

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463012

研究課題名(和文) 傾斜機能型ナノハイブリッドインプラントの実用化に向けた幹細胞のホーミング機構解析

研究課題名(英文) Analysis for homing mechanism of mesenchymal stem cells on functionally graded nanohybrid titanium dental implant

研究代表者

武部 純 (Takebe, Jun)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：50295995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔インプラント治療への臨床応用を目指して、純チタン(Ti)表面へ陽極酸化・水熱処理を行うことで、傾斜機能とナノハイブリッド化を施した傾斜機能型ナノハイブリッドインプラント(NanoTi)を開発し、細胞培養モデルにて有用性を検討した。その結果、幹細胞(MSCs)の細胞内シグナル伝達経路を介して、MSCsの骨原性細胞への分化誘導能を促進させる効果が非常に高いことが示唆された。本研究より、NanoTi表面の微細形状と物理化学的性状は、MSCsのホーミング機構に有利に働くことで細胞分化誘導を促進させる可能性を有することが確認され、歯科・医科領域での臨床に貢献できることが示された。

研究成果の概要(英文)：A method of coating commercially pure titanium (cpTi) implants with a highly crystalline, thin hydroxyapatite (HA) layer using discharge anodic oxidation followed by hydrothermal treatment (functionally graded nanohybrid titanium dental implant; NanoTi) has been reported for use in clinical dentistry. We reported that a thin HA layer with high crystallinity and nanostructured anodic titanium oxide film on such NanoTi implant surfaces might be a crucial function of their surface-specific potential energy. The cellular gene expression responses driving extracellular and intracellular molecular interactions thus play an important role in maintenance at the interface between NanoTi implant surfaces and the mesenchymal stem cells (MSCs). These data indicated that the change of physicochemical properties of NanoTi surface may play a key role in the phenomenon of homing mechanism of MSCs and osteoconduction during the process of osseointegration.

研究分野：医歯薬学、歯学、補綴・理工系歯学

キーワード：歯科補綴学 傾斜機能型ナノハイブリッドインプラント 口腔インプラント表面性状 表面・界面物性
幹細胞 歯髄幹細胞 ホーミング機構 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

創傷治癒の中で形成されるオッセオインテグレーションは、生体側での要因の他にインプラント体表面性状(表面微細構造、物理化学的組成)が深く関与している。近年、純チタン(cpTi)を基盤とした口腔インプラント治療のニーズが高まるに従い、早期のオッセオインテグレーション獲得と適応範囲拡大を目指した材料表面性状や治療術式の研究、開発が行われている。オッセオインテグレーションを早期に獲得しインプラント上部構造を装着して機能回復を図ることは、中高齢者のQOL向上、ひいては健康長寿、超高齢社会における国民の健康維持増進に広く貢献する。そこで本研究チームでは、この課題に対して、インプラント埋入後の早期のオッセオインテグレーション獲得による治癒期間の短縮や骨質の劣る部位での生着率の向上を目的に、bioactiveとbioinertの両方の性質を兼ね備えたインプラントを用いることが有利と考え、cpTi表面を陽極酸化処理し、さらに水熱処理を行うことでナノ構造を有する陽極酸化被膜上に六方晶系を呈する高結晶性のハイドロキシアパタイト(HA)を析出させる表面処理方法を開発した。

本処理方法により cpTi 表面は、傾斜機能型(cpTiを基盤とし、cpTi表面上に陽極酸化被膜とハイドロキシアパタイト結晶の複合被膜が連続的に形成されている)とナノハイブリッド化(陽極酸化被膜はぬれ性と表面自由エネルギーの高いナノ構造を呈している)の特徴を有している(NanoTi, 図1)。

