

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791951

研究課題名（和文）接着タンパク制御による新たなインプラント材料の解明

研究課題名（英文）The development of implant material by controlling adhesive protein

研究代表者

国分 栄仁 (KOKUBU EITOYO)

東京歯科大学・微生物学講座・助教

研究者番号：70453785

研究成果の概要（和文）：チタンディスクを作成し、表面研磨およびサンドエッチング・ブラスト処理を施したチタンディスクの試料を作成した。また、マラッセ上皮遺残細胞を12継代まで培養を行い、経時的加齢モデルとして実験に用いた。マラッセ細胞は試料上にて培養し、通常培養と比較して細胞増殖の割合、細胞形態の伸展に変化が認められ、接着関連タンパクである Total-ErkおよびFocal adhesive kinaseの発現が減少した。

研究成果の概要（英文）：The titanium substance treated with polish or sandblast-etched were made. The epithelial rests of malassez were cultured on the substance to evaluate the aging with time. The cells were decrease a proliferation and a expression of total-ERK and focal adhesive kinase protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯科インプラント学

## 1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、接着タンパク制御による新たなインプラント材料を解明することである。歯科インプラントは欠損歯列の機能回復治療のひとつとして用いられているが、口腔内に露出しているために感染経路になり易い。その理由として口腔粘膜組織とインプラント体との接着界面にある内側基板の発達が脆弱で周囲との封鎖性は弱く、また上皮組織から分泌される抗菌タンパクの分泌量が低下するために、インプラント周囲炎を引き起こすことが挙げられる。つまりインプ

ラント治療成功の可否は骨組織との良好なオッセオインテグレーションを獲得するだけでなく、周囲結合組織および口腔粘膜組織との接着性も重要な成功因子となる。そのため歯科インプラントに粘膜上皮、結合組織とも密に接着する形状を付与し、生物学的封鎖の向上を高める必要があると考える。さらにインプラント埋入した患者は経時的に加齢する。維持するためには生体の状態に適した、あるいは状態変化にも対応したインプラントを開発する必要がある。

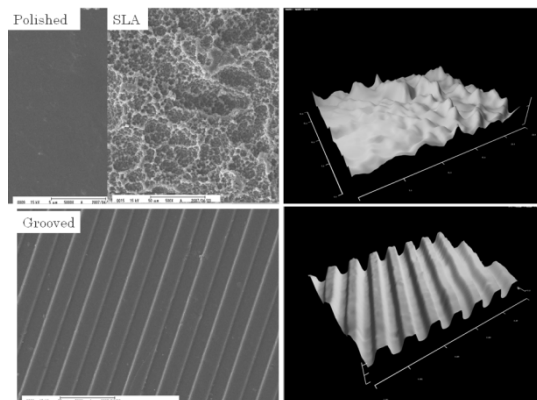
## 2. 研究の目的

基質表面上での細胞の動態は、表面形状や性状の違いが細胞の接着、移動、増殖そして分化に影響を与えることが知られている。基質表面に細胞が接着するとインテグリンの集積を誘導し、Focal adhesion kinase (FAK) が集積して分子間で自己リン酸化が起こる。FAK 複合体は後に続く細胞内シグナリング相互作用を行うための重要な役割となる。シグナリング相互作用によって細胞内のタンパク質はリン酸化、脱リン酸化が繰り返し起こり、細胞の機能を維持する。Extracellular Regulated Kinase 1/2 (Erk 1/2) は細胞内で多くのタンパクと相互作用を持ち、細胞の増殖および分化に関与するほか、細胞接着や移動に関しても細胞外にシグナリングを伝達する。これらのシグナリング相互作用は表面形状が異なると細胞の形態学的変化だけではなく、タンパク発現量や発現時間にも違いが生じ、細胞の増殖と分化に影響を与えるため、インプラント周囲組織に対する最適な表面形状を検索する必要がある。

また、細胞のタンパク発現量は表面形状の違いだけではなく、エイジングによっても変化する。エイジングによる口腔内の生体変化には  $\beta$ -defensin-2 の発現量が低下や、細胞増殖の低下とアポトーシスの増加などが挙げられる。若年に比較すると生体防御反応および細胞動態の低下が認められ、通常のインプラント治療においても接着界面が脆弱であり、抗細菌タンパクの分泌が低下することから、エイジングにおいてもインプラント周囲の生物学的封鎖を獲得するために緊密な接着が必要であると考えられる。そのためにインプラントと周囲組織の関係は、エイジングに対応できる表面形状の解明が必要であると考へた。

