

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11819

研究課題名(和文) 生体材料インターフェイスにおける末梢概日リズムの可逆性分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of Reversible Molecular Mechanism of Peripheral Circadian Rhythm at the Interface of Biomaterials.

研究代表者

森永 健三 (Morinaga, Kenzo)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：10509061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：NPAS2がオッセオインテグレーションの確立に重要な役割を持つという仮説のもと、NPAS2ノックアウトマウスを用いてインプラントのオッセオインテグレーションを評価し、NPAS2の役割を検証した。NPAS2の遺伝子欠損は大腿骨のサイズや海綿骨形態に影響を与えなかったが、SLAインプラントにおいて、push-out値はWT群に比べてNPAS2 KOマウス群で有意に減少した。本研究結果より、NPAS2がオッセオインテグレーションにおけるチタンと骨組織との間の結合に重要な役割を持つことを示しており、オッセオインテグレーションの分子生物学的解明の新たな手掛かりにな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

本研究結果より、オッセオインテグレーションの獲得あるいは維持の過程で、NPAS2という時計遺伝子がオッセオインテグレーションに強い影響を持つ可能性を発見した。インプラント表面の化学的性質や形態などのマテリアル由来の調節因子とは違って、概日リズムは宿主組織から由来するため、その機構の役割はオッセオインテグレーションの長期的維持にまで直接及ぶ。本研究をさらに進めていくことで、長期的なオッセオインテグレーションの成功や失敗に直接影響を与える分子メカニズムを確立することが可能と予想される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the molecular mechanism of osseointegration through determining the role of Npas2. The implant push-out test and bone-to-implant contact measurements demonstrated the establishment of osseointegration in 3weeks. By contrast, in Npas2 functional knockout(KO) mice, the implant push-out value measured for SLA surface Ti implant was significantly decreased. Our data provides the first evidence that peripheral clock gene component Npas2 plays a role in facilitating the enhanced osseointegration through neuroskeletal regulatory pathways induced by BMSC in contact with rough surface Ti implant.

研究分野：口腔インプラント学

キーワード：NPAS2 時計遺伝子 概日リズム オッセオインテグレーション

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オッセオインテグレーションは骨内インプラントの成否を判定する重要な因子であり、そのメカニズム解析はインプラントの性能の評価や成績の向上を達成するための重要な研究テーマである。これまでに組織形態学的観察や表面性状の改質等の様々な研究が世界中で行われてきたが、チタンがオッセオインテグレーションを引き起こすメカニズムについては、骨内インプラントがこれほど普及している現在においても不明な点が多い。ゆえに機能負荷後に期せずしてインプラントが失敗するケースなど、歯科、整形外科インプラントに関連した合併症も多く報告されており、オッセオインテグレーションに関するメカニズム解析は向上の余地を多く残している。近年では遺伝子レベルでオッセオインテグレーションの分子メカニズムを解明する研究が行われ、オッセオインテグレーションに関わる骨芽細胞や骨関連遺伝子の役割が少しずつ解明されてきている。

我々の過去の研究において、ビタミンD欠乏ラットモデルではオッセオインテグレーションのレベルが有意に低下した。また、ビタミンD欠乏ラットに埋入したインプラント周囲組織での遺伝子発現をマイクロアレイで調査した結果、意外なことにインプラント周囲の骨芽細胞の活性や骨芽細胞関連遺伝子ではなく、NPAS2と呼ばれる時計遺伝子が最も影響を受けていることが判明した。時計遺伝子は、概日リズム(体内時計)をつかさどる遺伝子群を指す。視床下部視交叉上核にある概日リズムの主時計が、身体のおぼすべての細胞にある末梢時計を同調することにより、統一のとれた時計機構が形成される。マウスの頭頂骨を用いたトランスクリプトーム解析では、骨内でも末梢時計が存在し、全ての遺伝子のおよそ30%が24時間周期に従って発現していた。さらに、マウス頭頂骨の組織培養において、骨ミネラルは概日周期に従って沈着した。これらの研究結果は、骨リモデリングが末梢の概日リズムに部分的に調整されている可能性を強く示唆している。我々はチタン生体材料上におけるラットの骨髄間葉幹細胞(BMSC)の時計遺伝子の発現を調査した。機械研磨の滑面およびハイドロキシアパタイトがコーティングされた粗面(B-DAE-DCD)の純チタンディスクを用いた。BMSCをチタンディスク上で培養し、48時間の1時点でqPCRを行った。B-DAE-DCD上で培養されたBMSCにおいては、NPAS2を除く全ての時計遺伝子の発現が抑制されていた。NPAS2のみが有意に強発現していた。また、同様にヒトの骨髄間葉幹細胞(hBMSC)を用いて時計遺伝子の発現を調査した。機械研磨の滑面、B-DAE-DCD表面の純チタンディスクを用いた。hBMSCをチタンディスク上で培養し、細胞周期を同調させたのち、4時間おきに24時間(計7時点)でtotal RNAを採取した。Taqman-based qPCRを行い、Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2, Clock, Bmal1, Npas2の8種の時計遺伝子について発現を調査した。先の研究結果と同様に粗面のB-DAE-DCD表面上で培養されたhBMSCにおいて、NPAS2のみが有意に強発現していた。

