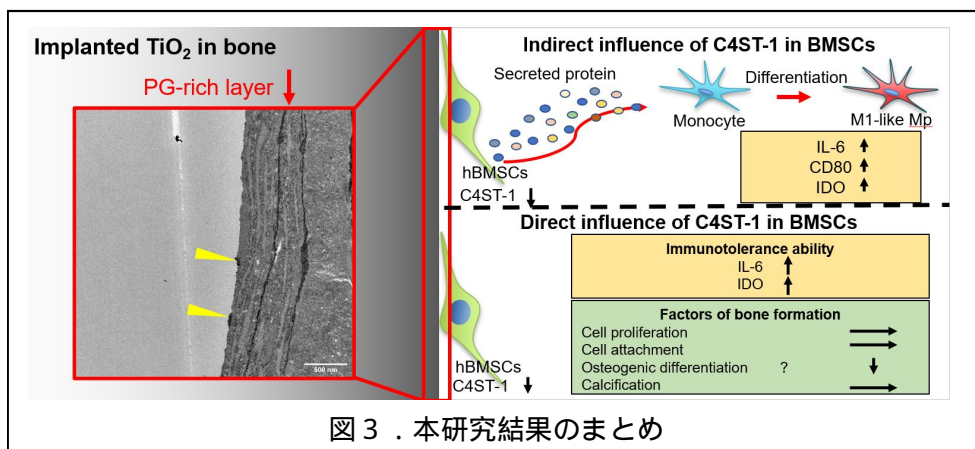


図 3 . 本研究結果のまとめ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Fujio Masahito, Osawa Yusuke, Matsushita Masaki, Ogisu Kota, Tsuchiya Shuhei, Kitoh Hiroshi, Hibi Hideharu	4. 巻 141
2. 論文標題 A Mouse Distraction Osteogenesis Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/57925	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Okabe Kazuto, Kaneko Ryuji, Kawai Takamasa, Mochizuki Daisuke, Tsuchiya Shuhei, Hibi Hideharu	4. 巻 30
2. 論文標題 Ophthalmoplegia considered to be Tolosa-Hunt syndrome: A case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JOURNAL OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY MEDICINE AND PATHOLOGY	6. 最初と最後の頁 461-465
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） org/10.1016/j.ajoms.2018.04.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Shuhei Tsuchiya, Keisuke Sugimoto, Hisanobu Kamio, Kazuto Okabe, Kensuke Kuroda, Masazumi Okido, Hideharu Hibi	4. 巻 13
2. 論文標題 Kaempferol-immobilized titanium dioxide promotes formation of new bone: effects of loading methods on bone marrow stromal cell differentiation in vivo and in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Nanomedicine	6. 最初と最後の頁 1665-1676
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/IJN.S150786	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Shuhei Tsuchiya, Keisuke Sugimoto, Hisanobu Kamio, Kazuto Okabe, Kensuke Kuroda, Masazumi Okido, Hideharu Hibi	4. 巻 13
2. 論文標題 Kaempferol-immobilized titanium dioxide promotes formation of new bone: effects of loading methods on bone marrow stromal cell differentiation in vivo and in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Nanomedicine	6. 最初と最後の頁 1665-1676
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Keisuke Sugimoto, Shuhei Tsuchiya, Kenji Hara, Yoshihiro Matsushita, Masahito Fujio, Hideharu Hibi	4. 巻 29
2. 論文標題 Osteoradionecrosis of the jaw caused by periapical periodontitis: a case report	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology	6. 最初と最後の頁 328-333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1016/j.ajoms.2017.02.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 荻須宏太, 藤尾正人, 土屋周平, 岡部一登, 外山直人, 日比英晴
2. 発表標題 伸展刺激下で得た細胞培養上清における骨形成・血管新生能の検討
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤尾正人, 佐世暁, 荻須宏太, 土屋周平, 酒井陽, 日比英晴
2. 発表標題 Le Fort I 型骨切り術の固定法と術後安定性の検討
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 外山直人, 土屋周平, 原憲史, 藤尾正人, 岡部一登, 佐世暁, 荻須宏太, 神尾尚伸, 日比英晴
2. 発表標題 チタン表面の大気圧プラズマ処理がマクロファージの挙動におよぼす影響の検討
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荻須宏太, 藤尾正人, 土屋周平, 神尾尚伸, 外山直人, 日比英晴
2. 発表標題 伸展刺激下で得た細胞培養上清における骨形成能の検討
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土屋周平、清水忍、片桐涉
2. 発表標題 骨髄由来間葉系細胞による顎骨再生療法の評価と臨床応用
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hibi H, Katagiri W, Tsuchiya S, Omori M, Ueda M	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Quintessence Publishing Co Inc	5. 総ページ数 288
3. 書名 The Sinus Bone Graft, Third Edition / Tissue-Engineered Bone and Cell-Conditioned Media	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>名古屋大学医学部附属病院歯科口腔外科 https://zzzgundam2008.wixsite.com/nu-oandm-surgery 名古屋大学教員データシステム http://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/view/html/100001602_ja.html</p>

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	黒田 健介 (Kuroda Kensuke) (00283408)	名古屋大学・未来材料・システム研究所・准教授 (13901)	