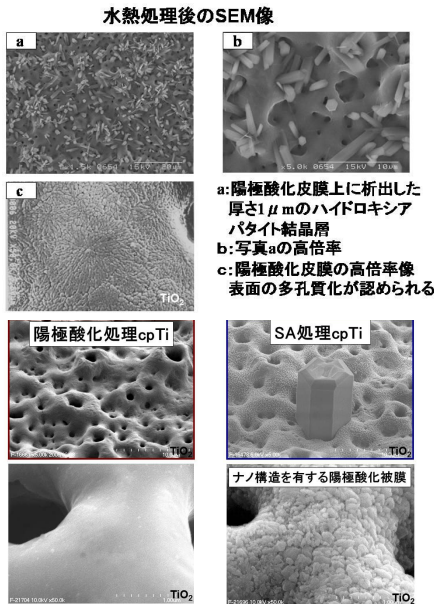


図1. NanoTi 表面構造

以上のような背景から、本研究プロジェクトでは、国民へ安心した医療を提供する基盤形成を念頭に、細胞培養モデルを構築した実験系を中心として NanoTi インプラントの臨床応用へ向けた検討を行った。

2. 研究の目的

傾斜機能型ナノハイブリッド(NanoTi)インプラント臨床の実用化に向けた検討を行うためには、インプラント表面/生体組織の界面で起こる生物学的現象、すなわち未分化間葉系幹細胞(MSCs)の挙動に関する検討が重要である。このことは、NanoTiインプラント表面周囲の様々な微小環境によるMSCsの細胞接着・増殖・分化誘導制御機構を解明することに繋がり、臨床応用に向けたinvitro研究として期待できるものである(図2)。

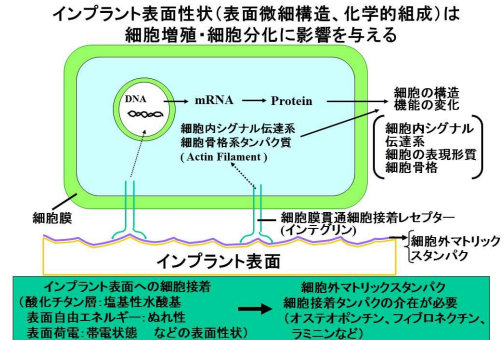


図2. NanoTi インプラント表面性状が MSCs 増殖・分化誘導能に与える影響

そこで、申請期間内における研究では、invitro実験モデルを構築し、培養細胞と分子レベルの実験系を中心に計画を立案した。インプラント表面周囲に出現する骨芽細胞や線維芽細胞の起源となるMSCsがどのように創傷治癒過程での組織修復や再生機構に関わっているのか、MSCsの分化誘導能やホーミング(分布、集積)について分子生物学的レベルを指標とした解析を実施した。

3. 研究の方法

実験試料には、純チタンディスク(cpTi: 直径15mm、厚さ1.5mm、99.8%)、cpTiをβ-グリセロリン酸ナトリウム(0.01mol/l)と酢酸カルシウム(0.15mol/l)からなる電解質溶液中にて放電陽極酸化処理(電圧350V、電流50mA/cm²)を施した陽極酸化処理チタン(A0Ti)、その後オートクレーブ(300℃、2時間)を用いて水熱処理を施した陽極酸化・水熱処理チタン、すなわち傾斜機能型ナノハイブリッド(NanoTi)を用いた(図3)。

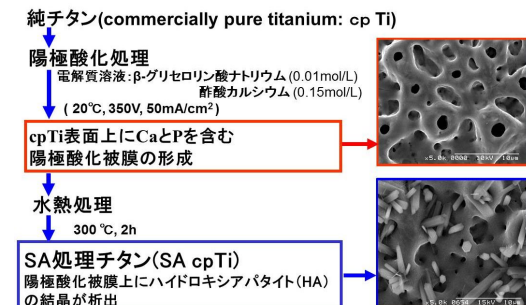


図3. NanoTi 表面処理方法

(1) 各試料上(cpTi, A0cpTi, NanoTi)に GFP トランスジェニックマウスの骨髄から樹

立した MSCs 株 (SG 2) を播種し、培養 72 時間後に WST-1 assay による細胞増殖能、培養 1-4 週後に Real-time PCR による骨分化マーカー遺伝子 (ALPL, RUNX2, OSTERIX, OCN) の mRNA 発現量の変動について解析した。

