

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390434

研究課題名(和文)水素量低減DLCを応用したインプラント周囲骨リモデリングの制御

研究課題名(英文)Regulation of bone remodeling surrounding implant by low-content hydrogen DLC

研究代表者

二川 浩樹(Nikawa, Hiroki)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：10228140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔インプラント治療の成功のためには、強固なオッセオインテグレーション(骨結合)の獲得や骨のリモデリングに配慮したインプラント体の開発が必要である。我々は新規インプラント体材料として水素量低減DLCコーティングチタンに着目し、骨芽細胞および破骨細胞分化に対するin vitroでの影響を検討した。その結果、DLCには骨芽細胞および破骨細胞の分化制御に対して最適な水素量が存在することが示唆された。したがって、特定の水素量のDLCコーティングはインプラント治療におけるオッセオインテグレーション獲得効率の向上およびインプラントの長期安定のための有効なチタン表面修飾方法となる可能性があることが示された。

研究成果の概要(英文)：It is necessary to develop the novel fixture considering the strong osseointegration and bone remodeling for success of dental implant treatment. We investigated the effects of DLC-treated Ti disks (DLC-Ti) including low amount of hydrogen on osteoblast and osteoclast differentiation in vitro. This study suggests that specific-hydrogen content of DLC-Ti can affect response of osteoblast and osteoclast cells. In future, specific-hydrogen content of DLC-Ti may be useful for the material of dental implants that gives good prognosis.

研究分野：歯学

キーワード：DLC インプラント 骨リモデリング 破骨細胞 骨芽細胞

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、広く普及した歯科治療である。これまでの多くの研究で、オッセオインテグレーションの獲得を促進するインプラント体の表面改質が試みられている。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考えられている。よって、インプラント治療において早期にオッセオインテグレーションを獲得しその状態を保つことは、治療期間の短縮とよりよい予後を長期的に得る上で非常に重要となる。一度獲得されたオッセオインテグレーションは非常に強固で安定しており、インプラント周囲の骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨造成為バランスよく恒常的に行われている。しかしながら、加重や細菌感染などの外来刺激によってインプラント周囲の骨吸収が引き起こされることがある。このため、インプラント治療の長期的な成功には骨芽細胞はもちろん、破骨細胞の制御という骨のリモデリングに配慮したインプラント体の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、水素量低減 diamond-like carbon(DLC)を応用し、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、および破骨細胞の異常な活性化を制御することで、骨吸収を伴うインプラント周囲炎にも対応可能で、より予知性の高く予後良好な口腔インプラントを開発することである。

3. 研究の方法

本研究では、水素量低減 DLC コーティングチタンが破骨細胞の分化を抑制し、骨芽細胞の分化を促進するかどうかを検討した。その作用に関連したメカニズムも含めて分子生物学的手法を用いて詳細に検討した。具体的には、水素量低減 DLC コーティングチタン上での破骨細胞および骨芽細胞の動態や機能解析、サイトカインネットワークに与える影響、またその詳細なメカニズムについてreal time RT-PCRやWestern blotting等の方法を用いて検討を行った。

4. 研究成果

(1)平成 24 年度は、はじめに作製した水素量低減 DLC コーティングチタンを利用して、骨芽細胞と破骨細胞の分化に与える影響の解明と、適切な水素量の決定を試みた。その結果、水素量低減 DLC コーティングチタンにおいて、骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞における骨芽細胞の分化マーカーである type collagen mRNA の発現量を、非処理チタンと比較して経時的に有意に促進する水素量が存在することが確認された(図 1)。同様に、

破骨細胞前駆細胞様細胞株 RAW264.7 細胞においても sRANKL を添加した場合、破骨細胞の分化マーカーである TRAP および cathepsin K mRNA の発現抑制が認められる水素量が存在することが確認された。

