

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462924

研究課題名(和文)インプラントの細胞骨格制御能に注目したオッセオインテグレーションへのアプローチ

研究課題名(英文) Approach to osseointegration based on the cytoskeletal regulation by implant

研究代表者

荻野 洋一郎(Ogino, Yoichiro)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：50380431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、インプラントの表面形状による細胞骨格の制御機構と細胞機能に及ぼす影響について解析した。今回、Smooth(S)、Micro(M)、Nano(N)の3種類の表面形状で検討を行った。細胞形態は、Sでは細胞の伸展が認められたが、M、Nでは細長い突起を有する形態を示した。細胞骨格の制御因子であるRhoAは粗さに応じて経時的に活性化された。RhoA阻害剤では全ての表面で細く長い細胞突起を誘導した。細胞機能(接着、遊走、骨芽細胞への分化)ではSで明らかな変化を誘導するものの、M、Nでは限定的であった。以上より表面形状による細胞機能の制御に細胞骨格制御機構の関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cytoskeletal regulation and its related-cellular functions by implant surface topography (Smooth (S), Micron (M) and Nano (N) surfaces) were investigated. S-adherent cells exhibited cell spreading and M- and N-adherent cells had longer and thinner projections. RhoA, a cytoskeletal regulatory factor, was activated in order of surface roughness. Longer and thinner projections were induced by RhoA inhibitor on all surfaces. Although RhoA inhibitor altered cellular functions (adhesion, migration and differentiation into osteoblast) on S surface, these were limited on M and N surface. These findings suggest regulation of cellular functions by surface topography is associated with cytoskeletal regulation.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：インプラント 表面形状 細胞骨格

## 1. 研究開始当初の背景

歯科インプラントサーフェイスの変化は、オッセオインテグレーションの獲得に影響を与えることは知られている。これまで、インプラントサーフェイスの改変が表面積やタンパクの接着を促進することにより、細胞機能の促進につながることは知られていたが、その詳細なメカニズムは未だ完全に明らかにされていない。我々は、これまでの研究で各種サーフェイス上に細胞 mesenchymal stem cell (MSC) を播種した場合、細胞の形態的な相違を認めた (図1)。その相違から、インプラントサーフェイスに反応する最初の現象である細胞の接着あるいは形態形成は、その後の機能発現に重要な役割を果たしているのではないかと考えた。そこで、細胞の形態や細胞骨格と細胞の機能に関し、過去の報告を見てみると、細胞の形態がその後の細胞の分化に影響を及ぼすこと、また、その細胞骨格の形成には、Rhoファミリーに属する RhoA などのタンパクが関与している事が報告されている。

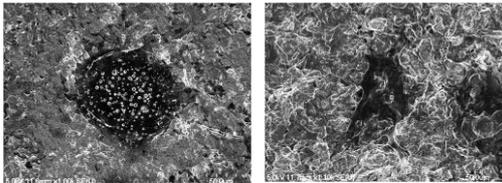


図1：表面形状が異なる場合の細胞形態の変化 (左：スムーズ、右：ラフ)

しかし、これまで、インプラントサーフェイス上において、細胞骨格と細胞の機能発現、あるいはサーフェイスによる Rhoファミリータンパクのコントロール能について、報告している研究は見当たらない。これらの報告を踏まえると、この細胞骨格をコントロールすることによって、その機能の発現を制御し、オッセオインテグレーションの促進が可能になるのではないかとこの着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、「細胞骨格の制御によるオッセオインテグレーション促進作用を検討する」ことである。

検討事項は以下のとおりである。

(1) 異なったインプラントサーフェイスを作製し、その特徴を示す。

本研究では Smooth、Microscale、Nanoscale Surface (それぞれ、S、M、Nと定義する。) をタイプIVチタンから作製する。

(2) 異なったインプラントサーフェイス上における細胞骨格 (形態) や Rhoファミリータンパクの発現を比較し、サーフェイス依存性の機能発現に対する細胞骨格の関与を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 各種サーフェイスディスクの作製

本研究ではタイプIVチタンを用いて、研磨のみの S、研磨後、100  $\mu\text{m}$  のアルミナ粒子をサンドブラストし、5NHC1 を用いて酸処理を行った M、同様にサンドブラスト後、30%の  $\text{H}_2\text{O}_2$  と  $2\text{NH}_2\text{SO}_4$  の混和液で酸処理を行った N を作製した。

