

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650255

研究課題名(和文)咬合力の直接伝達を緩衝する歯根膜組織を有した次世代型歯科インプラントの開発

研究課題名(英文)Development on an innovative oral implant with PDL absorbing percussive force generated by mastication

研究代表者

森田 康之(Morita, Yasuyuki)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90380534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、次に示す結果が得られた。適切な繰返し伸縮刺激は、間葉系幹細胞の細胞分化を著しく促進させる。ここでは間葉系幹細胞の腱細胞分化を評価し、細胞の配向を制御した場合、実際の腱組織が受けるひずみ5%を48h継続することで良い結果が得られた。また、細胞をその細胞が存在する生体環境に近い状態で培養することは、分化に限らず細胞外マトリックスの形成においても非常に有効であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The following conclusions were obtained in this project. Appropriate cyclic stretching stimulation definitely promotes differentiation of mesenchymal stem cells. In addition, cultivating cells in a similar environment in vivo is pretty effective for the cellular differentiation and extracellular matrix formation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学/医用生体工学・生体材料学

キーワード：分化 間葉系幹細胞 細胞配列 機械的伸縮刺激 細胞外マトリックス コラーゲン タンパク質 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラント治療は、1960年代後半に Brånemark らによって提唱されたオッセオインテグレーションを基本概念とする (Brånemark et al, Scand J Plast Reconstr Surg, 1969). そして現在の歯科インプラントの開発研究は、オッセオインテグレーションをいかに高めるかに精力が注がれている。しかし大きな特長であるオッセオインテグレーションが、1つの欠点とも言える。すなわち、オッセオインテグレーションはインプラント体と歯槽骨の間に歯根膜のような緩衝材が存在せず、咬合時の衝撃力が歯槽骨および頭蓋骨に直接伝達される。これにより歯周組織に過大な応力・ひずみが生じ、骨吸収による顎骨・残存歯の喪失、インプラント破折、さらには顎関節症など深刻な問題を誘発する。したがって、歯根膜のような緩衝機構を有した歯科インプラントの開発が喫緊の課題と言える。

2. 研究の目的

歯根膜を有した歯科インプラント開発を長期的最終目標に据え、本課題では短期目標として線維性軟組織の *in vitro* での組織再生のための系統的な分化・組織再生のメカニズムの解明を目的とした。

このメカニズムの解明において、研究代表者が研究実績を有するヒト骨髄由来間葉系幹細胞から腱細胞への分化を研究対象とした。間葉系幹細胞に力学的伸縮刺激を加え腱細胞への分化を促進し、腱組織を *in vitro* で構築する。腱組織の構築は、細胞から分泌されたタンパク質を成分とする細胞外マトリックス (ECM) の組織化によって決定づけられる。したがって腱の組織構築のためには、間葉系幹細胞を効率的に腱細胞に分化させ、それらが発現する ECM を高い精度で組織化させる必要がある。

腱組織における腱細胞は細長い紡錘形をしており、長軸方向が伸縮方向に対して平行になるように列状に配列されている (Ralphs et al, Matrix Biol, 2002)。また、細胞の配向がその機能に影響を及ぼすことが報告されている (Chen et al, Science, 1997; Folkman et al, Nature, 1978)。しかし細胞接着タンパク質を基板全面に均等に塗布する従来の方法 (Wang et al, J Biomech, 1995) では、細胞は伸縮基板にランダムな配向で接着され、伸縮後には細胞の長軸方向のひずみが最小となる約 60°に配向することが報告されている (Wang et al, J Biomech, 1995)。したがって従来の方法では正確に腱組織と同じ力学環境が再現できず、幹細胞の効果的な分化、さらには ECM の組織化のためにはより厳密に間葉系幹細胞の配向を制御する必要がある (James et al, Ann Biomed Eng, 2005)。

そこで本研究では、間葉系幹細胞の配向を制御した状態で一軸伸縮刺激を加え、ECM として発現する腱細胞の構成成分、I 型コラー

ゲン (Col I) とテネイシン C (Tnc) の定量と構造観察を行った。そしてそれらに対して伸縮率が与える影響や、配向制御しない場合との比較を行った。

3. 研究の方法

(1) 幹細胞の配向制御および伸縮実験

フォトリソグラフィを用いて、ガラスウェハ上の $20 \times 20 \text{ mm}^2$ の範囲に列状の溝 (幅 $30 \mu\text{m}$, 間隔 $60 \mu\text{m}$, 深さ $10 \mu\text{m}$) を配列したパターンを作製した。スタンプにフィブロネクチン (FBN) を、シリコンチャンバーに細胞の接着阻害因子をそれぞれコーティングし、スタンプを押印することでチャンバー上に FBN を転写した。この FBN のパターン上に幹細胞を播種することで細胞の配向制御を行った。

