

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592191

研究課題名（和文）

新規化学修飾法によるチタン表面での靱帯様組織の形成と上皮シールの確立

研究課題名（英文）Establishment of ligament-like tissue and tight epithelial seal on chemically modified titanium surfaces.

研究代表者

古市 保志（YASUSHI FURUICHI）

北海道医療大学 歯学部 教授

研究者番号：80305143

研究成果の概要（和文）：

我々は、インプラントの細菌に対する防御機構の脆弱性を改善すべく、インプラント表面に天然歯同様の歯根膜様靱帯組織を獲得させることを目指している。本研究では、インプラント周囲に歯根膜様靱帯組織を構築するために必要な、歯根膜由来間葉系幹細胞の効率的な培養法として FGF-2 添加培養が適していること、および歯根膜様靱帯組織を構築するために適したインプラント表面として、I 型コラーゲンを固定化したインプラント表面が適していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We have performed studies aiming at improving the defense ability for bacterial infection of peri-implant soft tissues by establishing the periodontal ligament-like tissues around the titanium implant. It was indicated in the study that (i) FGF-2 was effective in culturing periodontal ligament stem cells, which are considered to be inevitable for establishing periodontal ligament-like tissues around dental implants, and that (ii) titanium surface immobilized with type I collagen was suitable for developing periodontal ligament-like tissues on the surface.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	800,000	240,000	1,040,000
23 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
24 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：ジルコニア・チタン・ヒト歯根膜細胞・ヒト歯肉上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

1969 年にブローネマルクらが、チタン製インプラント表面におけるオッセオインテグレーションの獲得を報告して以来、インプラント治療の適応範囲が拡大している。歯周病の既往がある患者へのインプラント治療は、歯周病の既往がない患者と比較して、インプラント周囲炎に罹患しやすくなる可能性があることが報告されている。イ

ンプラント周囲粘膜組織は、その構造の特徴により防御機構が脆弱であることが報告されている。この脆弱性は、インプラント周囲の線維がインプラントの表面に対して平行に走行していることや、インプラント周囲上皮にはインプラント表面に接着する際に重要な役割を担うヘミデスモゾームが少ないことに由来している。そのため、インプラント周囲の線維が、インプラント表面に対して

垂直に走行する歯根膜様組織を構築できるインプラント表面や、インプラント周囲上皮に存在するヘミデスモゾームを増加させるインプラント表面の開発が検討されている。

インプラント周囲に歯根膜様構造を構築するためには、成長因子、歯根膜様構造を構築しうる細胞、その細胞の足場となるチタン表面が必要となる。近年、歯根膜細胞群中に未分化間葉系幹細胞が存在することが明らかにされている。また、生体機能性分子として細胞外マトリクスであるフィブロネクチン、フィブロネクチンの主要活性部位である Arg-Gly-Asp ペプチド、あるいは I 型コラーゲンを種々の結合分子を介して固定化したチタン表面が細胞に与える影響についていくつか報告されている。しかしこれらの報告には、生体中に存在する数の少ない歯根膜幹細胞をいかに効率良く採取するかについて、あるいは、純チタン表面に固定化した種々の生体機能性分子が細胞に与える影響を調べた報告は少ない状況である。

2. 研究の目的

(1) ヒト抜去歯の歯根膜細胞群中に占める歯根膜由来間葉系幹細胞の割合の測定、および FGF-2 が歯根膜由来間葉系幹細胞の増殖と分化能に与える影響の検討を行う。

(2) 純チタン表面の固定化した種々の生体機能性分子が細胞に与える影響の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト抜去歯の歯根膜細胞群中に占める歯根膜由来間葉系幹細胞の割合の測定、および FGF-2 が歯根膜由来間葉系幹細胞の増殖と分化能に与える影響を検討。

① FGF-2 がヒト歯根膜細胞群中に占める STRO-1⁺/CD146⁺細胞の割合に与える影響の検討

FGF-2 添加培養 10 日後におけるヒト歯根膜細胞群中に占める STRO-1⁺/CD146⁺細胞の割合をフローサイトメトリーによって解析した。

② ヒト歯根膜細胞群から分取した STRO-1⁺/CD146⁺細胞の自己複製能および多分化能の確認

ヒト歯根膜細胞群から分取した STRO-1⁺/CD146⁺細胞の自己複製能は、コロニーの形成を位相差顕微鏡による観察で確認した。多分化能の確認は、ヒト歯根膜細胞群から分取した STRO-1⁺/CD146⁺細胞を脂肪細胞および骨芽細胞に分化させることで確認した。