## 3. 研究の方法

インプラント周囲組織に対する最適な形状を調べるために、機械研磨(Smooth)、ブラスト処理(TPS)および溝(Groove)を付与した3種類の表面形状モデルをチタン表面に加工した(写真下)。

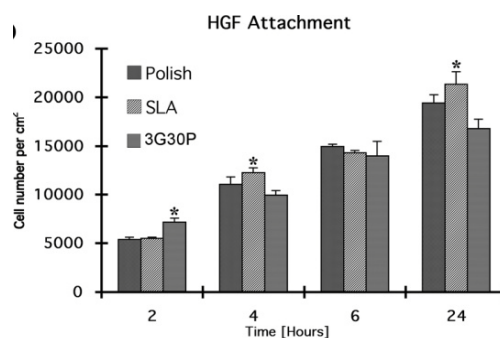
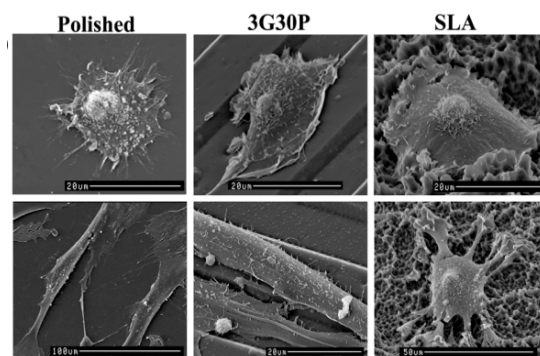


それぞれの試料を用いて若年と加齢ラットモデルから採取した骨芽細胞、歯肉線維芽細胞および口腔内上皮細胞を培養し、接着に関するタンパクの発現および各細胞特有の機能発現を組織学的および分子学的に検索する。また、チタン表面に FGF-2、EGF および NGF の各成長因子を吸着させ、インプラント表面上での各細胞の動態を検索することにより、エイジング変化に対応したインプラント表面形状の解明を明らかにする。

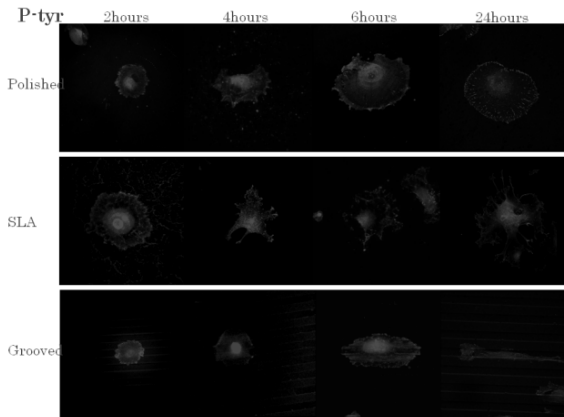
15mm のチタンディスクを作成し、研磨、SLA および Groove の表面処理を行い、その上に培養細胞を播種した。細胞は歯肉線維芽細胞を用いて試料上に培養開始後 1、12、24 時間および 3、7、10、14 日例で標本を採取した。検索項目は、形態学的検索に蛍光抗体法を用いて phospho-tyrosine、total-Erk、total adhesion kinase を検索し、分子学的検索として mRNA 遺伝子発現を PCR 法にて骨髄細胞は Alkaline Phosphatase、Osteopontin および Osteocalcin mRNA の検索、歯肉線維芽細胞は Type I collagen および VEGF (Vascular endothelial growth factor) mRNA の検索、口腔粘膜上皮細胞は  $\beta$ -Defensin および  $\alpha$ -Defensin mRNA 遺伝子発現の検索を行った。

## 4. 研究成果

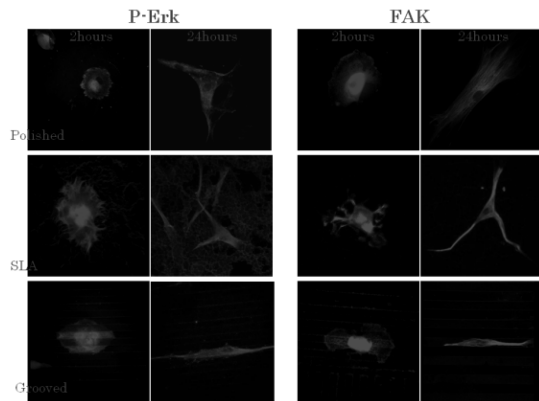
チタン表面処理を行った上での培養は、通常培養と比較して細胞増殖の割合、細胞形態の伸展に変化が認められ、接着タンパクの発現が減少した。細胞接着数は 2 時間例では Groove 上での細胞数が優位さを持ち多くの s 付着が認められたが、24 時間例では SLA 表面上での細胞が多くなった(写真下)。



