

平成30年6月25日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05027

研究課題名(和文)水素化テトラヘドラルアモルファスカーボンの骨芽細胞および破骨細胞分化に与える影響

研究課題名(英文) The effects of diamond like carbon coating containing different level of hydrogen (ta-C(H) DLC), on the differentiation of osteoblastic cells and osteoclastic cells in vitro.

研究代表者

二川 浩樹 (Hiroki, NIKAWA)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・教授

研究者番号：10228140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔インプラントにおいて、より早期に確実なオッセオインテグレーションを得るための表面改質に関してダイヤモンドライクカーボン(DLC)コーティングの条件を変化させた水素化テトラヘドラルアモルファスカーボン(ta-C(H))に着目し、ta-C(H)をコーティングしたチタンが骨芽細胞及び破骨細胞分化に与える影響について検討した。その結果、ta-C(H)コーティングチタンは、MC3T3-E1細胞における骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現を促進し、RAW264.7細胞における破骨細胞分化マーカーの遺伝子発現を抑制することが明らかとなり、インプラント治療において有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To examine the effects of diamond like carbon coating containing different level of hydrogen (ta-C(H) DLC), on the differentiation of osteoblastic cells and osteoclastic cells in vitro. In addition, antimicrobial activity of ta-C(H) DLC was also examined. Real-time quantitative reverse transcriptional polymerase chain reaction analysis revealed that ta-C(H) DLC promoted the expression of Runx 2, Osterix and ALP of MC3T3-E1 cells, as compared with those of untreated titanium. On the other hand, ta-C(H) DLC suppressed the expression of TRAP and cathepsin K mRNA in RAW264.7 cells, as compared with those of untreated titanium. Further, ta-C(H) DLC exhibited the inhibitory effect against *P. gingivalis* biofilm formation, as compared with that on untreated titanium. These results, taken together, suggested that ta-C(H) DLC is one of the most preferable avenue to obtain the acquisition of osseo-integration.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：口腔インプラント DLC 骨芽細胞 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

口腔インプラント(以下、インプラント)は、広く普及した歯科治療である。これまでの多くの研究で、オッセオインテグレーション(骨結合)の早期獲得を目指したインプラント体の表面改質が試みられている。インプラント治療の失敗は、オッセオインテグレーションを獲得できないことによる早期の予後不良と、獲得されたオッセオインテグレーションを維持できないことによる晩期の喪失に分類することができるかと報告されている(文献1,2)。したがって、インプラント治療において早期にオッセオインテグレーションを獲得し、その状態を保つことは、治療期間の短縮とよりよい予後を長期的に得る上で非常に重要となる。一度獲得されたオッセオインテグレーションは非常に強固で安定しており、インプラント周囲の骨は天然歯のそれと同様に破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨造成がバランスよく恒常的に行われている。しかしながら、過度の負荷や細菌感染などによってインプラント周囲の骨吸収が引き起こされることがある。このときインプラント周囲では、サイトカインネットワークの変化と破骨細胞の異常な活性化が起こり、骨吸収が促進されると考えられている。破骨細胞は、主に骨芽細胞やストローマ細胞が発現する receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) により活性化される。この RANKL 分子は前破骨細胞の細胞膜上の RANK 分子に結合し、破骨細胞の分化を促進する。RANKL により成熟した破骨細胞は、イオンポンプやイオンチャネルを介して H^+ や Cl^- を細胞外に放出することで細胞外環境を酸性化し、骨吸収を促進することが知られている。このため、インプラント治療の長期的な成功には骨芽細胞はもちろん、破骨細胞の制御という骨のリモデリングに配慮したインプラント体の開発が必要である。

2. 研究の目的

diamond-like carbon(DLC)は高硬度・低摩擦係数・耐摩耗性・高生体親和性といった物性を持っている。特に工業用途では、より安定化をはかった水素フリーDLCが脚光を浴びているが、バイオマテリアル領域では報告がなされていない。我々はこれまでに水素量低減DLCの生体適合性の評価を行い、水素量の変化により骨芽細胞と破骨細胞の分化を制御できる可能性を示唆している。本研究では、さらなる改良を目指し高硬度化、平滑性および摩擦摩耗特性向上を追求し開発した水素化テトラヘドラルアモルファスカーボン(ta-C(H))について、インプラント埋入初期の早期オッセオインテグレーションの獲得、骨リモデリングの安定化、および破骨細胞の異常な活性化を制御することを目的として、骨芽細胞および破骨細胞の分化に与える影響を検討し、またそのメカニズムについて分子生物学的に検討を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

これまでの研究で、水素量 13.5~17.8% の水素量低減DLCが骨適合性に最適であると考えられている。本研究では、DLCの中で水素化テトラヘドラルアモルファスカーボン(ta-C(H))の領域において、水素量低減DLCよりも骨芽細胞の分化あるいは破骨細胞の分化抑制について、より優れた領域の検討を行う。また、そのメカニズムが不明であるため、DLC表面での遺伝子発現動態および血清タンパクの吸着などに関して詳細な検討を行う。まず平成27年度についてはta-C(H)コーティングチタン上での破骨細胞および骨芽細胞の動態を検証する。さらに平成28年度以降に関しては破骨細胞および骨芽細胞における機能解析を行い、ta-C(H)コーティングチタン上の破骨細胞、骨芽細胞およびサイトカインネットワークに与える影響、またその詳細なメカニズムについて検討を行っていく予定である。