(2) 蛍光抗体染色法による構造観察

観察には蛍光抗体染色法を用い、Col I, 細胞骨格、核を染色した。そして細胞の位置を確認しながら、伸縮後の発現 Col I の構造を観察した。発現 Col I に二値化画像処理を施し、その面積を求めた。

(3) マイクロプレートリーダーによる吸光度測定

ELISA 法による Col I, Tnc を抗体標識し、マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定した。この吸光度測定により、伸縮後に発現した Col I, Tnc の定量が可能となる。

4. 研究成果

配向制御の有無の違いによる培養細胞の位相差画像を図 1 に示す。配向制御を施した基板上的細胞は、ほぼ一様な方向に配向しているのに対し、FBN を一様に塗布した基板上的細胞は、無配向に接着しているのが観察される。

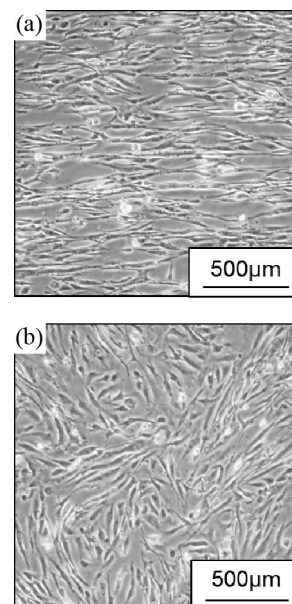


図 1 繰返し伸縮負荷を受ける間葉系幹細胞。(a) 配向制御有り。(b) 配向制御無し。

48 h の繰返し伸縮後の細胞の蛍光画像を 図 2 に示す．配向制御した基板上での細胞においては，Col I (赤色) が多く観察され，配向制御を施していない基板上の細胞においては，Col I の発現が相対的に少なかった．Col I の二値化画像を図 3 に示す．配向制御した基板上のほうが，発現した Col I が連結するような挙動を示し，腱組織に近づくような ECM 構造となったことがわかる．その発現面積を比較しても，配向制御を施した基板上の細胞，特に 5 % の伸展率において，大きな値を示した (図 4) ．

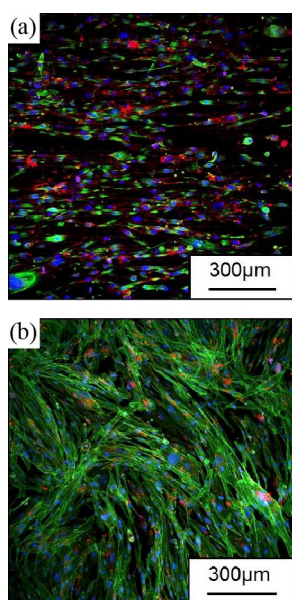


図 2 I 型コラーゲン (赤) ，細胞骨格 (緑) ，核 (青) を示した共焦点蛍光顕微鏡画像．(a) 配向制御有り．(b) 配向制御無し．

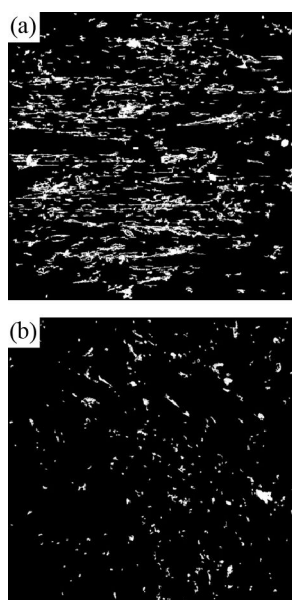


図 3 I 型コラーゲンの二値化画像．(a) 図 2 の(a)．(b) 図 2 の(b)．

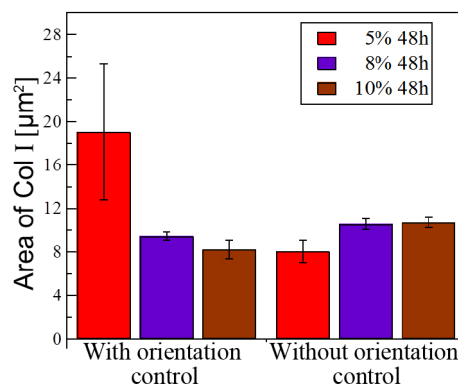


図 4 繰返し伸縮負荷 (伸展率: 5, 8, 10%) を受ける間葉系幹細胞の I 型コラーゲン発現面積．(a) 配向制御有り．(b) 配向制御無し．

ELISA 法による Col I および Tnc の発現量を 図 4 に示す．総合的に配向制御した基板上での細胞において両方のタンパク質の発現量が増加する傾向を示した．特に，Col I の発現量が飛躍的に向上した．

本研究では，間葉系幹細胞に機械的伸縮刺激を加え，腱細胞への分化および細胞外マトリックスを構成するタンパク質の合成に関する研究を行った．配向制御を施した基板と施していない基板，両者に細胞を播種し，その比較を行った．その結果，配向を施した基板上の細胞において，腱細胞への分化が促進されると同時に，腱組織のタンパク質である Col I および Tnc の発現が増加した．さらには，配向制御していない基板上の細胞と比較して，腱組織に近い ECM 構造を形成することを示した．これは，同じ線維性軟組織の歯根膜の研究においても重要な知見を与える成果である．