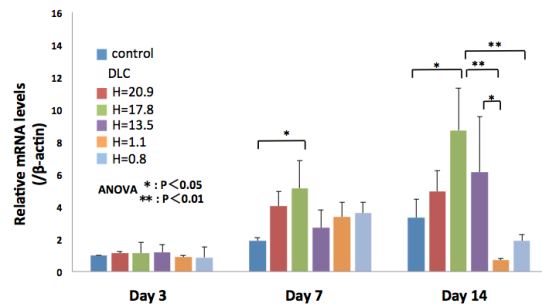


図 1

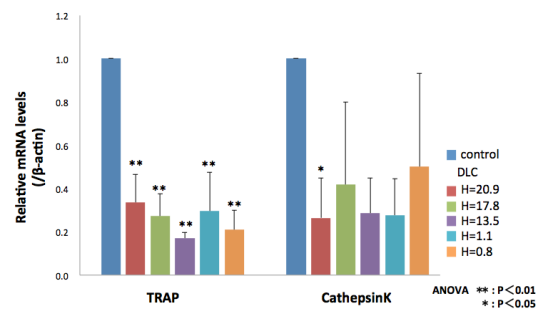


図 2

以上より、水素量低減 DLC コーティングチタンには、周囲の細胞に影響を与える適切な水素量が存在する可能性が示唆された。

(2)平成 25 年度は、平成 24 年度に得られた、水素量低減 DLC コーティングチタンが、RAW264.7 細胞および MC3T3-E1 細胞の分化に与える影響について、さらなる詳細な検討を行い、その有用性についてエビデンスを集積した。まず、水素量低減 DLC コーティングチタン上にて、可溶性 RANKL 存在下で RAW264.7 細胞を培養した。その結果、どの水素量の水素量低減 DLC コーティングチタンにおいても、破骨細胞分化に必須のマスターレギュレーターである NFATc1 タンパクの発現および破骨細胞の分化マーカーの発現が、未処理チタン上と比較して抑制された。このことから、破骨細胞の分化に対してはどの水素量においても高品質 DLC 成膜の有用性が一定に保たれることが示唆された。また、IL-1 のファミリーサイトカインである IL-33 の RANKL 発現への関与についても検討を行った。MC3T3-E1 細胞の分化誘導において、IL-33 の刺激により、RANKL mRNA および RANKL タンパクの発現が有意に促進した。さらに、IL-33 誘導性 RANKL の発現に関与する MAPK シグナル経路を探索した。IL-33 の刺激によりリン酸化が認められた ERK、p38、JNK 経路のうち、ERK、p38 経路を抑制すると RANKL mRNA の発現が有

意に抑制された。これらの結果から、MC3T3-E1 細胞の RANKL 発現は、IL-33 によって誘導され、ERK、p38 経路を介することが示唆された。これらの結果は、骨のリモデリング制御に非常に重要な知見であると考えられた。

(3)最終年度である平成 26 年度は、前年度までに得られた、水素量低減 DLC コーティングチタンが、マウス破骨細胞様細胞株である RAW264.7 細胞およびマウス骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞の分化に与える影響について、さらなる詳細な検討を行った。

水素量低減 DLC コーティングチタン上に MC3T3-E1 細胞を培養後、骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現について解析を行った結果、いずれの遺伝子も特定の水素量において発現量が上昇することがわかった。また、水素量低減 DLC コーティングチタン上に、可溶性 RANKL 存在下で RAW264.7 細胞を培養したところ、特定の水素量において、NFATc1 および破骨細胞分化マーカーのタンパク発現が顕著に抑制されることが明らかとなった(図 3)。

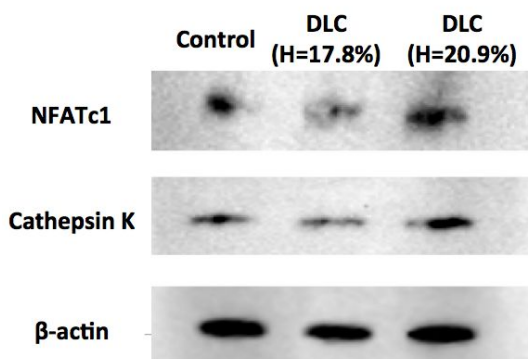


図 3

さらに、オッセオインテグレーションの獲得にはチタン表面性状が関与していると言われているため、水素量低減 DLC コーティングチタンの表面粗さおよび濡れ性を検討した。その結果、これらに関して未処理の純チタンと水素量低減 DLC コーティングチタンとの間で大きな差は認められなかった。つまり、細胞の分化に対する水素量低減 DLC コーティングチタンの影響について、表面粗さおよび濡れ性に関する表面性状の影響はないと考えられた。

