

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670829

研究課題名(和文) マイクロナノ構造を有する薄膜を用いた新たなインプラント周囲炎治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the therapeutic method for peri-implantitis using thin membranes with micro-nano structures

研究代表者

横山 敦郎 (Atsuro, Yokoyama)

北海道大学・歯学研究科・教授

研究者番号：20210627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：熱ナノインプリント法を用いてマイクロ・ナノパターン(Groove構造およびPillar構造)を持つゼラチンシート、チタンシートを作製し、骨芽細胞、線維芽細胞、上皮細胞を培養し、細胞附着挙動について検討した。骨芽細胞、線維芽細胞では、マイクロ・ナノ構造は、接着班の数や細胞接着数を増加させたが、上皮細胞では、特にPillar構造では細胞の接着を抑制した。

以上の結果から、マイクロ・ナノパターン形状は、骨芽細胞、線維芽細胞および上皮細胞における細胞接着、配向性に影響を与えることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, a nano imprint method was used to develop gelatin and titanium sheets with grooved and pillared structures. We investigated the effects of surfaces with micro and nano structures on adhesion and proliferation of osteoblasts, fibroblasts, and epithelial cells. However micro and nano structures accelerated adhesion and proliferation of osteoblasts and fibroblasts, those prevented epithelial cells. These results suggested that the micro and nano grooved and pillared structures effect on adhesion and orientation of osteoblasts, fibroblasts and epithelial cells.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：マイクロナノ構造 骨芽細胞 線維芽細胞 上皮細胞 細胞接着 マイクログループ構造 マイクロピラー構造

1. 研究開始当初の背景

デンタルインプラントによる補綴処置は、欠損補綴処置として広く臨床に普及しているが、様々な問題がある。特に、近年、合併症としてインプラント周囲炎が注目され、CO₂レーザーを用いた保存的治療法や骨移植などの外科的治療法について、基礎、臨床を含めて多くの研究がなされている。しかし、骨吸収が生じ感染がインプラント表面に及んだ場合、露出されたインプラント表面の汚染を除去し、骨組織を再生することは難しい。特に、インプラント体の粗造な表面に感染が及ぶ場合には、再オッセオインテグレーションの獲得や骨の再生は困難であり、有効な治療方法は開発されておらず、インプラント治療において大きな問題となっている。

2. 研究の目的

我々の最終的な目的は、ナノインプリント法にて作製したマイクロ・ナノパターン構造を有するフレキシブルな膜を露出したインプラント表面に貼付することにより積極的に細胞を誘導し、オッセオインテグレーションを再獲得するとともに骨組織を再生するというインプラント周囲炎に対する新たな治療法を開発することである。

本研究では、微細な構造を持つ型を用いて他の材料へ微細構造を転写する技術であるナノインプリント法を利用してマイクロ・ナノパターン構造を持つゼラチンシートとチタンシートを製作し、骨芽細胞、線維芽細胞ならびに上皮細胞の付着挙動の検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料の作製 (Fig.1)

ゼラチンシート：熱ナノインプリント法にてゼラチンシートを製作した。マイクロ・ナノ Groove 構造を持つ石英マスターモールド上に G-Pet フィルム、またはポリカーボネートフィルムを載せて小型熱プレス機にて熱プレス (0.2MPa、175℃、5 分間) を行い、パターン化レプリカモールドを製作した。得られたレプリカモールド上に 10%ゼラチン溶液を滴下し、24 時間乾燥後、パターンを持つゼラチンシートを製作した。その後、加熱架橋 (200℃、2 時間) を行うことにより Groove 化ゼラチンシートを調製した。

チタンシート：マイクロ・ナノ Groove 及び Pillar 構造を持つ石英マスターモールド上にゼラチンシートと同様の方法で、パターン化レプリカモールドを製作した。パターン化レプリカモールド表面にチタンのスパッタコーティング (0.7MPa、80 分) を行い、Groove 及び Pillar 化チタンシートの調製を行った。