(2) cpTi によるミニインプラント体を製作後、表面処理 (AOcpTi, NanoTi) を行い、ラット上顎臼歯相当部に 14 日間埋入、摘出後、走査型電子顕微鏡 (SEM; S-4700、日立) による表面の組織学的観察・分析を行った。

(3) SEM、原子間力顕微鏡 (AFM; VN-800, Keyence) による AOcpTi、NanoTi 表面上における陽極酸化被膜の表面性状分析、ぬれ接触角分析、表面自由エネルギー分析を行った。

4. 研究成果

(1) WST-1 assay による細胞増殖能

cpTi 群と比較して AOTi 群では細胞増殖能の低下を認め、NanoTi 群ではさらに低下することが認められた (図 4)。

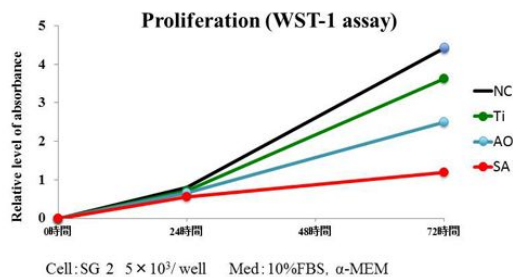


図 4. 細胞増殖能

骨分化マーカー mRNA 遺伝子発現量

遺伝子発現量解析では、cpTi 群と比較して AOTi、NanoTi 群では培養 4 週目の全ての遺伝子に mRNA 発現量が有意に増加した。一方、RUNX2、OCN は 1 週目で各群に有意な差は認めなかったが、培養 4 週目では OSTERIX、OCN では NanoTi は有意に促進を認めた (図 5)。

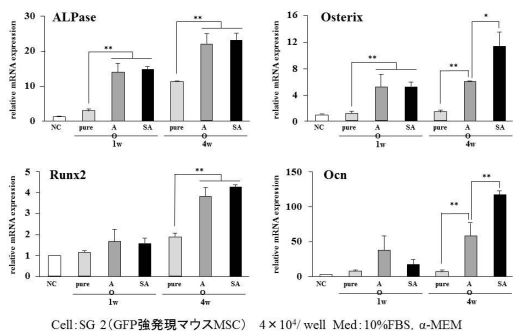


図 5. 遺伝子発現量

(2) cpTi ミニインプラント (AOTi, NanoTi) の組織学的観察・分析

埋入 2 週後においては、cpTi, AOTi インプラントと比較して NanoTi インプラントでは、陽極酸化膜と HA 結晶表面では骨基質形成の促進が確認された。NanoTi 表面での特徴としては、骨基質が緻密に陽極酸化被膜上に形成されており、HA 結晶周囲にも癒合するよう形成されていることが確認された。

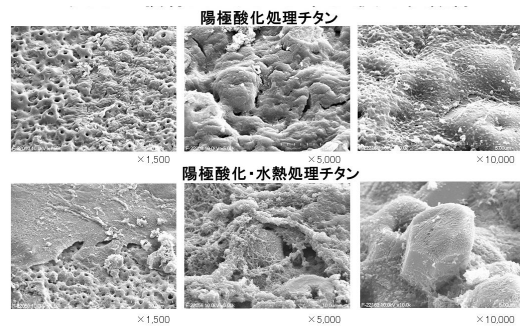
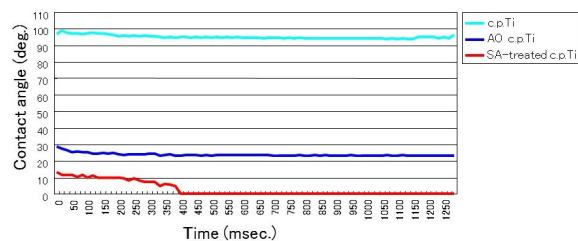


図 6. ラット上顎骨埋入後の分析

(3) SEM、原子間力顕微鏡 (AFM) による AOTi、NanoTi 表面分析

AOTi 表面に比較して、NanoTi 表面上では、ナノ構造を呈する微細構造体を認めた (図 1 参照)。また、ぬれ接触角ならびに表面自由エネルギーは、NanoTi 表面上では有意に高い値を示すことが確認された (図 7-1, 2)。