以上のことから、特定の水素量低減 DLC コーティングチタンは骨芽細胞分化を正に、破骨細胞分化を負に制御し骨リモデリングに十分配慮することで、インプラント治療の長期的な成功のための有用な材料になり得ることが示唆された。

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 3 件)

1. 峯裕一, 中谷達行, 岡本圭司, 高木謙太郎, 三川浩樹, Impact of biomimetic diamond-like carbon coated titanium on osteoblast and osteoclast differentiation *in vitro*, Journal of Photopolymer Science and Technology, 27 巻, 査読有, 2014, pp373-378
2. 峯裕一, 牧平清超, 山口裕, 田中秀樹, 三川浩樹, Involvement of ERK and p38 MAPK pathways on Interleukin-33-induced RANKL expression in osteoblastic cells, Cell Biology International, 38 巻, 査読有, 2014, pp655-662, doi:10.1002/cbin.10249
3. 峯裕一, 中谷達行, 岡本圭司, 牧平清超, 岩田慧, 三川浩樹, Biomimetic Diamond-like Carbon coated Titanium Inhibits RANKL-dependent Osteoclast Differentiation *in vitro*, Journal of Photopolymer Science and Technology, 25 巻, 査読有, 2012, pp523-528

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 峯裕一, 中谷達行, 岡本圭司, 高木謙太郎, 三川浩樹, 口腔インプラント開発における水素量低減 DLC の応用, The 31th International Conference of Photopolymer Science and Technology, 2014 年 7 月 8-11 日, 千葉大学(千葉県・千葉市)
2. Kentaro Takagi, Yuichi Mine, Tatsuyuki Nakatani, Keiji Okamoto, Hiroki Nikawa, Impact of hydrogen content of diamond-like carbon-treated titanium on osteoblast and osteoclast differentiation *in vitro*, The 9th Scientific meeting of the Asian Academy of Osseointegration, 2014 年 7 月 4-5 日 札幌教育文化会館(北海道・札幌市)
3. 高木謙太郎, 峯裕一, 中谷達行, 岡本圭司, 杭本美紅, 三川浩樹, 水素量低減 Diamond-Like Carbon 処理を施したチタンが骨芽細胞および破骨細胞の分化に与える影響, 第 52 回広島県歯科医学会併催第 97 回広島大学歯学会, 2013 年 11 月 10 日, 広島県歯科医師会館(広島県・広島市)
4. 峯裕一, 中谷達行, 岡本圭司, 牧平清超, 岩田慧, 三川浩樹, 骨吸収を制御する口腔インプラント開発における DLC 薄膜コーティングの応用, The 29th International Conference of Photopolymer Science and Technology, 2012 年 6 月 28 日, 千葉大学(千葉県・千葉市)
5. Mine Yuichi, Yamaguchi Yu, Makihira Seicho, Tanaka Hideki, Furue MK,

Nikawa Hiroki, Direct and indirect effects of Interleukin-33 on osteoclast differentiation *in vitro*, 2012 World Congress of In vitro Biology, 3-7 June, 2012, Washington(U.S.A.)
〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二川 浩樹 (NIKAWA HIROKI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院
(歯)・教授
研究者番号：10228140

(2) 研究分担者

田地 豪 (TAJI TSUYOSHI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究
(歯)・准教授
研究者番号：80284214

(3) 連携研究者

中谷 達行 (NAKATANI TATSUYUKI)
岡山理科大学・技術科学研究所・教授
研究者番号：50520920

岡本圭司 (KEIJI OKAMOTO)
トーヨーエイトック株式会社・表面処理
事業部企画開発課・課長
研究者番号：90507724

牧平 清超 (MAKIHIRA SEICHO)
九州大学・大学院歯学研究院・准教授
研究者番号：80304450

峯 裕一 (MINE YUICHI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
特任助教
(H24：研究分担者)
研究者番号：60605989