(2) 細胞の付着挙動について

ゼラチンシートについて：Groove 化ゼラチンシート上においては、ヒト正常骨芽細胞

NHOst とヒト歯肉線維芽細胞 HGF を 10% FBS 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 中に 5000 個/cm² 濃度にて播種し培養を行った。評価として、1 時間後の付着細胞数算出、Groove 構造に対する配向性の観察、ならびに走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態観察を行った。

チタンシートについて

パターン化チタンシート上においては、骨芽細胞様細胞 Saos-2 ならびにヒト歯肉上皮系細胞 (Ca9-22) を 10% FBS 含有 DMEM 中に 5000 個/cm² 濃度にて播種し培養を行った。評価として、1 時間及び 24 時間後の接着細胞数算出、SEM による形態観察、免疫染色による接着斑 (ピンキュリン) の観察及び計量を行った。

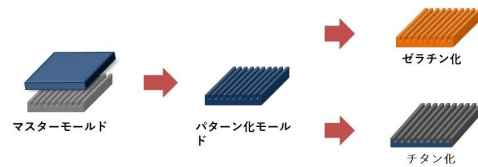


Fig.1 ゼラチンシートならびにチタンシートの作製方法

4. 研究成果

(1) 試料の作製について

ゼラチンシートについて：ゼラチン溶液を用いてナノインプリント法でパターン化した結果、0.5 μm、1 μm、2 μm の Groove 形状が付与されたゼラチンシートを作製することができた。(Fig. 2)

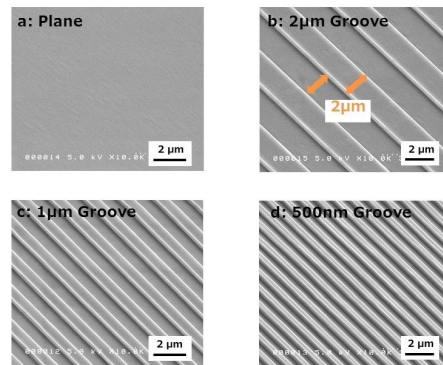


Fig. 2 作製されたゼラチンシートの SEM 画像 a: plane, b: 0.5 μm, c: 1 μm, d: 2 μm

チタンシートについて：ナノインプリント法により 0.5 μm、1 μm、2 μm の Groove 及び Pillar 形状が付与された Ti シートを作製することができた (Fig. 3)。

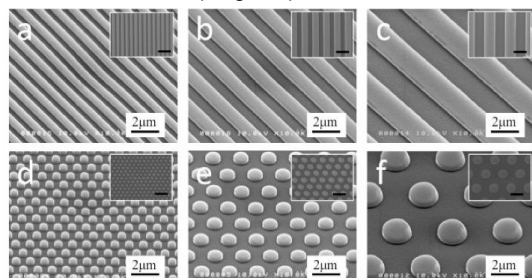


Fig.3 作製されたチタンシートのSEM像
a:0.5 μm groove, b: 1 μm groove, c: 2 μm groove, d: 0.5 μm pillar, e:1 μm pillar, f: 2μm pillar

(2) 細胞の付着挙動について

ゼラチンシートについて：培養1時間後の付着試験において、NH₄Ost 及び HGF とともに Groove 構造では、control である Plane と比較し付着細胞数が有意に多かった($p<0.05$)。Groove の幅による付着細胞数には有意差は認められなかった($p>0.05$)(Fig. 4)。

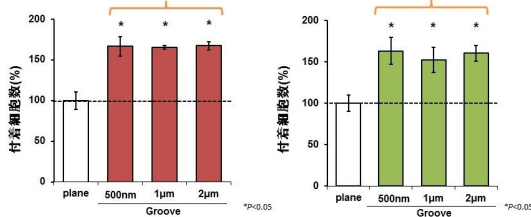


Fig. 4 付着細胞数 左：NH₄Ost 右：HGF

Groove に対する配向性については、NH₄Ost 及び HGF とともに Groove に対して 0° ~15° の間に約 80%以上の細胞の配向が観察され、NH₄Ost 及び HGF では Plane と比較し、Groove に対して強いコンタクトガイダンスが認められた。NH₄Ost 及び HGF の SEM 観察では、Plane 上で四方に伸展しているのが認められたが、Groove 上では、細胞が Groove にそって縦に伸展しているのが観察された。(Fig. 5, 6)

