

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10228

研究課題名（和文）骨形成におけるROSの影響とそれを抑制するインプラント表面の設計

研究課題名（英文）Implant surface modification for suppressing ROS production

研究代表者

尾立 哲郎（ODATSU, Tetsurou）

長崎大学・病院（歯学系）・講師

研究者番号：70513167

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：活性酸素種は骨芽細胞のアポトーシスや破骨細胞の増加をもたらすが、生体親和性の高いチタン表面でも発生することが報告されている。本研究ではインプラント表面と骨が早期に接合するように、抗酸化作用のあるSiおよびZnをチタン表面に担持させることを試みた。水熱処理を行うことでSiおよびZn、またはそれら両方を同時にチタン表面に担持することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
ある種の元素は骨形成を誘導することが知られている。本研究では、それらの中で抗酸化作用も併せ持つとされる、SiおよびZnをチタン表面に担持させることができた。これにより、早期にインプラント体と骨の結合が得られ、治療期間の短縮が期待される。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that reactive oxygen species are generated even on the titanium surface, which has high biocompatibility. In this study, antioxidant element, such as Si and Zn, were tried to apply on the titanium surface to improve the bone formation on the implant surface. Si and/or Zn could be applied with hydrothermal treatment on titanium surface.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：インプラント 活性酸素種

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、生体材料が周囲組織・細胞に及ぼす為害作用と細胞に加わる酸化ストレスとの関連性が指摘されている。酸化ストレスとは、細胞内の活性酸素種(ROS)レベルの上昇に伴い、superoxide dismutase (SOD)、catalase (CAT)、glutathione peroxidase (GPx)などの細胞内 ROS 消去システムが破綻した結果、細胞活性や機能の消失、アポトーシスやオートファジーなどの細胞死を誘導する (Free Radic Res. 2008; 42: 492-504.)。細胞内 ROS は紫外線や電離放射線、化学物質などの外部からの物理化学的刺激によって過剰に発生し得る。また、酸化ストレスは生体材料に対する細胞の反応においても観察され、生体親和性が高いとされるチタン表面においても細胞内 ROS レベルの上昇が報告されている (Biomaterials. 2016; 108: 177-186.)。しかしながら、骨芽細胞の分化や骨形成と酸化ストレスとの関連性については検討されていない。

研究代表者らは生体活性ガラスとそれから溶出する Si イオンの骨形成促進効果について研究しており、Si<sup>4+</sup>により骨形成に関与するさまざまな遺伝子発現の増強を報告した (Adv Healthc Mater. 2016; 5: 2199-2213., J Biomed Mater Res A. 2016; 104: 2604-2615.)。そのなかで、SOD1 遺伝子の発現上昇とコラーゲンの架橋の強化、石灰化の促進および骨形成を促進することを確認した。これは細胞内の ROS レベルが抑制されることにより、骨芽細胞の分化や骨形成が促進された可能性を示している。

同様に、Nojiri らは動物実験により、SOD1 をノックダウンマウスにおいて、コラーゲン繊維の架橋と骨強度の低下を報告している (J Bone Miner Res. 2011; 26: 2682-2694.)。また、Ueno らはチタン表面に接触した骨芽細胞において、細胞内 ROS が発生すること、またそれを抑制することで炎症性サイトカインのレベルが低下することを報告している (Biomaterials. 2016; 108: 177-186.)。さらに Liu らは ROS により小胞体ストレスを介して、MC3T3 細胞のアポトーシスおよびオートファジーが亢進することを報告している (Int J Mol Med. 2018; 41: 2028-2036.)。これらを総合すると、インプラントを含む生体材料への接触や外科的侵襲によって増加する細胞内の ROS により、骨芽細胞および骨芽細胞先駆細胞のアポトーシスを介した細胞死や骨形成の遅延が起こる可能性があることを示唆している。Arakaki らは骨芽細胞分化におけるミトコンドリアの動態変化と ROS による影響を報告している (Biomed Res. 2013; 34: 161-166.)。これは、ROS-signaling pathway がミトコンドリアの形態変化とともに、骨芽細胞分化に影響している可能性を示している。

以上のような研究代表者および国内外の研究者からの報告より、骨芽細胞への分化・骨形成における ROS の影響を詳細に検討し、それらを制御する機構を応用することで骨形成を促進させるインプラント表面を創生できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