### (2) 作製したチタンディスクの表面解析

作製したチタンの表面解析には表面の観察に走査型電子顕微鏡 (FEG-SEM; SEM, Hitachi S-4700) を、また粗さの測定にはレーザー顕微鏡 (VK-9710, Keyence) を用いて解析を行った。

### (3) 細胞培養

各チタンディスク上での細胞の反応を観察するためにマウス間葉系幹細胞株の C3H10T1/2 を用いた。なお、培養には Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza) とウシ胎児血清 (FBS, Gibco) を用いた。

### (4) RhoA 活性化阻害剤

RhoA は、低分子量 G タンパク質の一種で、主に細胞骨格の制御に関わる。本研究ではこの RhoA の活性化を検証することと RhoA 阻害によって細胞反応、機能がどのような影響を受けるかを検証する。RhoA の阻害剤には cell-permeable C3 transferase (以下 C3; Cytoskeleton) を用いた。

### (5) 細胞形態観察

各チタンディスク上に細胞を播種し、2、6 時間後の細胞形態の観察を行った。細胞を播種後にアクチン線維をファロイジン (Texas Red1-X phalloidin, Invitrogen)、また核を 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; ProLong Gold antifade reagent with DAPI, Invitrogen)、ビンキュリンを抗ビンキュリン抗体 (monoclonal anti-vinculin FITC, Sigma) で染色し、蛍光顕微鏡 (Olympus IX51, Olympus) で観察を行った。また、C3 を添加した場合の形態観察も行った。

### (6) 細胞接着試験

細胞を各チタンディスク上に播種し、2、6 時間後の細胞接着数を算出 (MTS Assay; CellTiter 961 Aqueous One Solution Reagent, Promega) し、細胞接着率 (検出された細胞数/細胞播種数) を計測した。また、C3 を添加した場合の接着率も算出した。

### (7) 細胞遊走試験

各チタンディスク上に細胞を播種し、チタンディスク上で細胞がコンフルエントになったのち (24 時間経過後)、1000  $\mu\text{L}$  のピペットチップで擦過し、細胞の遊走試験 (wound healing assay) を行った。擦過後、4、8、12、16 時間後の細胞の遊走率 (擦過部の面積に対する細胞の占有率) を算出するために、

細胞のアクチンをファロイジンで染色することで視覚化し、上記の蛍光顕微鏡の観察により算出した。同様にまた、C3を添加した場合の遊走率も併せて算出した。

#### (8) 骨芽細胞への分化実験

各チタンディスク上に播種した細胞を骨芽細胞誘導メディウム (OST media: 10mM glycerophosphate, 0.2mM ascorbic acid, 10 nM dexamethasone) での培養により分化誘導をかけ、骨芽細胞関連遺伝子 (アルカリフォスファターゼ (ALP)、タイプ I コラーゲン (ColI)、Osterix (Osx)、Runx2) の発現を real time PCR 法 (ABI 7200 real-time Thermocycler, Applied Biosystems) を用いて検証を行った。同じく C3 を用いて RhoA 活性化の影響を検証した。

#### (9) RhoA 活性度の測定

細胞の接着、遊走、分化の過程での RhoA の活性度について、測定キット (G-LISA RhoA activation assay kit, Cytoskeleton) を用いて計測を行った。また、C3 投与群に対しても同じく測定を行った。

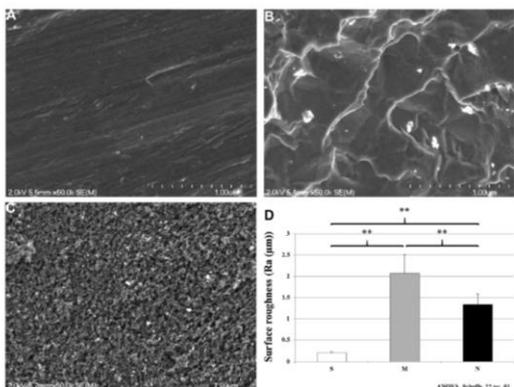
#### (10) 統計解析

測定結果は、平均値±標準偏差で表記した。各チタンディスク間の比較には一元配置分散分析を用いて各群間の比較の事後比較には Scheffe を用いた。また、各チタンディスクにおける C3 なしの群と C3 ありの群の比較には t 検定を行った。いずれも  $p < 0.05$  で有意差ありとした。