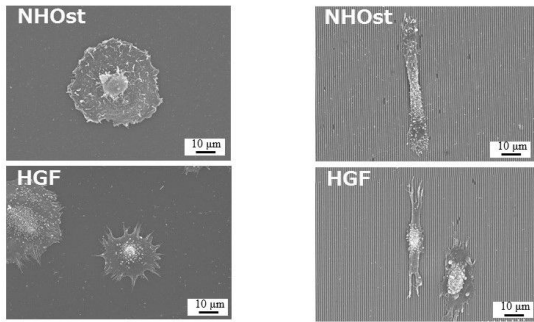


Fig. 5 SEM 像 左：plane 右：Groove

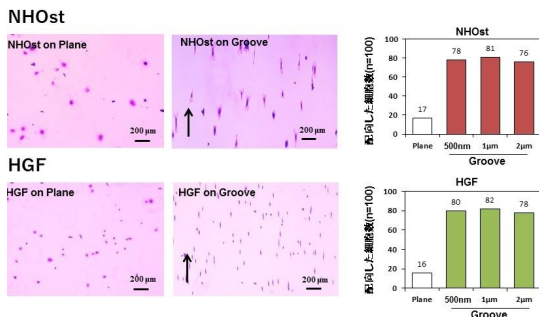


Fig. 6 Contact Guidance NH₄Ost,HGF とともに 80%の細胞にコンタクトガイダンスが認められた。

チタンシートについて：Saos-2 の培養 1 時間及び 24 時間において、Groove 及び Pillar では、Plane と比較して接着細胞数が有意に多かった($p<0.05$)(Fig. 7)。

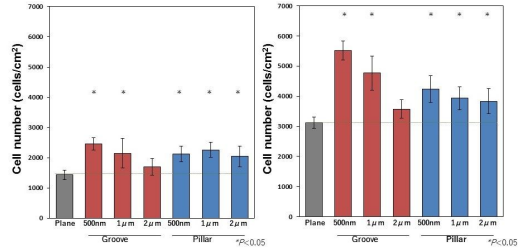


Fig. 7 チタンシート上の Saos2 接着試験 左：1 時間後 右：24 時間後

Ca9-22 に関して、Groove 構造では、1 時間後では接着細胞数には変化が認められなかったが、Pillar 構造においては Plane に比較し、少なかった。24 時間後においては、Plane に比較し、Groove 構造、Pillar 構造とも接着細胞数は少なく、Pillar 構造は Groove 構造より少なかった(Fig. 8)。

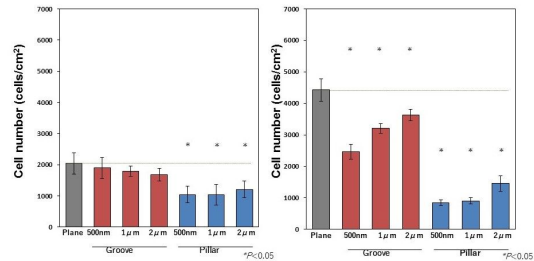
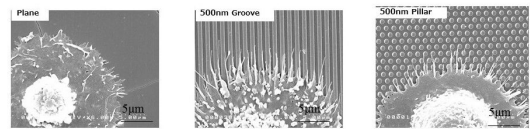


Fig. 8 チタンシート上の Ca9-22 接着試験 左：1 時間後 右：24 時間後

Saos-2 培養 1 時間の SEM 観察から、Groove 及び Pillar においてはパターン構造に細胞の仮足が伸展しているのが観察された。また、Plane と比較して細かい細胞の仮足がよく観察された。一方 Ca9-22 では、Groove、Pillar とともに仮足の伸展は認められなかった(Fig. 9)。