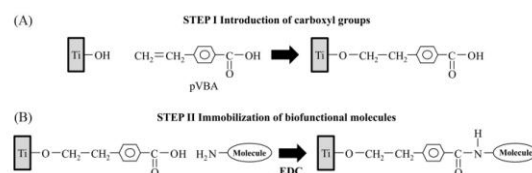


図1. 生体機能性分子をチタン表面へ固定化する過程の概略図

(A): チタン表面にカルボキシル基を導入する。

(B): 導入したカルボキシル基に生体機能性分子を固定化する。

pVBA: p-ビニル安息香酸、EDC: 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド

(2) 純チタン表面の固定化した種々の生体機能性分子が細胞に与える影響の検討

① 純チタン表面に生体機能性分子を固定化する新規化学修飾法の検討

表面を鏡面に仕上げた純チタン (JIS 第 2 種) 試料を 1% p-Vinylbenzoic acid (pVBA) 溶液に室温で 2 時間浸漬し、その後、Gly-Arg-Gly-Asp-Ser ペプチド (GRGDS)、フィブロネクチン (pFN) あるいは I 型コラーゲン (Col1) を脱水縮合反応によってチタン表面に固定化した (GRGDS-im, pFN-im, Col1-im) (図 1)。

固定化の確認は、X 線光電子分光法、フーリエ変換型赤外分光分析を用いて行った。

② 純チタン表面の固定化した種々の生体機能性分子がヒト歯根膜細胞群に与える影響の検討

初期付着細胞数の計測および走査型電子顕微鏡・共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞の形態学的観察から、種々の生体機能性分子を固定化した各純チタン表面がヒト歯根膜細胞群に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト抜去歯の歯根膜細胞群中に占める歯根膜由来間葉系幹細胞の割合の測定、および FGF-2 が歯根膜由来間葉系幹細胞の増殖と分化能に与える影響の検討

ヒト歯根膜細胞群のフローサイトメトリー解析の結果、FGF-2 添加培養 10 日後におけるヒト歯根膜細胞群中に占める STRO-1⁺/CD146⁺細胞の割合は平均で 0.43 ± 0.64% であり、FGF-2 非添加培養群 (0%) に比較して有意に増加した。

次に、ヒト歯根膜細胞群から STRO-1⁺/CD146⁺細胞のみを分取した。分取した細胞群の位相差顕微鏡像では、いずれにおいてもコロニー形成がみられ、その形態は紡錘形を呈した。対照細胞となる骨髄間葉系幹細胞の形態は多角形を示した。

また、ヒト歯根膜細胞群から分取した STRO-1⁺/CD146⁺細胞における歯根膜特異的マーカーの発現を検討したところ、PLAP-1、periostin、S100A4、scleraxis の mRNA 発

現がみられた。

さらに、ヒト歯根膜細胞群から分取した STRO-1⁺/CD146⁺ 細胞を脂肪細胞に分化させるため培養したところ、脂肪細胞分化マーカーである PPAR γ 及び LPL の mRNA を発現しており、オイルレッド O 染色で脂肪の蓄積が観察された。さらに、骨芽細胞に分化させるために培養したところ、骨関連マーカーである Runx2、Col I、OCN の mRNA を発現しており、アリザリンレッド染色陽性の石灰化塊の形成が観察された。

以上の結果から、FGF-2 添加培養は歯根膜由来間葉系幹細胞である STRO-1⁺/CD146⁺ 細胞の分化能を維持させたまま、その割合を増加させることが明らかとなった。歯根膜由来間葉系幹細胞の歯周組織再生療法への応用には、FGF-2 添加培養が有用である可能性が示唆された。