### 4. 研究成果

#### (1) 各チタンディスクの表面解析

各チタンの表面の解析結果を以下に示す。



A: S 表面は、滑沢で突起のような構造を有しない。

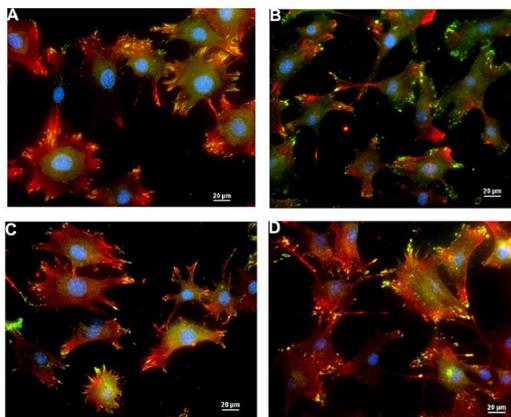
B: M 表面は不規則な凹凸を有しており、マイクロスケールの構造を認めるが、ナノレベルでの微細構造は認めない。

C: N 表面は、全体が微細な凹凸で覆われており、ナノ構造を有していることが示された。

D: 表面の粗さ (Ra (μm)) をレーザー顕微鏡で計測。各群間で有意差を認めた。

#### (2) 細胞形態の観察

蛍光顕微鏡による形態観測の結果を以下に示す。赤がアクチン、緑がビンキュリン、青が核を示している。

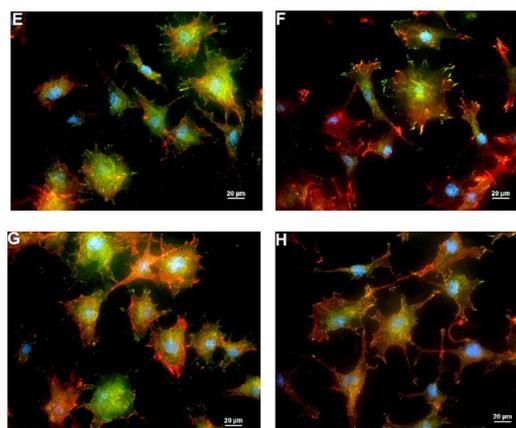


S 上における播種後 2 時間 (A)、6 時間 (B) の細胞形態

細胞は伸展し、細胞から伸びている突起の先にはビンキュリンの発現が認められる。

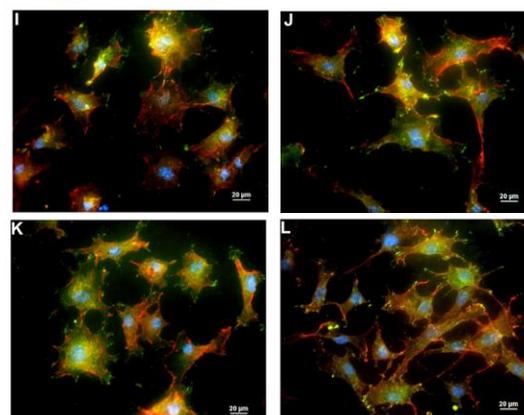
C3 を添加した S 上における播種後 2 時間 (C)、6 時間 (D) の細胞形態

未添加群 (A、B) と比較して細胞はより細く長い突起を示した。



M 上における播種後 2 時間 (E)、6 時間 (F)、C3 添加群の 2 時間 (G)、6 時間 (H) の細胞形態。

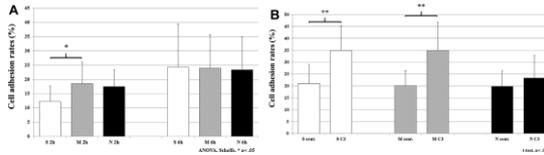
S 群と比較して、M 上では細胞の伸展は弱く、多くの突起を有していた。添加群 (G、H) では未添加群 (E、F) と比較して細胞はより細く長い突起を示した。



