

## 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 5 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890143

研究課題名（和文） ナノ加工チタンインプラントの臨床応用に向けた骨治癒関連遺伝子のプロファイリング

研究課題名（英文） Gene expression profiling of the bone healing response for clinical application of nanotextured titanium implants

研究代表者

黒田 晋吾（KURODA SHINGO）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：40332796

研究成果の概要（和文）：チタン合金製スクリュー表面を酸処理にてナノ加工し、ラット脛骨に植立した。その3日から5日後にスクリュー周囲の骨組織を採取しDNAマイクロアレイを用いて、発現遺伝子をプロファイリングした。その結果、ナノ加工スクリューでは、タンパク質代謝および修飾、シグナル伝達、免疫反応に関連する多くの遺伝子の発現様相が変化し、また骨形態計測では、骨-インプラント接触が有意に増加していた。これらのことから、ナノ加工チタンインプラント周囲の異なった遺伝子発現が、周囲骨の治癒促進に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Untreated and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated machined-surface titanium alloy implants were placed in rat tibiae. Samples were processed for DNA microarray analysis and histomorphometry. At both 3 and 5 days, the gene expression profile of the healing tissue around nanotextured implants differed from that around machined surface ones or control empty holes, and on day 5 were accompanied by increase in bone-implant contact. While some standard pathways, such as the immune response, predominated a number of unclassified genes were also implicated. In conclusion, nanotexture elicits an initial gene response that is more complex than so far suspected and that favors healing at the bone-implant interface.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 矯正・小児系歯学

キーワード：ナノ加工、骨治癒、遺伝子発現、マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

チタンおよびチタン合金は、生体親和性の高い医用金属材料として、整形外科や心臓血管外科、歯科など様々な領域において、広く用いられている。特に歯科・口腔外科領域では、腫瘍摘出や骨折後の顎骨再建や人工顎関節の他に、歯牙欠損部補綴のためのデンタルインプラントなどに重用されている。また近

年、歯科矯正治療においても、チタン合金製のミニスクリューやプレートが、歯の移動のための固定源として、広く用いられるようになった(Kuroda S, Tanaka E, Semin Orthod 2011;17:91-7)。チタン合金は、単に生体内に為害性なしに受け入れられるばかりでなく、その宿主の細胞や組織と結合する特性がある。特にチタンと骨の結合（オッセオインテ

レーション)においては、組織とインプラント表面での初期反応が重要であり、その組成や roughness、topography などの表面性状が、その反応に影響を及ぼすと考えられている。しかし、これらの表面性状がどのようにして、インプラント周囲組織の生物学的活性を決定しているかは、未だ明らかではない。

オッセオインテグレーションを促進するため、ハイドロキシアパタイトなどによるコーティングなど、様々な工夫が提案されてきた。しかし、不活性非結晶の  $\text{TiO}_2$  の表面は固有に優れた生体親和性を持つことから (Ratner BD et al., *Biomaterials Science*, Elsevier Academic Press, 2004)、表面性状の物理的な改良が、早期のオッセオインテグレーション獲得に効果的と考えられる。そこで、サンドブラスト、機械加工、酸による化学処理などの表面処理が試みられてきた。しかし、これらの処理はマイクロ単位であり、細胞の機能レベルに作用するものではない。そこで近年、ナノ単位の表面処理が注目されている (Variola F et al., *Nanoscale* 2011;3:335-53.)。特殊に作られたチタン表面のナノ形状が周囲組織の細胞に対して選択的に影響を及ぼし、その活動を刺激することが報告されている (Liu H, Webster WJ., *Biomaterials* 2006;28:354)。よって、ナノ単位での表面性状は、インプラント材料のさらなる発達の鍵を握るものと考えられる。しかし、生体内でのチタン周囲骨の治癒に関与する細胞の遺伝子レベルでの制御や、最良の治療法については未だ解明されておらず、遺伝子レベルでの研究が急務である。

## 2. 研究の目的

チタンインプラントのナノ加工が、埋入後のオッセオインテグレーションに及ぼす影響を、遺伝子発現のプロファイリングによって解明し、さらにその促進を遺伝子レベルで図ることの可能性を開くことである。

## 3. 研究の方法

### (1)骨形態計測

①チタン合金 (Ti6Al4V) 製のディスク (直径 10 mm) 及びミニスクリュー (直径 1.4 mm、長さ 3 mm) を濃硫酸と過酸化水素水の 1:1 混合液に 120 分間浸漬し、表面をナノ加工した (実験群)。

②実験群及び対照群のスクリューを、プレドリリング後に、ラットの脛骨に埋入した。全身麻酔後、剃毛し骨膜が露出するように皮膚切開し、直径 1 mm のフィッシャーバーでプレドリリングを行い、ハンドドライバーにてスクリューを植立した。片側に対照群及び実