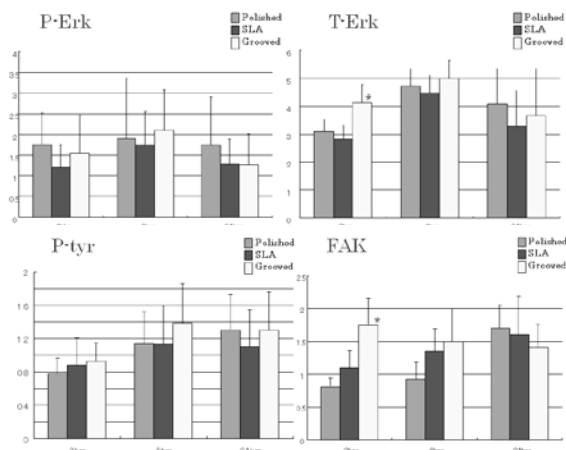
また、タンパク発現に関して、2時間例では細胞の形態にあまり変化が見られなかったが、4時間例から変化を認め、研磨試料上では細胞は核を中心に同心円状に広がり、SLA試料上では放射線状に広がりを見せ、溝を付与した試料上では溝にそって細胞が進展したのを確認した(写真下図)。



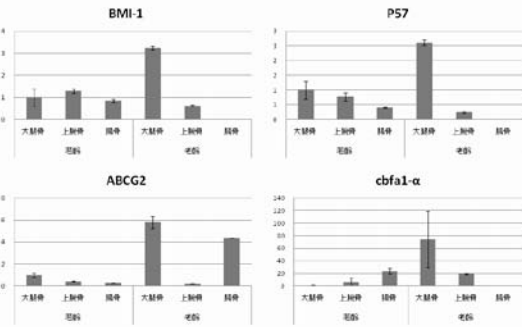
タンパク発現の共焦点顕微鏡による観察ではP-Erkの発現はSLAおよびGroove上の細胞は2時間例で強く発現し、FAKタンパク発現は2時間例および24時間例で強く認められた(写真下図)。



ウェスタンブロッティングによる接着関連タンパクの検索では、2時間例のSLA試料上での培養細胞でFAKおよびTotal-Erkのタンパク発現量の増加が認められた。しかしながらその他の時間例では有意差が認められなかった(下図)。



骨髄細胞の分子学的検索では経時的变化を検索するために、PCR法を用いて細胞増殖および骨形成因子であるBMI-1およびcbfa1- $\alpha$ 発現量の変化を検索した結果、経時的变化としてmRNA発現量の増加が認められた。P57遺伝子発現変化から細胞老化が認められた。また、ABCG2発現量は経時变化に関わらず発現が認められた(下図写真)。



以上の結果より、各種表面処理を行ったチタン試料を用いて経時的加齢を想定した実験が可能であった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 件)

- ① 国分栄仁、Hamilton DW、井上孝、Behavior of rat periodontal ligament cells on fibroblast growth factor-2 immobilized titanium surfaces treated by plasma modification、Journal of biomedical materials research. Part A 91、pp.69-75、2009、査読あり
- ② 山脇健史、松坂賢一、国分栄仁、井上孝、Effects of epidermal growth factor and/or nerve growth factor on Malassez's epithelial rest cells *in vitro*: expression of mRNA for osteopontin, bone morphogenetic protein 2 and vascular endothelial growth factor、Journal of Periodontal Research、45(3)、pp.421-7、2010. 査読あり
- ③ 監物真、松坂賢一、国分栄仁、東俊文、井上孝、Analysis of side population cells derived from dental pulp tissue、International Endodontic Journal、43(12)、pp.1132-42、2010、査読あり
- ④ 佐藤大輔、松坂賢一、国分栄仁、井上孝、Effect of mechanical loading on cultured osteogenic cells derived from different stages of bone wound

healing in rats: experimental models for immediate or early implantation, Oral Medicine & Pathology, 14, pp.143-151, 2010、査読あり

- ⑤ 松坂賢一、国分栄仁、他 6名、Age-related differences in the expression of heat shock protein 27 by rat periodontal ligament cells in culture, Oral Medicine & Pathology, 14, pp.131-134, 2010、査読あり

〔学会発表〕(計1件)

国分栄仁、稲垣覚、君塚隆太、石原和幸、*Treponema denticola* の細胞侵入に対する Malassez 上皮遺残細胞の細胞動態、第 52 回 歯科基礎医学会学術大会・総会、2010 年 9 月 20-22 日、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

国分 栄仁 (KOKUBU EITOYO)

東京歯科大学・微生物学講座・助教

研究者番号：70453785