(2) 純チタン表面の固定化した種々の生体機能性分子が細胞に与える影響の検討

表面を鏡面に仕上げた純チタン (JIS 第 2 種) 試料をコントロールとした。実験群として、研磨した純チタン試料を 1% p-Vinylbenzoic acid (pVBA) 溶液に室温で 2 時間浸漬し、その後、Gly-Arg-Gly-Asp-Ser ペプチド (GRGDS)、フィブロネクチン (pFN) あるいは I 型コラーゲン (Col) を脱水縮合反応によってチタン表面に固定化した試料を用いた (GRGDS-im、pFN-im、Col-im)。pVBA を結合させた純チタン表面では、超音波洗浄後においてもチタン表面に結合した pVBA に由来するメチレン基、ベンゼン環およびカルボキシル基による吸収のピークがフーリエ変換型赤外分光高感度反射により観察され、本化学修飾法により pVBA がチタン表面に結合されていることが確認された。また、X 線光電子分光法による分析の結果、超音波洗浄後においてもコントロールおよび GRGDS を物理吸着させた試料と比較して、GRGDS-im では 400.3 eV に N 1s スペクトルの明瞭なピークが観察された。

ヒト歯根膜細胞群の各チタン表面に対する初期付着細胞数を計測したところ、pFN-im および Col-im では、コントロールと比較して 2 倍以上の細胞が付着していた。さらに、両細胞とも pFN-im および Col-im では、コントロールおよび GRGDS-im と比較して明らかに細胞骨格が発達していた。pFN-im および Col-im における hBMSC のビンキュリンの発現は、コントロールおよび GRGDS-im と比較して、アクチンフィラメントに沿って広範囲に強く発現していた。また、Col-im における hPDLcs のビンキュリ

ンの発現は、コントロール、GRGDS-im および pFN-im と比較して、アクチンフィラメントに沿って広範囲に強く発現していた。

以上の結果から、本研究で検討した化学修飾法を応用し、生体機能性分子を純チタン表面に固定化できることが明らかとなった。チタン表面への歯根膜様組織の構築にはコラーゲンを固定化したチタン表面が適していることが示唆された。

(3) 得られた成果の国内外における位置づけおよび今後の展望

生体中に存在する数の少ない歯根膜幹細胞を効率良く採取する方法、および、純チタン表面に固定化した種々の生体機能性分子が細胞に与える影響を調べた報告が少ない現状を考えると、本研究において得られた知見は、非常に貴重なものと考えられる。

今後は、コラーゲンを固定化したチタン表面にエナメルマトリクスタンパク質 (EMD) を吸着ではなく固定化し、ヒト歯根膜由来細胞群にそのチタン表面を作用させた場合の細胞の動態および分化を解析する。

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 2 件)

1. Hidaka T., Nagasawa T., Shirai K., Kado T., Furuichi Y. FGF-2 induces proliferation of human periodontal ligament cells and maintains differentiation potentials of STRO-1⁺/CD146⁺ periodontal ligament cells. Archives of Biology 57, 830-840, 2012
DOI:10.1016/j.archoralbio.2011.12.003 査読有り
2. Kado T., Hidaka T., Aita H., Endo K., Furuichi Y. Enhanced compatibility of chemically modified titanium surface with periodontal ligament cells. Applied Surface Science 262, 240-247, 2012
<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.07.091> 査読有り

[学会発表] (計 19 件)

1. Tatsuhiro Hidaka, Toshiyuki Nagasawa, Takashi Kado, Kaname Shirai, Yasushi Furuichi
Effect of FGF-2 on human periodontal ligament STRO-1⁺/CD146⁺ cells
The 88th General Session & Exhibition

of the International Association
for Dental Research, Barcelona,
Spain, 2010

2. Takashi Kado, Tatsuhiro Hidaka,
Hideki Aita, Kazuhiko Endo,
Yasushi Furuichi
Enhanced compatibility of
chemically-modified titanium
surface with periodontal ligament
cells
The 3rd international Symposium on
Surface and Interface of
Biomaterials, Sapporo, 2011

[その他]

ホームページ等

<http://www.hoku-iryo-u.ac.jp/~perio/periodo2/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

古市 保志 (FURUICHI YASUSHI)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号：80305143

(2)研究分担者

遠藤 和彦 (ENDO KAZUHIKO)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号：70168821

(3)連携研究者

なし