[平成27年度]

(実験1) 水素化テトラヒドロアルミニウムオキシド (ta-C(H)) コーティングチタンの作製

これまでに、DLC コーティングチタン(水素量約 20.9%)が骨芽細胞の分化を促進することを確認している(論文発表 29)。この知見を基にし、水素量 0.8-17.8% の水素量低減 DLC コーティングチタンを作製し評価を行った結果、水素量 13.5 または 17.8% が骨適合に優れていることを見出してきた(学会発表 1)。本申請課題では、より生体材料としての能力の高い基材の開発を目指して高硬度化、平滑性および摩擦摩耗特性向上を追求した水素化テトラヒドロアルミニウムオキシド (ta-C(H)) を作製する。すでに数種類のサンプルについては完成しており、予備実験を行っているところである。

(実験2) 水素化テトラヒドロアルミニウムオキシド (ta-C(H)) コーティングチタンの破骨細胞と骨芽細胞への影響

水素量低減 DLC コーティングチタン(水素量 13.5-17.8%)の骨芽細胞の分化促進、破骨細胞の分化抑制作用はすでに知見を得ている(学会発表 1)。しかしながら、水素化テトラヒドロアルミニウムオキシド (ta-C(H)) のバイオマテリアルへとしての応用は世界的にみても報告がなされていないため詳細は不明である。平成 27 年度は本研究の中心をなす ta-C(H) コーティングチタンのバイオマテリアルとしての有用性の評価を以下の通りに行う。

破骨細胞の分化マーカーである TRAP、CathepsinK および DC-STAMP の遺伝子またはタンパクレベルでの発現を real time RT-PCR または Western blotting 法を用いて

解析する。また、細胞形態などを走査型電子顕微鏡や細胞免疫染色(関連機器申請)によって観察し詳細な検討を行う。

骨芽細胞の分化マーカー (Type collagen, Runx2, Osterix, Osteopontin, ALP) および骨吸収関連分子 (RANKL, OPG) の発現を real time RT-PCR、ELISA、Western blotting、および ALP 染色によって解析し、アリザリンレッド染色によって石灰化の評価まで行う。また、細胞形態などを走査型電子顕微鏡や細胞免疫染色(関連機器申請)によって観察し詳細な検討を行う。

(実験3) メカニカルストレス存在下での水素化テトラヒドロアルミニウムオキシド (ta-C(H)) コーティングチタン上における破骨細胞および骨芽細胞の動態の検討

不適切な咬合による過重負荷は歯槽骨吸収を伴う歯周炎やインプラント周囲炎の原因のひとつとして知られている。そこで、本申請課題ではインプラント周囲炎を想定し、メカニカルストレス(圧縮刺激)存在下における骨芽細胞および破骨細胞の分化に ta-C(H) コーティングチタンが与える影響を分子レベルで詳細に検討する。

(実験4) LPS 存在下での水素化テトラヒドロアルミニウムオキシド (ta-C(H)) コーティングチタン上における破骨細胞および骨芽細胞の動態の検討

また、細菌感染も歯周炎やインプラント周囲炎の原因の重要なファクターとして知られており、歯周病患者の歯周ポケット内から検出された細菌叢はインプラント周囲炎患者のそれと類似しているという報告がある。そこで、歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* 由来の LPS 刺激下で、ta-C(H) コーティングチタンが破骨細胞および骨芽細胞に与える影響を分子レベルで検討する

4. 研究成果

(実験1および2) ta-C(H)コーティングチタンは、MC3T3-E1細胞における骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現を促進したが、表面粗さおよび水素量の違いによる遺伝子発現の傾向に統一性はみられなかった。一方で、ta-C(H)コーティングチタンは、RAW264.7細胞における破骨細胞分化マーカーの遺伝子発現を抑制することが明らかとなった。また、SEMによる形態観察を行ったところ、コントロールチタンと比較して ta-C(H)コーティングチタン上の MC3T3-E1細胞は扁平に伸展しており、チタン表面に強固に接着している像が見られた。

以上より、新規水素量低減 DLC である ta-C(H)のコーティングは、インプラント治療におけるオッセオインテグレーション獲得効率の向上およびインプラントの長期安定のための有効なチタン表面修飾方法となる可能性があることが示唆された。

(実験3および4)

ta-C:Hコーティングチタンが MC3T3-E1細胞における細胞接着関連遺伝子の発現に与える影響について検討した結果、細胞接着関連遺伝子である Integrin α 6, Integrin α 4 の mRNA の発現量は、ta-C:Hコーティングチタンで最も増加したが、純チタンや a-C:Hコーティングチタンとの間に有意差は認められなかった。また、各チタン上に MC3T3-E1細胞を播種して6時間後、蛍光免疫染色を行った細胞の形態を観察したところ、純チタンと比較して ta-C:Hコーティングチタン上の細胞がより扁平に伸展している像が認められ、細胞数が多い傾向にあった。さらに、初期接着細胞数に与える影響についても検討を行い、ta-C:Hコーティングチタン上における細胞数は、純チタンや a-C:Hと比較して有意に増加し、骨芽細胞の初期接着を促進することが示唆された。