N上における播種後2時間(I)、6時間(J)、C3添加群の2時間(K)、6時間(L)の細胞形態。M群同様、N上では細胞の伸展は弱く、多くの突起を有していた。添加群(K、L)では未添加群(I、J)と比較して細胞はより細く長い突起を示した。

これらの結果より、細胞形態の制御にインプラント表面が関与しているが、M群とN群では顕著な差は認めなかった。C3の効果は全群で認められた。

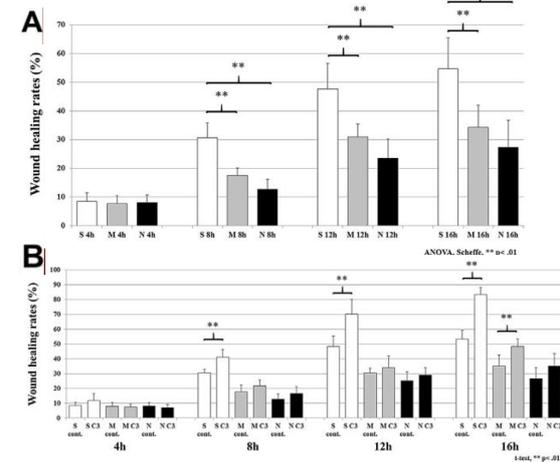
### (3) 細胞接着試験



2、6時間後の各ディスク間の接着率(A)と6時間後のC3未添加群、添加群との比較(B)。細胞接着率は、2時間ではS群とM群との間に有意な差を認めたが、6時間で各群に差は認めなかった。C3添加した場合、S、M群では2群間に有意な接着促進効果を認めたが、N群では差は認めなかった。

これらの結果より、細胞の接着は接着初期(2時間)にはインプラント表面は関連するものの、時間経過に伴って細胞接着促進効果は認められなかった。しかし、C3によるRhoAの阻害によってS、M群では接着細胞数(6時間)は促進されたものの、N群ではその促進効果は認められなかった。

### (4) 細胞遊走試験



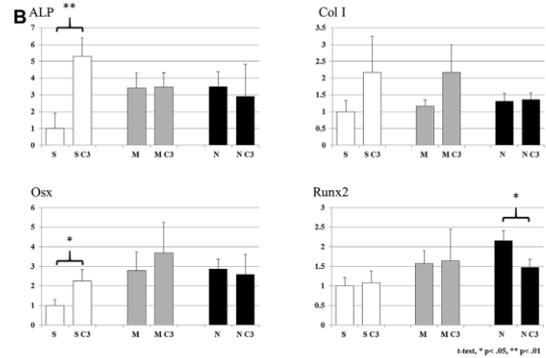
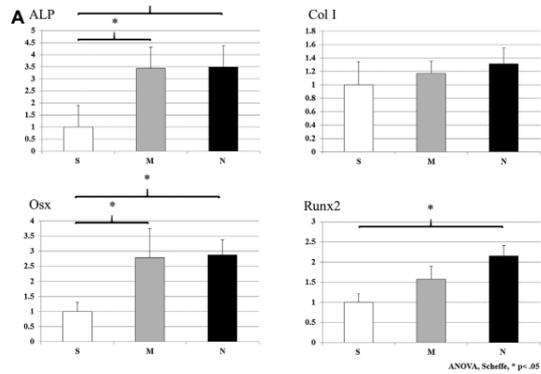
A: 細胞遊走試験の各ディスク群の比較。8、12、16時間でS群とM、N群で有意差を認めた。

B: C3未添加群と添加群との比較。S群では8、12、16時間後で、M群では16時間後で細胞遊走に有意な差を認めたが、N群ではC3の添加で16時間まででは有意な差を認めなかった。

以上の結果より、M、Nのような粗なインプラ

ント表面ではSのようなインプラント表面と比較して細胞遊走は抑制された。C3の添加により、S、M(16時間後のみ)群では細胞遊走において有意に促進されることが確認されたが、N群ではその促進効果は認められなかった。