	蒸留水 (DW)	ハンクス溶液 (HBSS)	ウシ血清アルブミン (BSA)
cpTi	82.6 ± 1.5°	94.9 ± 2.7°	89.3 ± 2.0°
AO cpTi	28.6 ± 3.6	23.3 ± 12.6°	22.8 ± 2.0°
SA-treated cpTi	11.8 ± 1.7°	0.0°	8.7 ± 0.8°

図 7-1. ぬれ接触角

Time (msec)	Disks	DW	DM	Surface free energy (mj/m ²)
17 msec.	cpTi	85.5 ± 0.2	48.7 ± 0.7	35.7 ± 0.9
17 msec.	AO cpTi	32.3 ± 1.2	46.9 ± 1.1	62.8 ± 1.6
17 msec.	SA-treated cpTi	22.4 ± 1.4	33.8 ± 3.3	69.2 ± 2.3
1000 msec.	cpTi	81.8 ± 0.5	47.3 ± 0.3	37 ± 0.9
1000 msec.	AO cpTi	28 ± 0.9	43.6 ± 0.4	65.5 ± 1.3
1000 msec.	SA-treated cpTi	10.2 ± 0.8	17.6 ± 1.4	74.5 ± 1.4

図 7-2. 表面自由エネルギー

本申請年度内における研究結果より、傾斜機能型ナノハイブリッド (NanoTi) 表面は、水酸基や極性分子力が高まることでぬれ性および表面自由エネルギーが向上し、インプラント/生体組織界面にリクルートメントされる MSCs においては有利に働くことが確認された。親水性表面に改質される NanoTi の表面性状は、MSCs の分化誘導促進能に優れていることを意味しており、NanoTi 表面周囲に骨芽細胞・上皮細胞系の起源となる MSCs が分布・集積することが推察された。傾斜機能型ナノハイブリッドインプラントの特徴的な表面性状から考察すると、NanoTi 表面の微細ナノ構造形状 (図 1) と物理化学的性状 (図 7-1, 7-2) は、MSCs のホーミング機構に有利に働く可能性があることが確認された。

さらに、MSCsの細胞内シグナル伝達経路を介して、骨原性細胞への分化誘導能を促進させる効果が非常に高いことが明らかとなった。

本研究より、NanoTi表面の微細形状と物理化学的性状は、MSCsの分布・集積機構、細胞分化誘導能促進に有利に働くことが確認され、今後の歯科・医科領域における臨床に広く貢献でき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10件)

Furukawa S., Kuwajima Y., Chosa N., Satoh K., Ohtsuka M., Miura H., Kimura M., Inoko H., Ishisaki A., Fujimura A., Miura H. Establishment of immortalized mesenchymal stem cells derived from the submandibular glands of tdTomato transgenic mice". *Experimental and Therapeutic Medicine*. 査読有, doi.org/10.3892/etm.2015.2700, 10:1380-1386, 2015.

杉山慎太郎, 吉岡 文, 尾澤昌悟, 武部純: 健常有歯顎者における咬合接触面積が咀嚼能力に及ぼす影響. *日咀嚼誌*. 査読有, 25(2):59-65, 2015.

Masuda T, Hiraoka A, Tanaka T, Hayashi K, Shiraishi K, Kanbara R, Kumano H, Nakamura Y, Ito F, Okada M, Tanaka Y and Takebe J: The Relining Method of Removable Denture with Magnetic Attachments. *J J Mag dent*. 査読有, 24(2):40-49, 2015.

Nagai H, Kumano H, Kanbara R, Ando A, Masuda T, Itakura T, Konno H, Nakamura Y, Takada Y, Tanaka Y, Takebe J: Investigation of an optimal magnetic attachment structure using three-dimensional finite element method -An influence of different magnetic assembly and keeper structure on attractive force-. *J J Mag dent*. 査読有, 24(2):32-39, 2015.