験群のスクリューをそれぞれ 1 本ずつ埋入した。また、骨欠損部の治癒様相を観察するため、一部のラットはプレドリリングのみとする (empty hole 群)。処置後、メタルクリップで創部を縫合し、鎮痛剤を投与した。

③処置から 1、3、5、7 日後にラットを麻酔後、カコジル酸緩衝パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行い、脛骨を採取した。アルコールによる脱水後、メチルメタクリレート (テクノビット 9100) に包埋した。表面研磨後に、スクリュー周囲における骨治癒様相 (石灰化) を、走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。

④滑走型マイクロトームにて薄切片を作成し、2-MEA を用いて脱レジン後 Goldner-trichrome 染色を行い、光学顕微鏡下で骨形態計測を行った。インプラント-骨接触 (BIC) 及び新生骨量を計測し、ナノ加工が骨治癒に及ぼす影響を分析した。

### (2)DNA マイクロアレイによる遺伝子プロファイリング

①実験群及び対照群のスクリューを、プレドリリング後に、ラットの脛骨に埋入した。

②処置から 1、3、5、7 日後に全身麻酔下で、直径 2 mm のトリフィンバーを用いて、スクリュー及び empty hole 周囲の骨組織を採取した。採取した組織をホモゲナイザーで懸濁し、得られた RNA を低温保存した。

③イルミナ社の DNA マイクロアレイ (Illumina® RatRef-12) を用いて、発現遺伝子のプロファイリングを行った。

④プロファイリングの結果の解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1)酸処理によるナノ加工

濃硫酸と過酸化水素水を用いた酸処理により、チタン表面にナノ構造を構築することができた (図 1 右)。本方法は、低コストで簡便であるとともに、再現性も高く、将来的な臨床応用を見据えた上で、有用な方法と考えられる。

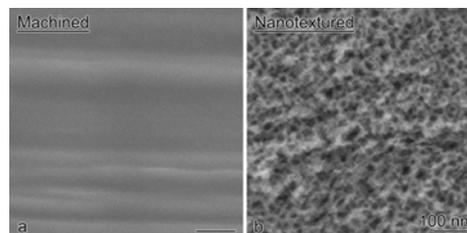


図 1 ナノ加工したチタン表面の SEM 像

### (2)骨形態計測

スクリーへの植立から5日後において、ナノ加工処理を行ったチタンスクリーは、対照群のスクリーと比較して、周囲骨における骨量の増加は認めなかったが、BICの有意な増加を認めた(図2、3)。SEMを用いた検討においても、ナノ加工を行ったスクリーでは、対象群に比較してBICの有意な増加を認めた。

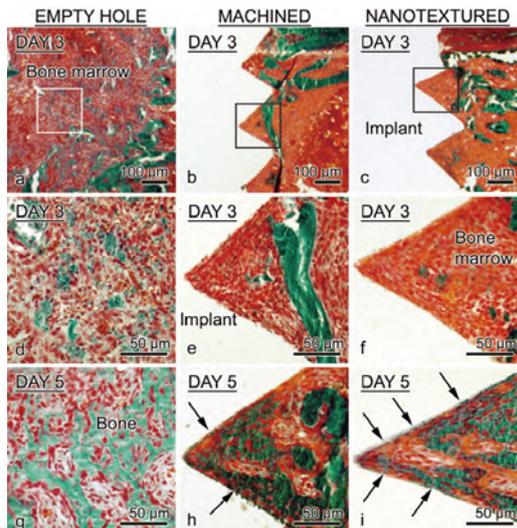


図2 Goldner-trichrome 染色

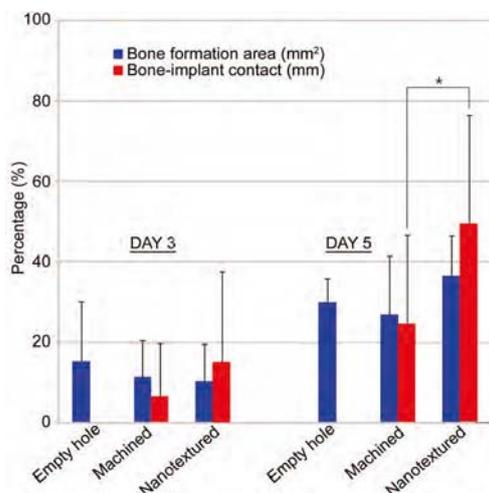


図3 骨形態計測

### (3) DNA マイクロアレイ

骨治癒部に empty hole 部、実験群(ナノ加工スクリー)および対照群で、それぞれ異なった遺伝子発現を認めた。特に、タンパク質代謝および修飾、シグナル伝達、免疫反応に関連する多くの遺伝子の発現様相に変化が認められた(図4)。