ROS はほとんどすべての炎症部位で産生され、他のメディエーターおよび細胞と相互作用しながら炎症反応に深く関与している。インプラント埋入には外科的侵襲が必ず伴うため、インプラント埋入後は通常よりも ROS リッチな環境といえる。本研究では骨芽細胞に対する ROS の影響を解明し、これらを制御する機構を応用することで骨形成を促進させるインプラント表面を設計することを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) インプラント表面の作製

純チタンディスクを耐水研磨紙にて研削し、Si および Zn を表面に担持させるために表面処理を行った。

#### 光析出法

チタンは結晶構造方ルチル型とアナターゼ型に大別され、アナターゼ型が光触媒活性を持つことが知られている。一方、ルチル型もアナターゼ型と比較して 1/10 程度であるが、光触媒活性を持っており、光析出法とはこの光触媒活性を利用して表面に担持させる方法である。Si に関してはテトラエトキシシラン溶液、ヘキサフルオロケイ酸溶液を、Zn に関しては塩化亜鉛溶液に純チタンディスクを浸漬し、高圧水銀ランプを用いて紫外線照射を行った。

#### 水熱処理法

硝酸亜鉛溶液およびケイ酸ナトリウム溶液中に純チタンディスクを浸漬し、250 で 3 時間水熱処理を行った。

#### (2) 材料学的試験

走査型電子顕微鏡 (JCM-6000, 日本電子)にて表面構造の観察、X線光電子分光法 (XPS, KRATOS, 島津製作所)にて表面の元素の定量を行った。

#### (3) サンプル上での細胞培養と qRT-PCR による遺伝子発現の定量

サンプル上で MC3T3-E1 cell を培養し、分化誘導後 1, 3, 7, 14 日目で total RNA を回収し、cDNA を精製して qRT-PCR を行い、骨形成関連遺伝子と ROS 関連遺伝子について遺伝子発現の比較を行った。

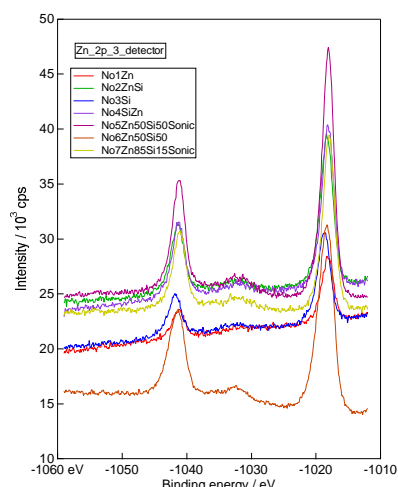
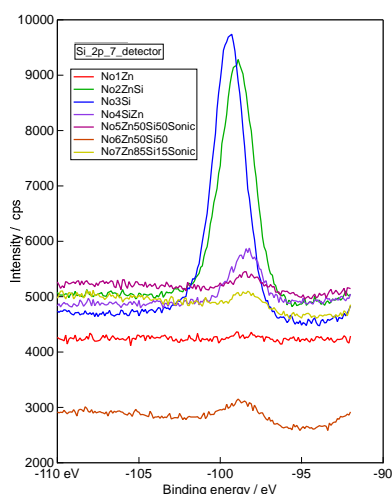
### 4. 研究成果

#### (1) 光析出法について

テトラエトキシシランまたはヘキサフルオロケイ酸溶液中に純チタンディスクを浸漬し、紫外線照射を行い、表面に担持させることを試みた。溶液の濃度や照射時間等の条件を変えて試行したが、XPS 観察の結果十分な量の Si を同定することができなかった。

#### (2) 水熱処理法について

溶液として硝酸亜鉛溶液およびケイ酸ナトリウム溶液を用いた。それぞれの溶液に純チタンディスクを浸漬し、250 度で 3 時間水熱処理を施すことで、チタン表面に Si または Zn イオンの担持が可能であった。



また、Si および Zn イオン両方を同時にチタン表面に担持させるため、1) 硝酸亜鉛溶液とケ

イ酸ナトリウム溶液の混合液にて水熱処理、2)硝酸亜鉛溶液での水熱処理後にケイ酸ナトリウム溶液での水熱処理、3)ケイ酸ナトリウム溶液での水熱処理後に硝酸亜鉛溶液での水熱処理の3パターンを試行したところ、2)の順で行った場合、Si および Zn を同時にチタン表面に担持させることが可能であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	澤瀬 隆  (SAWASE Takashi)  (80253681)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授   (17301)	
研究分担者	バラネザド 有礼左  (VALANEZHAD Alireza)  (00608870)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教   (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関