宮前 真, 尾澤昌悟, 浅見和哉, 普山田宏成, 古田弘樹, 後藤正志, 吉岡 文, 竹内一夫, 田中貴信, 武部純, 服部正巳. 下顎骨切除患者における下顎運動に関する検討 顎顔面補綴. 査読有, 38:25-34, 2015.

武部純: 舌全摘症例に対して補助装置付き下顎顎義歯と上顎床装置との併用により咀嚼・嚥下機能の向上に有効であった1例. *顎顔面補綴*. 査読有, 37(2):19-27, 2014.

帖佐直幸, 菊池-青松恵美子, 西平宗功, 横田潤, 高橋典子, 近藤尚知, 杉山芳樹, 三浦廣行, 石崎明. 間葉系幹細胞のstem-nessを維持するシグナル伝達経路(総説). *岩手医大歯誌*. 査読有, 39:56-65,

2014.

Aomatsu E., Takahashi N., Sawada S., Okubo N., Hasegawa T., Taira M., Miura H., Ishisaki A., Chosa N. Novel SCRG1/BST1 axis regulates elf-renewal, migration, and osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*. 査読有, doi:10.1038/srep03652. 4:3652, 2014. Takebe J, Miyata K, Miura S, Ito S.: Effects of the nanotopographic surface structure of commercially pure titanium following anodization-hydrothermal treatment on gene expression and adhesion in gingival epithelial cells. *Materials Science and Engineering -ring C*. 42: 273-279, 2014. 査読有, doi: 10.1016/j.msec.2014.05.040. *Equib* 2014 May 27.

島崎伸子, 富田 寛, 山森徹雄, 田崎智子, 川村憲一, 豊田 勝彦, 武部純, 近藤尚知: 唾液中亜鉛結合タンパク質を用いた味覚障害のスクリーニング法 -イムノクロマト測定値と血清亜鉛値との関連-, *日本味と匂学会誌*, 査読有, 20(3):345-346, 2013

[学会発表](計16件)

大見真衣子, 成瀬桂子, 秦 正樹, 中村信久, 宮部 愛, 尾澤昌悟, 田中貴信, 武部純, 松原達昭: 糖尿病性神経障害に対する歯髄幹細胞移植療法の治療効果とメカニズムの検討. 第87回愛知学院歯学会, 2015.12.6. 愛知学院大学歯学部楠元学舎, 愛知県名古屋市

佐藤 満成, 吉田 康夫, 永野恵司, 長谷川 義明, 武部純, 吉村 文信:

Porphyromonas gingivalis の短鎖脂肪酸産生に参与する3種のCoA-transferase に関する分子生物学的研究. 第87回愛知学院歯学会 2015年12月6日, 愛知学院大学歯学部楠元学舎, 愛知県名古屋市

杉山慎太郎, 吉岡 文, 尾澤昌悟, 武部純: 臼歯部咬合接触が咀嚼能率に及ぼす影響. 第25回日本全身咬合学会学術大会 2015年11月29日, 愛知学院大学歯学部楠元学舎, 愛知県名古屋市

武部純, 秦 正樹, 大見真衣子, 福澤蘭, 小島規永, 尾澤昌悟: 傾斜機能型ナノハイブリッドチタンが上皮細胞の細胞接着関連遺伝子発現に及ぼす影響. 平成27年第37回日本バイオマテリアル学会大会, 2015.11.9. 京都テルサ, 京都府京都市

杉山慎太郎, 尾澤昌悟, 吉岡 文, 平井秀明, 岡崎祥子, 平岡亜依子, 星合和基, 武部純: 口腔インプラント上部構造における臼歯部咬合接触について. 平成27年度日本補綴歯科学会東海支部学術大会, 2015.10.10. 松本中央公民館, 長野県松本市

武部 純：チタンインプラント/骨界面における分子・細胞学的研究．平成27年度愛知学院大学歯学部歯科理工学講座 歯科理工学懇話会, 2015.10.8. 愛知県名古屋

横田 潤, 武部 純, 西郷慶悦, 石崎 明, 近藤尚知：陽極酸化・水熱処理チタン上でのマウス間葉系幹細胞への影響．第45回日本口腔インプラント学会学術大会 2015年9月21-23日、岡山シティミュージアム、岡山県岡山市

