

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462993

研究課題名(和文) 骨芽細胞分化誘導能を有する亜鉛徐放型チタン系フレームワークの創製

研究課題名(英文) Development of zinc sustained-release titanium framework to promote the proliferation and differentiation of osteoblasts

研究代表者

福田 雅幸 (FUKUDA, MASAYUKI)

秋田大学・医学部・准教授(病院教授)

研究者番号：20272049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：チタン表面に亜鉛錯体を修飾させることによって亜鉛徐放型チタン系(Zn-Ti)フレームワークを作製し、骨芽細胞の分化・増殖を促進する効果について検討した。作製したZn-Tiメッシュは亜鉛イオンを徐放させることができ、この亜鉛イオンは、材料周囲の細胞を骨芽細胞へ分化・増殖させ、さらに石灰化を促進させることが判った。ラット頭蓋骨に作製した骨欠損をZn-Tiメッシュで被覆する骨形成能の実験では、コントロールに用いたTiとZn-Tiの間には骨再生率に差はみられたが、統計学的に有意な差は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of promoting the differentiation and proliferation of osteoblasts by preparing a zinc sustained-release titanium (Zn-Ti) framework by modifying zinc complex on titanium surface. It was found that the Zn-Ti mesh can release zinc ions in a sustained manner, and this zinc ion differentiates and proliferates the cells surrounding the material into osteoblasts and further promotes mineralization. In bone formation ability experiments in which bone defects prepared in the rat skull were coated with Zn-Ti mesh, there was a difference in bone regeneration rate between Ti and Zn-Ti used for control, but statistical no significant difference was obtained.

研究分野：口腔外科学

キーワード：顎骨再建 亜鉛 チタン フレームワーク

1. 研究開始当初の背景

現在、臨床応用されているフレームワークの多くはチタンあるいはチタン合金製で、生体内で安定しているため、それらを用いた骨再建は予知性の高い治療法として広く認識されている。これらの材料の多くは、表面に足場となる水酸基が存在し、この水酸基を介して材料と新生骨とが接着するため、既存の間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化・増殖のスピードが骨形成速度に影響する。われわれは、骨芽細胞への分化・増殖を反応触媒のように促進する因子として生体内に微量に存在する亜鉛イオンに注目し、亜鉛徐放型チタン系 (Zn-Ti) インプラントの試作に成功した (課題番号 22591448)。本研究では、その発展系として従来の生体材料の概念を超えた、iPS 細胞などの幹細胞を用いない画期的な医療材料として、Zn-Ti フレームワークを開発することを考えた。

2. 研究の目的

本研究では、様々な濃度の亜鉛イオンを徐放する Zn-Ti フレームワークの生体内外研究を用い、新生骨形成に最適なフレームワークの創製を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 亜鉛徐放型チタン系 (Zn-Ti) フレームワークの作製と表面性状の評価

材料は純チタン (Ti) のメッシュで、表面処理には、水酸化ナトリウム水溶液に硝酸亜鉛水溶液を加え、さらに水酸化ナトリウム水溶液を加えて得られたテトラヒドロキシ亜鉛酸錯体を含む水溶液を用いた。チタンメッシュをこの錯体水溶液に浸漬し、60 で 12、24、48 時間保持することで試料を作製した (Zn-Ti フレームワーク)。試料の表面性状は、電子顕微鏡写真 (SEM)、エネルギー分散型 X 線分析 (EDX)、薄膜 X 線回折 (TF-XRD) および X 線光電子分光分析 (XPS) で評価した。また、試料を超純水中に 72 時間浸漬し、亜鉛溶出液 (EZ: Eluted Zinc ion) を精製した。亜鉛イオンの濃度の測定は、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES: Inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry) を用いて行った。コントロールには、未処理の Ti を用いた。

(2) Zn-Ti フレームワークから徐放される亜鉛イオンが骨芽細胞に及ぼす影響についての検討

Zn-Ti フレームワークを超純水中に 72 時間浸漬し、亜鉛溶出液 (EZ: Eluted Zinc ion) を精製した。本検討には、株化したヒト骨髄由来骨芽細胞 (hBMCs) を用いた。培養皿上で、hBMCs を培養し、骨髄間葉系間質細胞から骨芽細胞への誘導は標準培地で細胞を培養し、細胞がサブコンフルエントに達した後、骨芽細胞誘導培地による分化誘導を行うとともに、最終的に調整した 3 種類の濃度の EZ を添加した。また、分化誘導後の細胞生存率、

骨芽細胞分化および基質石灰化に関して、それぞれ MTT アッセイ、real time PCR および von Kossa 染色を行い評価した。

(3) Zn-Ti フレームワーク周囲の骨形成能のスクリーニング

ラットの頭蓋骨に、トレフィンバーを用いて直径 8mm の critical size (自然に治癒しない大きさ) の骨欠損を形成した。この骨欠損にシート状のコラーゲンスポンジ (type コラーゲン) を充填し、Zn-Ti フレームワークで被覆した。対照として、Ti メッシュを使用した。移植後 2、4 週に試料を摘出し、骨の再生を組織学的に評価した。骨形成率の測定には画像解析ソフトを用いた。