2. 研究の目的

これまで、時計遺伝子は恒常性が高く環境因子による影響は少ないとされていたが、近年時計遺伝子発現においても適応性変化が報告されている。我々のこれらの研究結果も、骨髄間葉幹細胞の概日リズムとその遺伝子の発現にチタン生体材料が強い影響を持つことを示唆している。これらの事から、NPAS2を端緒として、チタンデバイスに起因する末梢概日リズムの適応性変化とインプラントインターフェイスにおける細胞分子生物学的メカニズム解明を計画した。

末梢概日リズムの適応性変化がオッセオインテグレーションの獲得・維持における重要な因子であり、とくにNPAS2遺伝子の発現を促進させることでオッセオインテグレーションが促進・強化されるという仮説のもと、以下のSpecific Aims(SA)に基づき実験を行った。

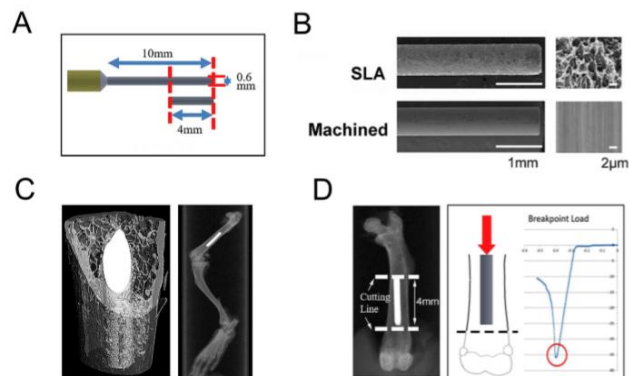
SA1:インプラントのオッセオインテグレーションにおけるNPAS2遺伝子の役割を検討する

SA2:チタン生体材料が末梢概日リズムの適応性変化に与える影響を検討する

3. 研究の方法

SA1:インプラントのオッセオインテグレーションにおけるNPAS2遺伝子の役割を検討する

NPAS2 ノックアウトマウス (B6.129S6-Npas2tm1Slm/J, Jackson Laboratory) にインプラントの埋入を行い、オッセオインテグレーションを評価した。ノックアウトマウスはheterozygous (Npas2^{+/-}) と homozygous (Npas2^{-/-}) の両方で検証を行った。NPAS2 ノックアウトマウスの左右の大腿骨に機械研磨表面およびB-DAE-DCD表面のインプラント(直径0.6mm,長さ4mm)を埋入後、3週間後に試料を採取し、micro CT, 骨接触率(BIC%), push-out test, SEM/EDSの4つの方法でオッセオインテグレーションの評価を行い、得られたデータを健常マウスと比較した(右図)。



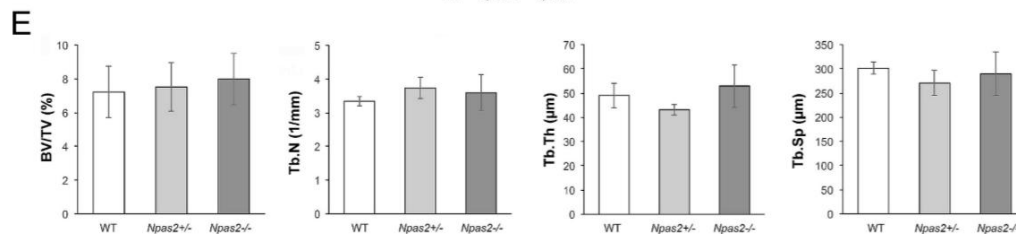
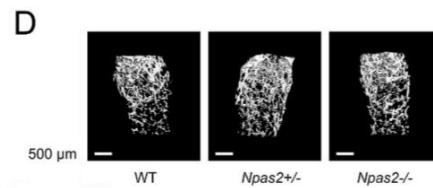
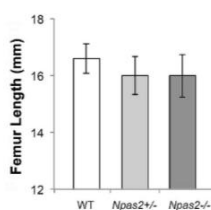
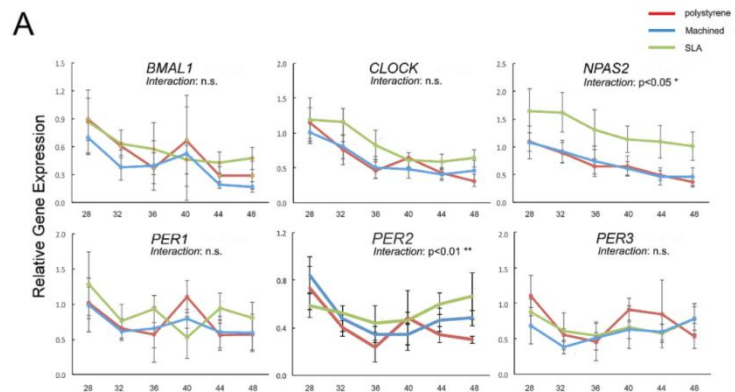
SA2: チタン生体材料が末梢概日リズムの適応性変化に与える影響を検討する