### (5) 骨芽細胞への分化実験

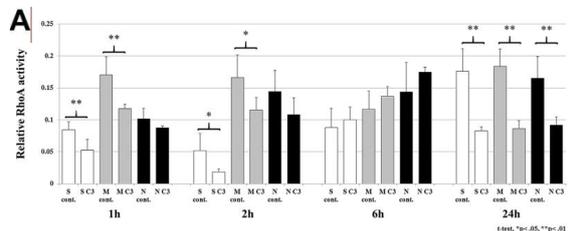


A: 骨芽細胞関連遺伝子の各ディスクでの発現の比較。4遺伝子中2遺伝子でSとMとの間に、3遺伝子でSとNとの間に有意差を認めた。

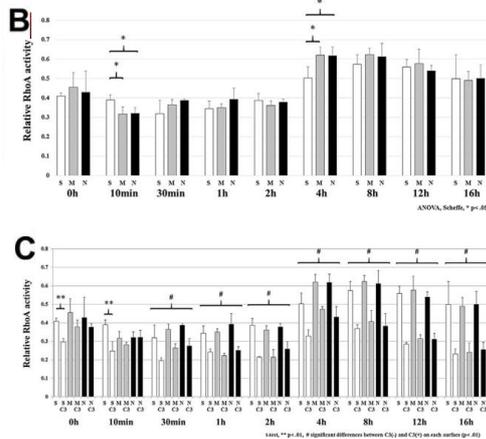
B: 各チタンディスク上においてC3未添加群と添加群との骨芽細胞関連遺伝子の発現の比較。S群においては、C3の添加によって4遺伝子中2遺伝子で発現促進が認められた。M群では全遺伝子で発現に差を認めなかったが、N群においては1遺伝子(Runx2)では有意な抑制を認めた。

これにより、骨芽細胞関連遺伝子の発現は、粗なインプラント表面はSよりも有意に促進された。RhoAの抑制により、M群では差は認められなかったが、S群では発現促進効果が、N群では一部抑制効果といった対照的な結果となった。

### (6) 各細胞機能時のRhoA活性度の測定

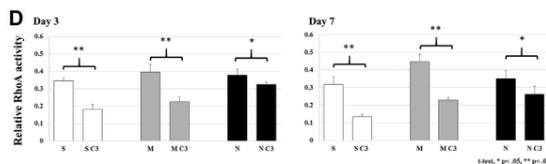


A:細胞接着時における RhoA の活性化の測定。C3 の添加により、S 群、M 群においては 1、2 時間後までは RhoA の抑制効果が認められたが、N 群では認められなかった。6 時間後では全群において RhoA の活性化に差は認めなかったが、24 時間後では全群において C3 による抑制効果が認められた。



B:細胞遊走時の各群における RhoA の活性化の測定。ピペットチップで擦過後、時間経過に伴う活性化を比較したところ、10 分後では S 群において M、N 群と比較して有意に高い値を示した。その後は 4 時間後には S 群においては M、N 群において有意に低い値になった。以上の結果より、S 群では擦過後の細胞遊走の際、RhoA の活性化は早期に起こる一方で、M、N 群では徐々に活性化されていき、4 時間後に細胞接着時と同様に S 群よりも有意に高い値を示した。しかし、その後は各群に有意差はなかった。

C: C3 未添加群と添加群においては、S 群では測定した時間すべてにおいて C3 による有意な抑制効果が認められた。M、N 群でも 30 分以降では有意な抑制効果が認められた。



D:骨芽細胞への分化誘導中における RhoA 活性化の比較 (左 3 日目、右 7 日目)。分化実験においては、RhoA の活性化は 3 日目、7 日目ともに C3 による有意な抑制効果を認めた。

全体をまとめると、

(1)インプラントサーフェイスを模倣したチタンディスクの表面形状 (S、M、N) によって細胞形態に変化 (S:細胞の伸展、M、N:突起を有する細胞形態を示す) を及ぼす。RhoA のインヒビターである C3 を添加すると、全群で細胞がより細くより長い細胞突起を形成することが示され、細胞形態における C3 の効果は全群で認められた。これは、過去の

報告 (Passeri et al., 2010; Seo et al., 2011, 2014; Galli et al., 2012; Prowse et al., 2013) と一致する部分があり、また、再確認できた事項であるといえる。

(2)細胞接着においては、細胞接着のごく初期には、M 上で細胞接着促進効果が認められたが、6 時間後には差は認めなかった。C3 の添加によって、6 時間後の細胞接着率は S、M 群で添加していない群と比較して有意な細胞接着促進効果を認めたものの、N 群では促進効果を認めなかった。