Saos-2



Ca9-22

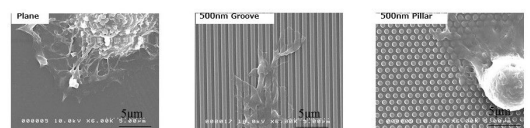


Fig. 9 Saos-2、Ca9-22 の 1 時間後の SEM 像

24 時間培養後に接着斑であるピンキュリンは、Saos-2 に関しては、Groove 構造では、Groove に接着し、Plane よりも伸展しているのが観察された。Pillar 構造では、接着斑は Pillar に伸び、円形に接着しているのが観察された(Fig. 10)。Ca9-22 については、Plane

構造においては、はっきりとした接着班が確認されたが、Pillar 構造では明らかに少なかった(Fig. 11)。Saos-2 では、ピンキュリン接着班の数は 500nm と 1 μ m の Groove 及び Pillar において Plane よりも有意に多かった ($p < 0.05$)。2 μ m の Groove 及び Pillar においては、Plane との間に有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。Ca9-22 においては、Groove、Pillar いずれの条件でも、Plane 構造に比較し有意に少ない値を示した (Fig. 12)。

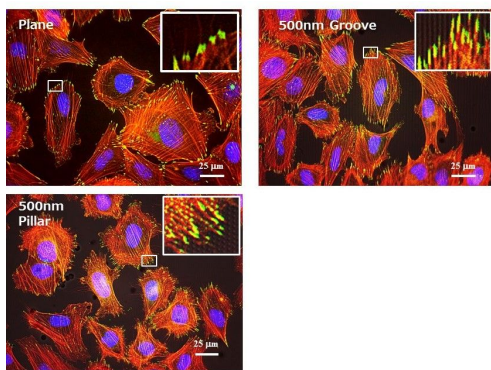


Fig. 10 Saos-2 培養 24 時間後の接着班 緑：ピンキュリン 赤：F-actin 青：核

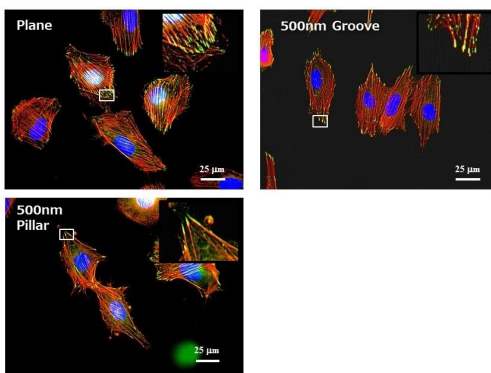


Fig. 11 Ca9-22 培養 24 時間後の接着班 緑：ピンキュリン 赤：F-actin 青：核

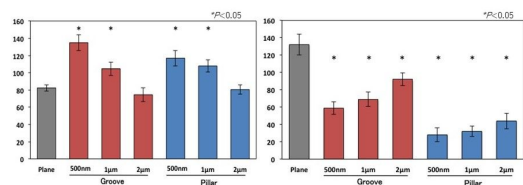


Fig. 12 培養 24 時間後のピンキュリンの数 左：Saos-2 右：Ca9-22

線維芽細胞と骨芽細胞に関して、Groove 化ゼラチンシート上において Plane よりも有意な接着細胞数の増加と配向性が認められた。これまで、報告されてきたチタンなどの金属材料表面と同様にソフトマテリアルであるゼラチンにおいてもマイクロ・ナノ Groove 構造が、細胞接着に有効であることが示された。