NPAS2 ノックアウトマウスおよび健常マウスから採取した骨髄間葉系細胞をプラスチックプレートおよびチタン生体材料上で培養し 7, 14, 28 日後に蛍光プローブを用いた石灰化アッセイ, および qPCR で骨芽細胞由来遺伝子発現の同定を行った. Taqman-based qPCR を行い, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Clock*, *Bmal1*, *Npas2* の 8 種の時計遺伝子について発現を調査した.

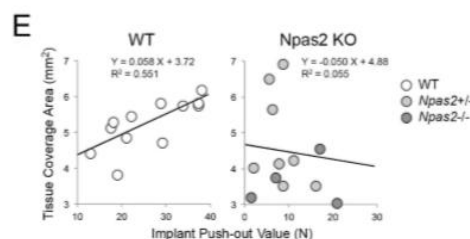
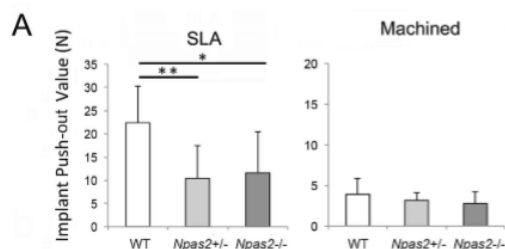
4. 研究成果

チタンディスク上で培養したヒト間葉系幹細胞の時計遺伝子の発現を RT-qPCR で確認したところ, 粗面のディスク上では NPAS2 が有意に高発現していた (右図).

NPAS2 の遺伝子欠損は大腿骨のサイズや海綿骨形態に影響を与えなかった (下図).



SLA インプラントにおいて, push-out 値は WT 群に比べて NPAS2 KO マウス群で有意に減少した ($P < 0.05$) (下左図). インプラント界面骨組織の Ca/P 比は両群で差はみられなかったが, WT 群で確認できた骨のコラーゲン構造が NPAS2 KO マウス群では確認できず amorphous 様を呈していた. また, チタン表面の組織被覆率と push-out 値との関係において WT 群では正の相関がみられたが, NPAS2 KO マウス群では相関はみられなかった (下右図).



本研究結果は, NPAS2 がオッセオインテグレーションにおけるチタンと骨組織との間の結合に重要な役割を持つことを示しており, オッセオインテグレーションの分子生物学的解明の新たな手掛かりになることが示唆された.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森永健三, 北郷明成, 佐々木穂高, 城戸寛史, 西村一郎
2. 発表標題 インプラント体の粗面構造に誘発されるNPAS2時計遺伝子はオッセオインテグレーションを促進する
3. 学会等名 第48回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenzo Morinaga, Sil Park, Akishige Hokugo, Hodaka Sasaki, Hirofumi Kido, Ichiro Nishimura
2. 発表標題 Biomaterials-induced neuronal PAS domain 2 (Npas2) in bone marrow environment facilitated enhanced osseointegration of titanium implant with complex surface modification
3. 学会等名 Academy of Osseointegration 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	城戸 寛史 (Kido Hirofumi) (90169897)	福岡歯科大学・口腔歯学部・教授 (37114)	
研究分担者	渡津 章 (Watazu Akira) (90358375)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員 (82626)	

6. 研究組織（つづき）

	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	寺岡 啓 (Teraoka Kei) (00357542)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・情報・人間工学領域・主任研究員 (82626)	
研究分担者	園田 勉 (Sonoda Tsutomu) (80357334)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員 (82626)	