(3)細胞遊走試験においては、S 上では、表面が滑沢であるため細胞の遊走が起きやすい一方で、M、N においては粗な表面であるために細胞遊走は抑制傾向にあった。ここに C3 を添加すると、細胞の遊走能は S、M 上では促進効果が認められた一方、N 上では有意な差は認めなかった。この結果では細胞に遊走能、移動能は RhoA が関与していることが示されたが、N 上においては C3 による RhoA 活性の抑制効果は認めるものの、この抑制による遊走制御が認められなかった。

(4)細胞分化においては、S 群と M、N 群といった粗な表面で、骨芽細胞関連遺伝子の発現に有意な差を認めた。C3 による RhoA 活性の有意な抑制作用は確認できた。しかしながら、S 上では骨芽細胞への分化が部分的に促進されたのに対し、M 群ではその効果は認めず、N 群では一部抑制が認められた。

これらの結果を踏まえると、インプラントサーフェイスは、細胞形態の制御を行なうことが示され、これには細胞骨格形成に関わるアクチンの RhoA による制御が関与していることが示された。しかしながら、RhoA による細胞機能の制御は、インプラントサーフェイスに依存し、また機能によっても異なることが示された。特に、近年注目を集めている、nanostructured surface では、RhoA の活性化はこれまで臨床でも広く応用されてきた microstructured surface と同様に活性化されていき、RhoA のインヒビターである C3 を培養中に添加すると RhoA 阻害時の特徴的な形態である細く長い細胞突起を誘導することが観察された一方で、細胞機能では、他のサーフェイスで認められた細胞接着促進作用、細胞遊走促進作用は確認されなかった。また、骨芽細胞への分化の指標となる骨芽細胞関連遺伝子の発現では S 群では認められた C3 による促進作用は認められず、むしろある遺伝子については抑制効果が認められた。これまで、インプラント周囲における骨形成において nanostructured surface の優位性は複数の論文で骨芽細胞関連遺伝子の発現促進などで報告されているものの、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。今回の

研究ではその点に特化した示唆はできなかつたものの、RhoAに関連した細胞機能の制御でも他の表面形状と異なっていることから、nanostructured surfaceの特異性や独自のシグナル伝達制御機構を持っている可能性を示唆できたと考えている。本研究で得られた結果を踏まえて、nanostructured surfaceのオッセオインテグレーション制御機構の解明にさらに取り組んでいくことを今後の研究課題とすることで本研究の結語としたい。

#### 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 1件)

(1) Ogino Y, Liang R, Mendonça DB, Mendonça G, Nagasawa M, Koyano K, Cooper LF. RhoA-Mediated Functions in C3H10T1/2 Osteoprogenitors Are Substrate Topography Dependent. J Cell Physiol. 2016 Mar;231(3):568-75.

[学会発表] (計 4件)

(1) 荻野洋一郎, 長澤麻沙子, 古谷野潔 インプラント表面形状依存性の細胞骨格形成因子 RhoA が骨分化能におよぼす影響 公益社団法人日本補綴歯科学会第125回学術大会金沢, 7月, 2016年

(2) Ogino Y, Cooper LF, Koyano K. Specific acid-treated surface topography alter hydrophilicity and osteogenic cellular responses. 16th biannual meeting of International Collage of Prosthodontics, Seoul, Korea, September, 2015

(3) Ogino Y, Cooper L, Koyano K. Topography influences cellular responses and RhoA activity of titanium surface-adherent cells. Congress of Asian Academy of Prosthodontics, Taipei, Taiwan, November, 2014

(4) Ogino Y, Cooper L, Koyano K. Topography influences cellular functions and RhoA activity of titanium surface-adherent cells. 9th International Workshop on Biomaterials in Interface Science, Miyagi, Japan, August, 2014

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0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 0件)

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

[その他]

ホームページ等 特になし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
荻野 洋一郎 (OGINO, Yoichiro)  
九州大学・歯学研究院・助教  
研究者番号 : 50380431

(2) 研究分担者  
熱田 生 (ATSUTA, Ikiru)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号 : 30423487

鮎川 保則 (AYUKAWA, Yasunori)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号 : 50304697

古谷野 潔 (KOYANO, Kiyoshi)  
九州大学・歯学研究院・教授  
研究者番号 : 50195872

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者  
( )