これらのことから、ナノ加工チタンインプラント周囲の異なった遺伝子発現が、周囲骨の治癒促進に寄与している可能性が示唆さ

れ、将来的な遺伝子レベルでの骨治癒促進法の確立の一助となる成果が得られた。

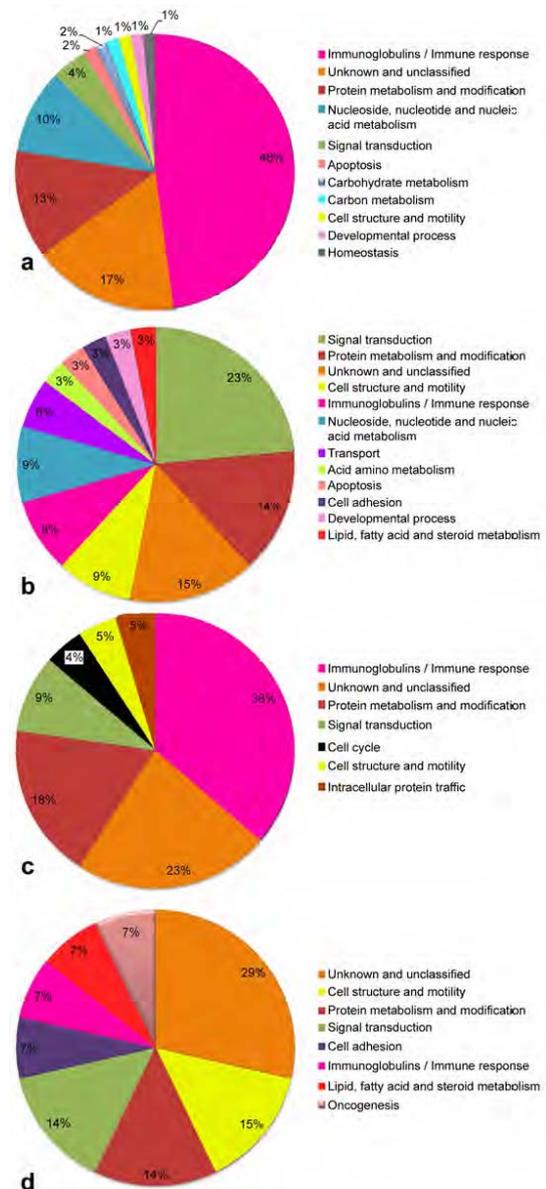


図4 スクリュー植立5日目における遺伝子発現様相

### 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 Kuroda S (他5名2番目), Gene expression profiling and histomorphometric analyses of the early bone healing response around nanotextured implants. Nanomedicine (Lond). 査読有, in press, 2013.

- ② Kuroda S (他 4 名 1 番目), A. Mechanical stress induces bone formation in the maxillary sinus in a short-term mouse model. Clin Oral Investig., 査読有、2013;17(1):131-137. DOI: 10.1007/s00784-012-0686-4.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 黒田晋吾 (他 4 名 2 番目)、Mechanical stress induced bone formation in the maxillary sinus、第 60 回国際歯科研究学会日本部会(JADR) 総会・学術大会、2012. 12. 14-15、朱鷺メッセ (新潟市)
- ② Shingo Kuroda、Do you believe the maxillary group distalization using interradicular miniscrews?、4th World Implant Orthodontic Conference、2012. 10. 10-13、ヒルトンホテル・シドニー (オーストラリア、シドニー)
- ③ 黒田晋吾 (他 2 名 2 番目)、Orthodontic implants save many more teeth of patients with periodontitis、98th Annual Meeting American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology、2012. 9. 29-10. 2、ロスアンジェルス・コンベンションセンター (アメリカ合衆国、ロスアンジェルス)
- ④ 黒田晋吾 (他 5 名 1 番目)、Ameloblastin が骨芽細胞活性に及ぼす影響、第 71 回日本矯正歯科学会大会、2012. 9. 26-29、アイスアリーナ (盛岡市)
- ⑤ 黒田晋吾、Gene expression profiling by DNA microarray and histomorphometric analyses of healing bone around nanotextured implants、連携機能を活用した口腔から QOL 向上を目指す研究平成 23 年度口腔 QOL シンポジウム、2011. 10. 21、徳島大学 (徳島市)
- ⑥ 黒田晋吾 (他 5 名 1 番目)、ナノ加工チタンインプラント周囲の骨治癒様相に対する DNA マイクロアレイを用いた遺伝発現解析、第 70 回日本矯正歯科学会大会、2011. 10. 17-20、名古屋国際会議場 (名古屋市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒田 晋吾 (KURODA SHINGO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・准教授

研究者番号：40332796

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：