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

Y. Morita, S. Suzuki, Y. Ju, and N. Kawase, Differences between protein expression and extracellular matrix state on uniaxial stretching for tenogenic differentiation, *Journal of Mechanics in Medicine and Biology*, 査読有, Vol.14, 2014, 1450025

Y. Morita, S. Watanabe, Y. Ju, and S. Yamamoto, In vitro experimental study for the determination of cellular axial strain threshold and preferential axial strain from cell orientation behavior in a non-uniform deformation field, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 査読有, Vol.67, 2013, 1249-1259

DOI: 10.1007/s12013-013-9643-3

Y. Morita, T. Mukai, Y. Ju, and S. Watanabe, Evaluation of stem cell-to-tenocyte differentiation using atomic force microscopy to

measure cellular elastic moduli, Cell Biochemistry and Biophysics, 査読有, Vol.66, 2013, 73-80

DOI: 10.1007/s12013-012-9455-x

Y. Morita, LM. Ren, and M. Todo, Experimental and numerical investigation on strain distribution in alveolar bone model around dental implant, Proceeding of the ISEM-ACEM-SEM-7th ISEM ' 12, 査読有, 2012, Paper No.M111

森田 康之, デジタル画像相関法を用いた圧縮試験下でのインプラント周囲骨の変位・ひずみ分布解析, 日本口腔インプラント学会誌, 査読有, 25巻, 2012, 488-495

〔学会発表〕(計 16 件)

森田康之, 河瀬直樹, 巨陽, 細胞外マトリックスの力学場計測の実現に向けた DVC 法の開発, 日本非破壊検査協会平成 25 年第 2 回応力・ひずみ測定部門講演会, 2013 年 11 月 8 日, 金沢大学

Y. Morita, T. Sato, and Y. Ju, Experimental study for the relationship between cell differentiation and mechanical strain using a non-uniform deformation field, The 8th ISEM ' 13-Sendai, 6 Nov 2013, Sendai City War Reconstruction Memorial Hall, Sendai

森田康之, 鈴木敏, 巨陽, 配向を制御した間葉系幹細胞の伸縮培養による腱細胞への分化および評価に関する研究, 日本実験力学学会 2013 年度年次講演会, 2013 年 8 月 22 日, 由利本荘市文化交流館「カダレ」

Y. Morita, LM. Ren, and M. Todo, Experimental and numerical investigation on strain distribution in alveolar bone model around dental implant, The ISEM-ACEM-SEM-7th ISEM ' 12, 9 Nov 2012, The Grand Hotel, Taipei, Taiwan

(Invited) Y. Morita, Applications of digital image correlation technique to dental biomechanics, 2012 IUTAM Symposium on Advances of Optical Methods in Experimental Mechanics, 5 Nov 2012, The Grand Hotel, Taipei, Taiwan

〔図書〕(計 1 件)

森田 康之, 日本実験力学学会, 歯科インプラント・口腔インプラント, 2012, 88-89

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 康之 (MORITA, Yasuyuki)
名古屋大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 90380534

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし

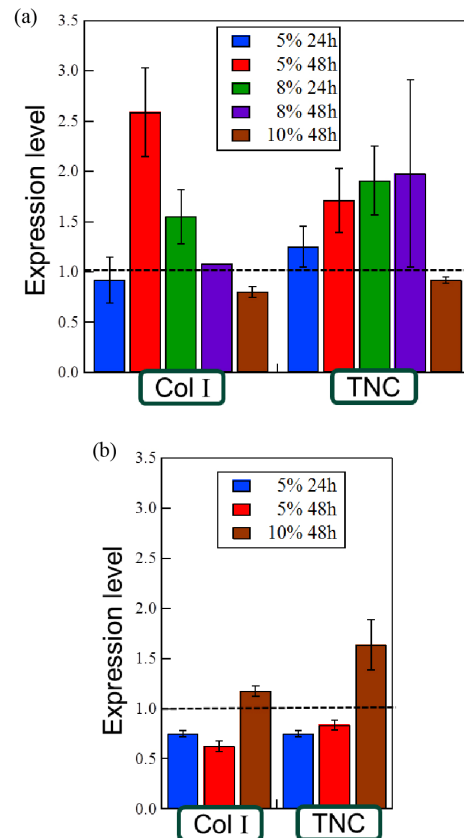


図 5 ELISA 法による I 型コラーゲン, テネイシン C 発現量の経時変化. (a) 繰返し伸縮負荷 (伸展率: 5, 8, 10%) を受ける間葉系幹細胞. 配向制御有り. (b) 繰返し伸縮負荷 (伸展率: 5, 10%) を受ける間葉系幹細胞. 配向制御無し.