

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03874

研究課題名(和文) バイオ3Dプリンティング技術を応用した歯周組織再生型インプラントの開発

研究課題名(英文) Development of periodontal tissue regenerative implants by bio-3D printing technology

研究代表者

山田 将博 (Yamada, Masahiro)

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：90549982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、バイオ3Dプリンティング技術と生体模倣チタンナノ表面改質技術とを組み合わせ、生体内でインプラント周囲に歯周組織体を三次元的に誘導する組織工学基盤技術の構築を目的とした。その結果、歯根膜細胞構造体の培養条件の最適化と、歯根膜細胞構造体と生体模倣チタンナノ表面インプラントをラット上顎骨モデルに埋植する口腔内移植モデルを確立した。また、生体模倣チタンナノ表面は、歯根膜細胞をセメント芽細胞分化の促進や、インプラント周囲組織を構成する細胞や免疫細胞を感染抵抗性の増強へと導くことが示唆され、歯周組織誘導後の組織安定性を保つ可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、「生体模倣性チタン材料とバイオ3Dプリンターを応用して、生体外で歯周組織の形成を誘導する」という斬新なアプローチで困難な生体医工学的な挑戦を克服することにある。生体模倣チタンナノ表面の製作方法は確立していること、Kensanメソッドはすでに有用性の高い組織工学技術として臨床応用されており、また、歯根膜細胞は比較的採取しやすく他家移植も可能なため、本研究成果の社会的意義は、歯科再生医療における組織工学技術的および法規制的課題の多くを解決し、歯科補綴治療を革命的に進化させるとともに、再生医学、ナノ工学を含む生体材料学、細胞生物学、組織工学の学問的発展にも貢献し得る。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish a tissue engineering technology that combines the bio-3D printing technology and the biomimetic titanium nanosurface modification technology to three-dimensionally induce periodontal tissue around implants. The culturing methods, 3D printing conditions, and methodology of implantation surgery were optimized as the necessary methodology for the purpose. In addition, the suppression of inflammatory reactions on biomimetic titanium nanosurfaces was obtained.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯根膜 インプラント 生体模倣 バイオ3Dプリンティング 細胞工学 メカニカルストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨結合型インプラントには、歯周組織の欠如に起因する臨床的問題点が指摘されている。その解決策の一つとして、生体外でインプラント周囲へ歯周組織を誘導させた歯周組織再生型インプラントを欠損顎堤へ埋植する再生補綴歯科治療戦略が考えられる。近年、標的組織の三次元的構造と機能をもつ組織体を創出するバイオ 3D プリンティング技術が再生医療分野で注目を浴びている。研究代表者はこれまでに、歯根セメント質の理工学的性質を模倣して、歯根疑似環境を提供することで、歯根膜細胞の分化をセメント芽細胞へと導き、歯周組織の誘導を可能にするチタンナノ表面改質法の開発に取り組んできた。

2. 研究の目的

以上を背景に、本研究は、バイオ 3D プリンティング技術とチタンナノ表面改質技術とを組み合わせ、「歯周組織再生型インプラント治療」の確立に向けた「生体外でインプラント周囲に歯周組織体を三次元的に誘導する組織工学基盤技術」の構築を目的とする。

3. 研究の方法

研究期間内に、以下の項目に関する細胞培養試験および動物実験を行った。

(1) ラット歯根膜細胞構造体作製の検証

ラット上顎臼歯から初代継代歯根膜細胞を分離し、増殖培地中で培養する。ラット脂肪幹細胞構造体プロトコルを参考に、必要量の歯根膜細胞を準備する。その後、96 well 細胞低吸着性細胞培養皿上で歯根膜細胞を培養し、細胞凝集塊を作製する。作製した細胞凝集塊を Kensan メソッドにより積層し、歯根膜細胞構造体の作製を試みた。

(2) 生体模倣チタンナノ表面が歯根膜細胞のセメント芽細胞分化に与える影響の検証

機械研磨面、酸処理ミクロ粗面またはナノ粗面のチタン円板上で、ヒト歯根膜細胞を培養し、基質石灰化の程度や、セメント芽細胞マーカーの発現、セメント質形成に特異性の高いリン代謝反応を、生化学的および細胞生物学的解析により評価した。

(3) 生体模倣チタンナノ表面が免疫細胞の炎症反応性や感染防御能に与える影響の検証

機械研磨面、酸処理ミクロ粗面またはナノ粗面のチタン円板上で、マウスマクロファージ細胞株 J774A.1 細胞を培養し、M1 または M2 分極マーカーの発現や、前破骨細胞に対する破骨細胞分化誘導促進効果を、生化学的および細胞生物学的解析により評価した。

(4) 歯周組織において、細胞外基質の剛性が炎症反応性に与える影響の検証

歯周組織の易炎症性の要因を検証するために、培養基面に用いられる弾性材料を用いて、硬い歯肉あるいは軟らかい歯肉の硬さを人工的に模した細胞培養基面を製作し、ヒトの歯肉から採取した歯肉線維芽細胞を培養することで、細胞外基質の硬さが歯肉線維芽細胞の結合組織線維の産生能と炎症性マーカーの発現に与える影響を生化学的および細胞生物学的解析により検証した。

(5) 歯根膜細胞構造体の移植術式の検証

野生型ラット上顎第一大臼歯を抜去し、骨欠損を作製後にチューブ状の歯根膜細胞構造体の埋植や、細胞構造体の脱落を防ぐために、チタン膜にて骨欠損部を被覆固定する術式の開発を試みた。

4. 研究成果

(1) Kensan メソッドによる歯根膜細胞構造体の作製

中空の 9 × 9 剣山上に配置する細胞凝集塊の位置と数の三次元的デザインや、細胞凝集塊の大きさ・形状に関する最適化を行い、ラット歯根膜細胞三次元構造体の作製に成功した。現在、培養日数や培養添加物などを検討しながら、チューブ状三次元構造体の成熟に関する最適化を行っている。

(2) 生体模倣チタンナノ表面による歯根膜細胞のセメント芽細胞分化の促進

機械研磨面や酸処理ミクロ粗面のチタン円板上でセメント質分化誘導培地にて 30 日間培養したヒト歯根膜細胞の基質石灰化度は低く、骨シアロタンパクなどのセメント質関連マーカーの発現に乏しかった。一方、生体模倣チタンナノ表面上の歯根膜細胞は、著しい骨シアロタンパクの発現と、協調した細胞外リン酸・ピロリン酸比とともに、セメント質に類似したカルシウム/リン比を示す硬度に石灰化した石灰化細胞外

基質を産生した。(Yamada, M., et al. ACS Appl Mater Interfaces, 2022.)

- (3) 生体模倣チタンナノ表面によるマクロファージの感染抵抗性の増強
機械研磨面やマイクロ粗面上のマウスマクロファージ細胞株は、炎症反応性に乏しい一方で、食作用の活動性は低く、また、分化誘導環境下にある前破骨細胞の破骨細胞分化を抑制しなかった。しかし、生体模倣チタンナノ表面上のマウスマクロファージ細胞株は、破骨細胞分化誘導因子の産生抑制や食作用の活性化へとマクロファージの機能を制御することが示された。(Kartikasari, N., et al. Acta Biomater, 2021; Sci Rep 12, 2022.)
- (4) 軟らかい細胞外基質による歯肉線維芽細胞の炎症反応性の促進
硬い細胞外基質は、細胞内の環境を感知する分子群を活性化し、炎症を司る分子の核内への移動を阻止することで、炎症を起こしづらい状態へと歯肉線維芽細胞を制御する可能性が示された。逆に、軟らかい細胞外基質では、細胞内の環境を感知する分子群が不活性化され、炎症を司る分子が核内へと移行しやすくなることで、炎症が起きやすく、かつ、細胞外基質の産生能が低い状態へと歯肉線維芽細胞の性質が変化することが明らかとなった。(Watcharaphol, T., et al. Sci Rep 12, 2023.)
- (5) 歯根膜細胞構造体の移植術式の確立
細胞構造体埋植 4 週後に組織学的に解析した結果、歯根膜細胞構造体単独では、骨欠損部内に歯周組織は再生されず、新生骨形成を促進することが明らかとなった。また、歯根膜細胞構造体をチタンインプラントに巻き付けた複合体の作製とラット上顎骨への埋植と定着に成功した。

以上の研究成果により、生体模倣チタンナノ表面は、ナノ表面形態の物理的刺激により、マクロファージを介した感染抵抗性の増強とともに、歯根膜細胞の分化をセメント質産生へと導くことが判明した。また、生体模倣チタンナノ表面インプラントと歯根膜細胞構造体との複合体は、細胞とインプラント表面との相互作用により、生体内で歯周組織を誘導する可能性が示唆された。現在、歯根膜細胞構造体をチタンインプラントに巻き付けた複合体をラット上顎骨へ埋植し、生体模倣チタンナノ表面インプラントの周囲組織の解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nadia Kartikasari, Masahiro Yamada, Jun Watanabe, Watcharaphol Tiskratok, Xindie He, Yuya Kamano, Hiroshi Egusa	4. 巻 1
2. 論文標題 Titanium surface with nanospikes tunes macrophage polarization to produce inhibitory factors for osteoclastogenesis through nanotopographic cues	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 316-330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2021.10.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada M, Kimura T, Nakamura N, Watanabe J, Kartikasari N, He X, Tiskratok W, Yoshioka H, Shinno H, Egusa, H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Titanium nanosurface with a biomimetic physical microenvironment to induce endogenous regeneration of the periodontium.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 27703-27719
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsami.2c06679	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 Kartikasari N, Yamada M, Watanabe J, Tiskratok W, He X, Egusa H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Titania nanospikes activate macrophage phagocytosis by ligand-independent contact stimulation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-16214-2	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 Tiskratok W, Yamada M, Watanabe J, Kartikasari N, Kimura T, Egusa H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Substrate stiffness controls proinflammatory responses in human gingival fibroblasts.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-28541-z	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山田将博
2. 発表標題 生体の物理的微小環境を模倣したチタンナノ表面による歯周組織再生
3. 学会等名 2021年度東北大学金属材料研究所共同研究ワークショップ・日本バイオマテリアル学会東北ブロック講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田将博
2. 発表標題 歯周組織再生型インプラントを用いた新たな補綴歯科治療技術の開発
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第129回学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田将博, 木村 剛, 中村奈緒子, 吉岡勇人, 新野秀憲, 江草 宏
2. 発表標題 生体内微小環境を再現したバイオマテリアルによる in situ 歯周組織再生
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamada M.
2. 発表標題 Endogenous regeneration of the periodontium on titanium implants with the biomimetic physical microenvironment.
3. 学会等名 FDCU International Symposium 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamada M.
2. 発表標題 Titanium implants with the cementum-mimetic microenvironment induce periodontal tissue regeneration.
3. 学会等名 The 2022 West China Dental International Frontier Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田将博
2. 発表標題 生体模倣ナノ表面インプラントによる in situ 歯周組織再生
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田将博
2. 発表標題 生体の “かたさ” と “かたち” を模倣したチタンナノ表面による in situ 歯周組織再生
3. 学会等名 第81回日本矯正歯科学会学術大会 & 第9回日韓ジョイントシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院歯学研究科 分子・再生歯科補綴学分野ホームページ
<http://crbr.dent.tohoku.ac.jp/index.html>

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	江草 宏 (Egusa Hiroshi) (30379078)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	中山 功一 (Nakayama Koichi) (50420609)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	

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