次に、ta-C:Hコーティングチタンが P.g LPS 誘導性炎症性サイトカインおよびケモカインの発現に与える影響について検討を行うため、P.g LPS で刺激後の、IL-6, CCL2, RANKL, OPG の mRNA の発現を解析した。その結果、純チタン上での P.g LPS 添加時は、未添加と比較して、IL-6, CCL2 および RANKL の mRNA の発現が有意に増加した。ta-C:H や a-C:H上でも、P.g LPS 添加時にこれらの mRNA の発現がわずかに増加したが、P.g LPS 未添加と比べて有意差は認められなかった。また、OPG の mRNA 発現量は、すべてのチタンにおいて P.g LPS 未添加と添加の条件間で変化が認められなかった。

P.gLPSによって誘導される炎症性サイトカイン及びケモカインが ta-C:Hコーティングチタン上で抑制されるメカニズムについて検討するため、細胞内シグナル伝達経路の活性に与える影響についての解析を行った。その結果、純チタンでは、P.g LPS の添加により ERK1/2 タンパク質の発現が減少したのに対し、リン酸化 ERK タンパク質の発現は増加した。一方で、ta-C:Hおよび a-C:Hでは、P.g LPS の添加により ERK1/2 タンパク質の発現が減少したのに対し、リン酸化 ERK タンパク質の発現は変化しなかった。

JNK タンパク質の発現は、いずれのチタンにおいても、P.g LPS 添加、未添加の間で変化がない一方で、リン酸化 JNK タンパク質の発現は P.g LPS を添加することにより増加した。

NF- κ B タンパク質の発現は、ta-C:Hにおいて P.g LPS の添加により減少し、リン酸化 NF- κ B タンパク質の発現は、a-C:Hにおいて P.g LPS の添加により減少した。

p38 タンパク質の発現は、いずれのチタン上においても、P.g LPS 添加、未添加の間で変化がない一方で、リン酸化 p38 のタンパク質の発現は、純チタンにおいて P.g LPS の添加により減少した。

以上の結果より、ta-C(H) コーティングチタンは、骨芽細胞の初期接着及び骨分化の促進、破骨細胞の分化抑制、P.gLPS による炎症性サイトカインの抑制により、安定した初期固定だけでなく、インプラント周囲炎などの抑制作用も期待でき、埋入直後から長期予後安定性まで期待できる素材であると考えられた。

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 1件)

1. Differentiation of osteoblast and osteoclast cells on hydrogenated-tetrahedral amorphous carbon coated titanium: Shuto T, Nakatani T, Okamoto K, Saizaki N, Mimura S, Kunitsugu S, Nikawa H.: Journal of Photopolymer Science and Technology, 29(3), 413-418, 2016 (査読あり)

[学会発表](計 4件)

1. 才崎菜都美, 首藤崇裕, 三村純代, 岡本圭司, 田地豪, 中谷達行, 二川浩樹: 水素量低減 DLC コーティングチタン上における骨芽細胞および破骨細胞分化に関する研究 日本組織培養学会第 88 回大会 2015.5.26-27
2. 反応性 CVA 法で作製した ta-C:H 膜の骨適合性評価: 中谷達行, 首藤崇裕, 才崎菜都美, 三村純代, 國次真輔, 二川浩樹: 一般社団法人表面技術協会 第 134 回講演大会(仙台), 2016
3. 水素量低減 DLC コーティングチタンの骨関連細胞の分化に与える影響: 才崎菜都美, 首藤崇裕, 三村純代, 中谷達行, 岡本圭司, 國次真輔, 田地豪, 熊谷宏,

佐々木正和, 二川浩樹: 平成 28 年度公益社団法人日本補綴歯科学会九州支部, 中国・四国支部合同学術大会(熊本), 2016

4. 市川隼, 高木謙太郎, 首藤崇裕, 三村純代, 田地豪, 河原和子, 二川浩樹: チタンイオンおよび LPS による骨芽細胞の Wnt5a 発現の上昇と破骨細胞分化への関与: 日本組織培養学会第 89 回大会(大阪), 2016
5. 才崎菜都美, 三村純代, 中谷達行, 岡本圭司, 國次真輔, 熊谷宏, 田地豪, 二川浩樹: 水素量低減 DLC コーティングチタンの骨芽細胞および破骨細胞分化制御に関する研究 第 56 回広島県歯科医学会・第 101 回広島大学歯学会

[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 二川 浩樹 (Nikawa Hiroki)
広島大学・医歯薬保健学研究科・教授

研究者番号: 10228140

(2) 研究分担者 田地 豪 (Taji Tuyoshi)
広島大学・医歯薬保健学研究科・准教

授)

研究者番号： 8 0 2 8 4 2 1 4

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()