パターン化チタンシートに関しては、骨芽細胞では、Groove だけでなく Pillar 構造においても Plane よりも有意な接着細胞数及び

接着班の数の増加が認められ、Pillar 構造も Groove 同様に細胞接着に影響を与えることが示された。これは、マイクロ・ナノパターンにより細胞足場の表面積が増加したこと、また細胞の仮足がマイクロ・ナノパターンに伸び早期の接着の足がかりとなったことが影響したと考えられる。さらに、24 時間培養後では、接着細胞数と接着班 (ピンキュリン) の数に同様の傾向が認められたことから、細胞接着には接着班が影響していることが示された。一方、上皮細胞においては、マイクロ・ナノパターンを付与することにより付着細胞数は減少した。特に、Pillar 構造において細胞数は少なく、細胞増殖を抑制する可能性が示唆された。

以上から、マイクロ・ナノパターン構造は、骨芽細胞、線維芽細胞、上皮細胞の接着、配向に影響を与えることが示され、マイクロ・ナノパターン構造を持つインプラント体やアバットメントを開発することにより、早期のオッセオインテグレーションの獲得やインプラント周囲炎の予防の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. N Kaga, T Akasaka, A Yokoyama, Y Yoshida. Effect of micro/nano-patterned surfaces on cell adhesion of Ca9-22 cells. *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology* 15: 1-6; 2017. DOI:<http://doi.org/10.1380/ejsnt.2017.1>
2. N Kaga, T Akasaka, R Horiuchi, Y Yoshida, A Yokoyama. Adhesion of human osteoblast-like cells (Saos-2 cells) on micro/nanopatterned structures sputter-coated with titanium. *Nano biomedicine* 8 (2): 74-82; 2016. DOI:<http://doi.org/10.11344/nano.8.67>

〔学会発表〕(計 6 件)

1. N Kaga, T Akasaka, R Horiuchi, A Yokoyama, Y Yoshida. Cell adhesion behavior on micro/nano grooved structures coated with titanium. *Asia Conference on Nanoscience & Nanotechnology 2016*, p 17. Sapporo Japan. October 2016.
2. N Kaga, T Akasaka, A Yokoyama, Y Yoshida. Adhesion and 6 Alignment of Saos-2 Cells on Micro/nano Grooved Structures Coated with Titanium. *The 11th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration*, p 51. Bangkok Thailand. June 2016.
3. 加我公行, 堀内留美, 横山敦郎. マイクロ・ナノパターン化チタンシートにおける細胞付着挙動. 第 36 回日本口腔インプラント学会東北・北海道支部大会, p41. アイーナ (岩手県・盛岡市),

- 7月, 2016
4. 加我公行, 横山敦郎, 吉田靖弘. マイクロ・ナノパターン化ゼラチンシートへの細胞接着に対する影響. 日本補綴歯科学会第125回学術大会, 日本補綴歯科学会誌, 125回特別号, 8: 299, 石川県立音楽堂, ANAクラウンプラザホテル(石川県・金沢市), 7月, 2016.
 5. 加我公行, 横山敦郎, 吉田靖弘. 骨芽細胞のマイクロ・ナノパターン化ゼラチンシートへの細胞付着性及び配向性. 日本補綴歯科学会第124回学術大会, 日本補綴歯科学会誌, 124回特別号, 7: 62, 大宮ソニックシティ(埼玉県・さいたま市), 5月, 2015.
 6. 加我公行, 赤坂司, 横山敦郎, 吉田靖弘. ナノインプリント法を利用したマイクロ・ナノパターン化ゼラチンシートへの細胞付着性. 平成26年度秋季第64回日本歯科理工学会学術講演会, 日本歯科理工学会誌, 33(5): 464, テルサ広島(広島県・広島市), 10月, 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:
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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 敦郎 (YOKOYAMA, ATSURO)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 20210627

(2) 研究分担者

赤坂 司 (AKASAKA, TSUKASA)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号: 00360917

山本 悟 (YAMAMOTO, SATORU)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 10344524

宮治 裕史 (MIYAJI, HIROFUMI)
北海道大学・大学病院・講師
研究者番号: 50372256

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: