

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20K10053
研究課題名（和文）生体活性HiPIMS-DLCによるインプラント周囲炎の制御

研究課題名（英文）HiPIMS-DLC for Peri-implantitis Control

研究代表者

二川 浩樹（Nikawa, Hiroki）

広島大学・医系科学研究科（歯）・教授

研究者番号：10228140

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：インプラント周囲組織に生じる炎症性病変はインプラント周囲粘膜炎とインプラント周囲炎に分類され、インプラント喪失の要因の一つとされている。インプラント周囲炎の制御に最適なDiamond-like carbon (DLC) の創出を目指し、特にHigh Power Impulse Magnetron Sputtering (HiPIMS, 高出力インパルスマグネトロンスパッタリング) 法を用いたDLC成膜の有用性について、基盤的な知見を得ることを目的とした。本研究結果から、DLC薄膜の成膜法の違いによって、歯肉上皮細胞の増殖、破骨細胞および骨芽細胞の分化を制御できる可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔インプラントは、広く普及した成功率の高い歯科治療である。一方、インプラント治療の失敗は、オッセオインテグレーションを獲得できないことによる早期の予後不良と、獲得されたオッセオインテグレーションを維持できないことによる晩期の喪失に分類することができるとされている。本研究結果により、DLC薄膜によるインプラント治療の長期的安定に貢献しうる知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory lesions in peri-implant tissues are classified as peri-implant mucositis and peri-implantitis and are considered one of the causes of implant loss. The aim of this study is to investigate an optimal diamond-like carbon (DLC) for the control of peri-implantitis and to gain fundamental knowledge on the usefulness of DLC thin film deposition using High Power Impulse Magnetron Sputtering (HiPIMS). The results of this study demonstrated the possibility of controlling gingival epithelial cell proliferation, osteoclast and osteoblast differentiation by different DLC thin film deposition methods.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：HiPIMS DLC 破骨細胞 骨芽細胞 インプラント周囲炎

1. 研究開始当初の背景

口腔インプラント(以下、インプラント)は、広く普及した成功率の高い歯科治療である。一方、インプラント治療の失敗は、オッセオインテグレーションを獲得できないことによる早期の予後不良と、獲得されたオッセオインテグレーションを維持できないことによる晩期の喪失に分類することができるとされている。特にインプラント周囲の骨吸収は埋入後 1 年以内に起こることが多く、その程度はインプラントシステムにより異なるとされている。したがって、インプラント治療において早期のオッセオインテグレーション獲得および周囲の骨吸収の制御は、長期予後のために非常に重要である。

インプラント周囲組織に生じる炎症性病変はインプラント周囲粘膜炎とインプラント周囲炎に分類され、インプラント喪失の要因の一つとされている。2015 年のシステムティックレビューから、インプラント周囲粘膜炎には平均 43%、インプラント周囲炎には平均 22%の患者が罹患しているとされており、高い割合を示していることが明らかとなっている。

これまでに多くの研究において、より強固なオッセオインテグレーションの獲得を目指したインプラント体の表面改質・表面修飾が試みられている。現在、インプラントの表面に関する研究としては、表面形状に対するものと、チタン以外の材料による修飾・改質の二つのパターンが挙げられる。表面形状に関しては、機械研磨を施した滑沢な表面である smooth surface (表面粗さにおける算術平均高さ $Sa < 0.5\mu\text{m}$) もしくはチタン粉末をプラズマスプレーした rough surface (算術平均高さ $Sa > 2.0\mu\text{m}$) が使用されてきたが、現在は算術平均高さ $Sa = 1.5\mu\text{m}$ の moderately rough surface がインプラントの表面として相応しいと考えられている。表面修飾・改質に関しては、成長因子やサイトカイン、研究者の発想により設計されたペプチド等が研究されており、一定の成果が報告されている。

我々はこれまでに、Diamond-like carbon (DLC) による骨代謝制御を目的として研究を行ってきた。今回、インプラント体の表面改質としてふさわしい物理的および生物学的性質の向上を目的として、High Power Impulse Magnetron Sputtering (HiPIMS, 高出力パルスマグネトロンスパッタ) に注目した。HiPIMS は、高密度のプラズマを形成する手法の一つである。高性能な機能性薄膜を作製する上で有効な手段であり、ターゲット材料を、緻密で高硬度、高平滑で対摩擦摩耗特性を向上させ成膜することが可能になる。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに実施してきた DLC コーティングによる知見を応用し、高硬度化、平滑性および摩擦摩耗特性向上を追求した HiPIMS-DLC チタンを用いて、インプラント埋入初期の早期オッセオインテグレーションの獲得、骨リモデリングの安定化、インプラント周囲炎の制御を志向した研究を実施し、またそのメカニズムについて分子生物学的に検討を行う。

3. 研究の方法

研究期間内に、以下の *in vitro* および *in vivo* 実験を推進した。

HiPIMS-DLC 上でのマウス歯肉上皮細胞株の挙動

成膜条件の異なる 5 つの HiPIMS-DLC (以下、DLC) 成膜チタンを評価した。コントロールとして、純チタンを用いた。これらのチタンは直径 15mm の円板であり、24well プレートのウェルにほぼ同一サイズにて静置することができるようになっている。各種チタンをアセトンおよびエタノールで超音波洗浄後、オートクレーブで滅菌した。その後、チタン上でマウス歯肉上皮細胞株である GE1 細胞を培養し、その増殖を alamarBlue Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて評価した。

HiPIMS-DLC 上でのマウス破骨細胞前駆細胞株およびマウス骨芽細胞株の挙動

上記の 5 つの DLC 成膜チタンおよびコントロールチタン上で、マウス破骨細胞前駆細胞株 RAW264.7 細胞およびマウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を培養した。破骨細胞および骨芽細胞分化マーカーの発現を、real-time quantitative RT-PCR 法により評価した。また、MC3T3-E1 細胞の分化を、ALP 活性を計測し評価した。

マウスオッセオインテグレーションモデルの確立

我々はこれまでに、ラットに埋入したミニインプラント周囲に *Porphyromonas gingivalis*-LPS を作用させることにより、インプラント周囲炎様の病態を引き起こすモデルを作製している (Shuto et al., *J Dent Sci*, 2016)。実験動物の中でもマウスは、免疫学および分子生物学的解析のためのアプリケーションが豊富であり、病態メカニズム解明のためのモデルとして広く使用されている。そこで本研究では、新たにマウスの抜歯窩に、上部構造様の領域を有す

る純チタン製ミニインプラントを即時埋入するマウスオッセオインテグレーションマウスモデルを作製した。

本研究は広島大学動物実験委員会の承認を得て実施した（承認番号：A19-119）。雌のC57BL/6Jマウスを、三種混合麻酔（塩酸メドミジン 0.3mg/kg、ミタゾラム 4mg/kg、酒石酸ブトルファノール 5mg/kg, 100ml/kg）下で上顎第一大臼歯を抜歯した。その後、遠心舌側抜歯窩を含む位置にスチールバー（ラウンド株式会社モリタ）を用いて埋入窩を形成した。純チタン製のミニインプラント（スクリュー部：長さ 1.0mm，直径 1.0mm，上部構造部：長さ 0.5-0.7mm）を，形成した埋入窩に持針器を用いて即時埋入した。オッセオインテグレーションの獲得は、マイクロ CT（Skyscan1176，BRUKER）により評価した。

4. 研究成果

HiPIM-DLC 上でのマウス歯肉上皮細胞株の挙動

インプラント周囲の軟組織による封鎖はインプラント体と骨組織の結合と同様に、インプラント治療に重要な因子であるとされている。本事件では、DLC 成膜と歯肉上皮の関係に対する基礎的な知見を探索した。マウス歯肉上皮細胞株である GE1 細胞を DLC 成膜チタンおよびコントロールチタン上で培養した結果、特定条件の DLC 上でコントロールチタンよりも高い細胞増殖能を示すことが明らかとなった。