佐藤 満成, 吉田 康夫, 永野恵司, 長谷川 義明, 武部 純, 吉村 文信：A study on CoA-transferases on mechanisms to produce butyrate in Porphyromonas gingivalis．第57回歯科基礎医学会, 2015.9.13. 朱鷺メッセ、新潟県新潟市
福澤 蘭, 尾澤昌悟, 小島規永, 武部 純：変動磁場刺激に対するマウス骨芽細胞様細胞の遺伝子解析．第57回 歯科基礎医学会, 2015.9.12. 朱鷺メッセ、新潟県新潟市

武部 純, 伊藤茂樹, 島崎伸子, 古川良俊, 近藤尚知：舌全摘症例に対する下顎顎義歯の製作法と治療効果の一考察；第31回日本顎顔面補綴学会学術大会；2014年6月21,22日、仙台市民会館、宮城県仙台市

武部 純, 三浦真悟, 宮田京平, 伊藤茂樹, 工藤 努, 近藤尚知：陽極酸化・水熱処理チタン表面性状が上皮細胞の細胞接着関連遺伝子発現に及ぼす影響；公益社団法人日本補綴歯科学会・第123回学術大会；2014年5月24-25日、仙台国際センター、宮城県仙台市

Takebe J, Miura S, Ito S, Kondo H：Analysis of Surface Wettability on Anodization-Hydrothermal Treatment of c.p.Ti Surface with Nano-topography；The 9th Scientific meeting of the Asian Academy of Osseointegration; 2014, July4-5. Sapporo Education and Culture Hall, Hokkaido, Sapporo, Japan

Takebe J, Ito S, Miura S, Miyata K, Ishibashi K：The Effects of Ionizing Radiation on Osteoblast Behavior and Mineralization Process；the 60th Annual Meeting of the American Academy of Maxillofacial Prosthetics and 10th Biennial Meeting of the International Society for Maxillofacial Rehabilitation, October 27-30, 2013 Hyatt Regency Tamaya Resort&Spa, Santa Ana Pueblo, New Mexico, USA

島崎伸子、富田 寛、山森徹雄、田崎智子、川村憲一、豊田 勝彦、武部 純、近藤尚知：唾液中亜鉛結合タンパク質を用いた味覚障害のスクリーニング法 - イムノクロマト測定値と血清亜鉛値との関

連-；第47回日本味と匂学会、2013年9月6-7日、仙台市民会館、宮城県仙台市
武部 純、伊藤茂樹、古川良俊、島崎伸子、伊藤創造、近藤尚知：舌全摘症例に対する下顎顎義歯の1例；第30回日本顎顔面補綴学会学術大会、2013年6月21-22日、郡山市民交流センター、福島県郡山市

武部 純、宮田京平、三浦真悟、伊藤茂樹、古川良俊、木村英敏、近藤尚知：陽極酸化・水熱処理チタン表面性状が上皮細胞と線維芽細胞の遺伝子発現に及ぼす影響；公益社団法人日本補綴歯科学会・第122回学術大会；2013年5月18-19日、福岡国際会議場、福岡県福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武部 純 (TAKEBE, Jun)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：50295995

(2) 研究分担者

石崎 明 (ISHISAKI, Akira)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：20356439

帖佐 直幸 (CHOSA, Naoyuki)
岩手医科大学・歯学部・講師
研究者番号：80326694

(3) 連携研究者

大塚 正人 (OTSUKA, Masato)
東海大学・歯学部・准教授
研究者番号：90372945

(4) 研究協力者

伊藤 茂樹 (ITO, Shigeki)
三浦 真悟 (MIURA, Shingo)
宮田 京平 (MIYATA, Kyohei)
尾澤 昌悟 (OZAWA, Shogo)
(平成27年度より研究協力者)
小島 規永 (KOJIMA, Norinaga)
(平成27年度より研究協力者)
秦 正樹 (HATA, Masaki)
(平成27年度より研究協力者)
大見真衣子 (OMI Maiko)
(平成27年度より研究協力者)