4. 研究成果

(1) 亜鉛徐放型チタン系 (Zn-Ti) フレームワークの作製と表面性状の評価

材料を 12 時間および 48 時間浸漬した試料は、表面性状が安定せず、本研究から除外した。24 時間表面処理した試料の表面は、SEM では、非常に細かい凹凸が形成しており、EDX の元素分析では、亜鉛が検出された。TF-XRD では、非常にブロードな酸化チタンに相当する回折ピークが検出され、表面にはアモルファスに近い酸化チタンが形成された。XPS から、 TiO_2-X の傾斜組成をもち、その表面に約 20nm の厚さの化学修飾亜鉛層が認められた (図 1)。また、亜鉛イオンの徐放は、浸漬後 4 時間で始まり、72 時間で 650nM に達することが判った。

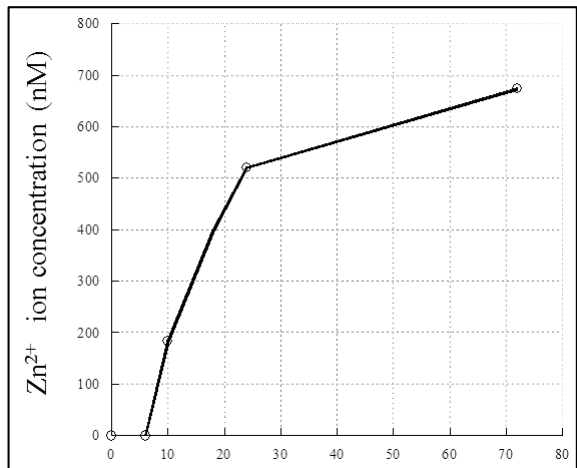


図 1

(2) Zn-Ti フレームワークから徐放される亜鉛イオンが骨芽細胞に及ぼす影響についての検討

骨髄間葉系間質細胞への EZ の添加 (0.32、3.2、32nM に調整) により細胞生存率は上昇し、骨芽細胞の分化マーカーである type I collagen、osteocalcin(OC)、alkaline phosphatase(ALP)、bone sialoprotein(BSP) の mRNA の発現上昇を認めた (3.2 > 32 > 0.32nM)。さらに、培養 21 日目には von Kossa 染色陽性のカルシウム沈着の亢進を認めた (図 2、ZnCl₂ は positive control)。

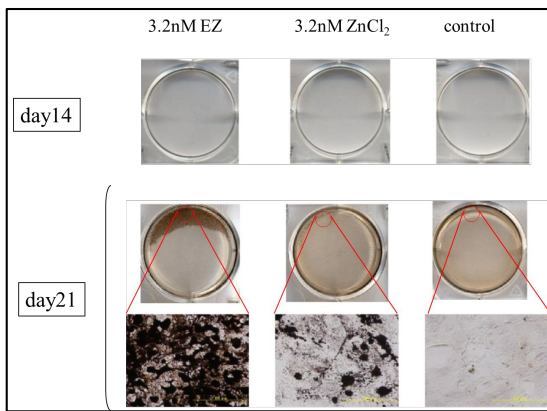


図 2

(3) Zn-Ti フレームワーク周囲の骨形成能のスクリーニング

Zn-Ti フレームワークは、非常に高い骨再生率を示した。しかし、対照の Ti メッシュとの間に統計学的有意差は認められなかった (図 3)。

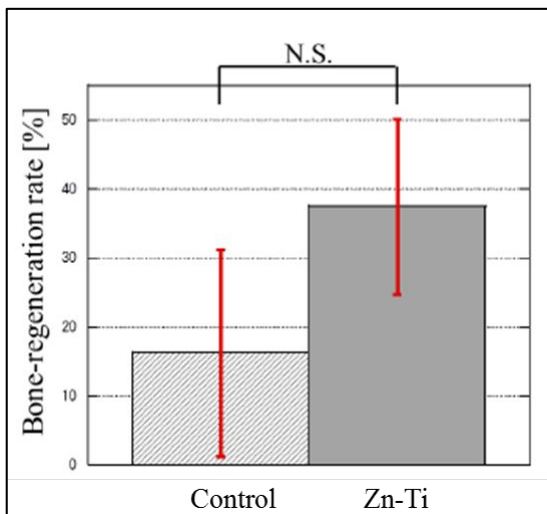


図 3

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. 福田雅幸, 高野裕史: 顎顔面領域の再建治療におけるインプラントの役割. 顎顔面インプラント誌 15: 3-15, 2016. (査読あり)
2. Yusa K, Yamamoto O, Takano H, Fukuda M, Iino M: A zinc-modified titanium surface enhances osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in vitro. Scientific Reports| 6: 29462| DOI: 10.1038/srep29462, 2016. (査読あり)
3. Yusa K, Yamamoto O, Iino M, Takano H, Fukuda M, Qiao Z, Sugiyama T: Eluted zinc ions stimulate osteoblast differentiation and mineralization in human dental pulp stem cells for bone tissue engineering. Archives of Oral Biology 71: 162-169, 2016. (査読あり, <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.0>