HiPIM-DLC 上でのマウス破骨細胞前駆細胞株およびマウス骨芽細胞株の挙動

マウス破骨細胞前駆細胞株 RAW264.7 細胞を、可溶性 RANKL 存在下で DLC 成膜チタンおよびコントロールチタン上で培養した。その結果、破骨細胞分化マーカーの発現は、コントロールチタン上で培養するよりも低い値を示した。しかしながら、発現パターンは DLC の成膜条件により異なっていた。

マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を、DLC 成膜チタンおよびコントロールチタン上で培養した。その結果、骨芽細胞分化マーカーの発現は、コントロールチタン上で培養するよりも高い値を示した。しかしながら、MC3T3-E1 細胞における骨芽細胞分化マーカーについても RAW264.7 細胞の解析結果と同様に、その発現パターンは DLC の成膜条件により異なっていた。

上記の *in vitro* 実験により、DLC 成膜により歯肉上皮細胞の増殖、破骨細胞および骨芽細胞の分化を制御できる可能性を明らかにした。その一方で、最適と想定される DLC の成膜法は、対象となる細胞ごとに異なることが示唆された。今後は、インプラントの部位によって異なる成膜方法を検討する必要があると考える。

マウスオッセオインテグレーションモデルの確立

本実験では、上部構造様の領域を有する純チタン製ミニインプラントを即時埋入することで、実際のインプラント治療の再現を試みた。ミニインプラント埋入後、上部構造部縁下において歯肉の増殖が認められ、ミニインプラントと歯肉は緊密に接触していた。また、埋入から 21 日後においても上部構造部は歯肉に被覆されることなく、口腔内に露出していることが確認された。さらに、マイクロ CT による解析の結果より、ミニインプラント埋入後から経時的にスクリュー部周囲に骨形成が認められた。

これまでに報告のあるインプラント埋入モデルマウスは、口蓋内に非スクリュー型インプラントを埋入したものや、チタン合金製インプラントを上顎第一大臼歯と切歯との歯槽堤上の中点に埋入したもの、表面加工したチタン合金製スクリュー型インプラントを上顎第一大臼歯と切歯との間に埋入したものなどがある。上部構造様の領域を持ち、即時埋入により作製する本マウスモデルは、インプラントに関連して発症する病態メカニズムのより詳細な解析への応用が期待できる。

以上の本研究成果は、DLC 薄膜によるインプラント治療の長期的安定に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mine Yuichi, Okuda Karin, Yoshioka Reina, Sasaki Yuuki, Peng Tzu-Yu, Kaku Masato, Yoshiko Yuji, Nikawa Hiroki, Murayama Takeshi	4. 巻 110
2. 論文標題 Occlusal Trauma and Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Calcified Tissue International	6. 最初と最後の頁 380 ~ 392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00223-021-00916-2	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 該当する

1. 著者名 Yoshioka Reina, Mine Yuichi, Kaku Masato, Nikawa Hiroki, Murayama Takeshi	4. 巻 150
2. 論文標題 Lansoprazole and zoledronate delays hard tissue healing of tooth extraction sockets in dexamethasone-treated mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 112991 ~ 112991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2022.112991	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 Ito Rei, Mine Yuichi, Yumisashi Yoshie, Yoshioka Reina, Hamaoka Misa, Taji Tsuyoshi, Murayama Takeshi, Nikawa Hiroki	4. 巻 7
2. 論文標題 In Vivo Efficacy of Lacticaseibacillus rhamnosus L8020 in a Mouse Model of Oral Candidiasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Fungi	6. 最初と最後の頁 322 ~ 322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jof7050322	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	峯 裕一 (Mine Yuichi) (60605989)	広島大学・医系科学研究科(歯)・講師 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	田地 豪 (Taji Tsuyoshi) (80284214)	広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授 (15401)	

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