7.010)

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 福田雅幸: ULTRA FLEX MESH CUSTOM®を用いた下顎骨再建. 第 62 回日本口腔外科学会総会・学術集会. 2017 年 10 月, 京都.
2. 福田雅幸: 医学部附属病院における歯科技工室とのコラボレーション. 日本歯科技工学会北海道・東北支部平成 28 年度学術大会. 2016 年 11 月, 秋田.
3. 遊佐和之, 高野裕史, 福田雅幸, 飯野光喜: 亜鉛修飾型チタンの歯髄幹細胞における骨芽細胞分化促進作用の検討. 第 20 回日本顎顔面インプラント学会総会. 2016 年 11 月, 東京.
4. 遊佐和之, 高野裕史, 福田雅幸, 尾崎 尚, 北畠健一郎, 橘 寛彦, 石川恵生, 飯野光喜: 歯髄幹細胞および亜鉛修飾型チタンを用いた骨再生療法に関する基礎的研究. 第 61 回日本口腔外科学会総会. 2016 年 11 月, 幕張.
5. 遊佐和之, 山本 修, 高野裕史, 福田雅幸, 飯野光喜: 亜鉛徐放型チタンスキャホールドおよび歯髄幹細胞を用いた骨増生法開発に関する基礎的研究. 第 46 回日本口腔インプラント学会総会. 2016 年 9 月, 名古屋.
6. 高野裕史, 中田 憲, 山崎雅人, 桑島精一, 福田雅幸: 下顎骨再建部に埋入したインプラントに対する放射線治療の影響について. 第 46 回日本口腔インプラント学会総会. 2016 年 9 月, 名古屋.
7. 山本 修, 福田雅幸: コラーゲン架橋形成インプラントの骨結合力. 第 35 回日本口腔インプラント学会東北・北海道支部総会. 2015 年 11 月, 仙台.
8. 高野裕史, 中田 憲, 山崎雅人, 福田雅幸: 口腔癌術後のインプラント義歯症例における放射線治療の影響について. 第 19 回日本顎顔面インプラント学会総会学術大会. 2015 年 11 月, 横須賀.
9. 福田雅幸: 顎顔面領域の再建治療におけるインプラントの役割. 第 26 回日本顎顔面インプラント学会教育研修会. 2015 年 8 月, 仙台.
10. 山本 修, 遊佐和之, 福田雅幸, 飯野光喜: 歯科用インプラントとしてのガラス状炭素の検討. 第 34 回日本口腔インプラント学会東北・北海道支部総会. 2014 年 11 月, 山形.
11. 福田雅幸: 口腔癌治療後のインプラント治療について. 第 59 回日本口腔外科学会総会. 2014 年 10 月, 幕張.
12. 遊佐和之, 尾崎 尚, 高野裕史, 福田雅幸, 飯野光喜: 水和亜鉛イオンは歯髄由来細胞の骨芽細胞分化を促進する. 第 59 回日本口腔外科学会総会. 2014 年 10 月, 幕張.
13. 高野裕史, 中田 憲, 近江龍哉, 谷藤未

典，山崎雅人，桑島精一，福田雅幸：インプラント義歯により咬合再建を行った口腔癌放射線治療症例の臨床的検討．第 59 回日本口腔外科学会総会．2014 年 10 月，幕張．

14. 高野裕史，中田 憲，山崎雅人，桑島精一，福田雅幸：口腔癌放射線治療後のインプラント義歯症例における臨床的検討．第 44 回日本口腔インプラント学会総会．2014 年 9 月，東京．
15. 遊佐和之，山本 修，高野裕史，福田雅幸，飯野光喜：亜鉛イオン含有溶液による歯髄幹細胞の骨芽細胞分化促進作用．第 44 回日本口腔インプラント学会総会．2014 年 9 月，東京．
16. 山本 修，遊佐和之，福田雅幸，飯野光喜：亜鉛修飾したインプラントの骨接着性と細菌付着．第 44 回日本口腔インプラント学会総会．2014 年 9 月，東京．

〔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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

福田雅幸 (FUKUDA MASAYUKI)

秋田大学・医学部・病院教授

研究者番号：20272049

(2)研究分担者

山本 修 (YAMAMOTO OSAMU)

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号： 00230540

(3) 研究分担者

高野裕史 (TAKANO HIROSHI)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：30282172