

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 4 日現在

機関番号：32404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06567

研究課題名(和文)酸化チタンナノ粒子の炎症増悪作用の検証

研究課題名(英文) Verifying the exacerbating effect of titanium oxide nanoparticles on inflammation

研究代表者

小林 真彦 (KOBAYASHI, Masahiko)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：20758271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ粒子(直径 100nm 未満であると定義)は、医薬品や歯科分野において有用性は認められている。一方、遺伝毒性や炎症誘発性も報告されているので、安全に使用するためには、適切なリスク評価の必要性が指摘されている。歯学においては、酸化チタンのナノ粒子をガラスイオノマーセメントに含有させることにより、機械的強さおよび抗菌性が向上することが知られている。今回の研究計画では、酸化チタンの炎症性反応と紫外線照射による細菌数にして解析した。その結果、酸化チタンは炎症反応性タンパク質のCOX-2の発現を増強し、細菌数も減少させる結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Titanium dioxide (TiO₂) nanotube is emerging as a provocative target for oral implant research. The aim of this study was to evaluate the effect of UV on the wettability behavior, bacterial colonization and fibroblast proliferation rate on TiO₂ nanotube surfaces prepared using different anodization voltages, aimed to be used as an implant abutment material. UV treatment enhances the wettability behavior of TiO₂ nanotube surfaces and could result in lower bacterial adhesion and biofilm formation. Moreover, TiO₂ induced inflammatory response in increasing Cyclooxygenase (COX-2) expression by western blotting methods.

研究分野：口腔外科学

キーワード：酸化チタン 炎症反応 ナノマテリアル

1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子(直径 100nm 未満であると定義)は、医薬品や歯科分野において有用性は認められている。一方、遺伝毒性や炎症誘発性も報告されているので、安全に使用するためには、適切なリスク評価の必要性が指摘されている。歯学においては、酸化チタンのナノ粒子をガラスイオノマーセメントに含有させることにより、機械的強さおよび抗菌性が向上することが知られている。また、チタンは、歯を欠損した部位に対し歯科用インプラント材料(人工歯根)として使用されている。チタンは、大気中において酸化膜を形成し、酸化チタンとして存在する。酸化チタンのナノ粒子は、歯科治療において、歯髄に接触すると、炎症を誘発・増悪させる。しかしながら、口腔環境への酸化チタンのナノ粒子の影響は十分に調べられておらず、臨床研究もしくは、ヒト培養細胞を用いた *in vitro* での研究は皆無であった。最近、明海大学歯学部共同研究チームは、酸化チタンのナノ粒子は、各種抗癌剤のヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する傷害性には影響を与えないが、炎症(IL-1 β で刺激したヒト歯肉線維芽細胞によるプロスタグランジンE₂(PGE₂)の産生およびCOX-2タンパク質の発現)を増悪することを明らかにし、更にメタボローム解析を駆使して、IL-1 β および酸化チタンのナノ粒子の両者を併用投与すると、オルニチン、S-adenosylmethionine(SAM、メチル基供与体)、還元型グルタチオンが相乗的に低下することを始めて明らかにした。著者らは、酸化チタンのナノ粒子は、先ず、エンドサイトーシスにより細胞の空胞に取り込まれ、1)オルニチンの低下→プロレシンの低下、2)SAMの低下→炎症性サイトカインの遺伝子発現の上昇、3)

還元型GSHの低下の、3つの経路が協調して、炎症を増悪するという作業仮説を立案した。本研究では、酸化チタンナノ粒子の炎症反応に焦点をあて、各種口腔細胞における酸化チタンナノ粒子の炎症反応について培養細胞レベルで実験を行った。

2. 研究の目的

明海大学歯学部で樹立されたヒト歯根膜線維芽細胞(human periodontal ligament fibroblast:HPLF)、ヒト歯髄細胞(human pulp cells:HPC)において、ヒト歯肉線維芽細胞と同様に、IL-1 β と酸化チタンのナノ粒子の同時投与が、炎症(PGE₂の産生およびCOX-2タンパク質の発現)を相乗的に促進するか否かを検討する。また、ナノマテリアルの標的となる遺伝子群の探索も視野に置いて実験を行う。遺伝子群の探索についてはsiRNAなどのノックダウンシステムを用いて行う。

3. 研究の方法

細胞の播種:明海大学歯学部で樹立された、ヒト歯根膜線維芽細胞(HPLF)、ヒト歯髄細胞(HPC)(歯科治療における歯髄および歯周組織細胞に対する細胞傷害性および炎症誘発性について倫理委員会承認番号A0808, A1310)を培養し実験に用いた。これらの細胞を37度5%CO₂の条件で培養し、実験に用いた。培養液は、Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serumで培養した。実験は、これらの細胞に酸化チタンを添加して細胞毒性濃度(MTT assay)を検討した後に炎症性シグナルのタンパク質発現の増減を検証した。MTT assayは96wellプレートに細胞を500個まき、その後MTT試薬にて発色させたのちに、プレートリ

オーダーにて562nmの吸光度を測定し定量評価を行った。

炎症の誘発:酸化チタンのナノ粒子 (Sigma-Aldrich) およびIL-1 β (R&D systems)を添加し、24 時間培養して炎症を惹起した。

COX-2 の発現:細胞を回収後、細胞をPBS-で2回洗浄し、タンパク質液抽出、western blot 法で解析した。タンパク質の抽出にはRIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholic acid, 1% NP-40) を用い、タンパク分解酵素阻害剤として、protease inhibitorsを用いた。実験操作は氷上で行った。RIPA bufferに溶解した細胞は超音波破碎装置 (コスモバイオ:UCD-250) にて、4 $^{\circ}$ C、250Wの力で破碎した(10 s on, 20 s off)、サイクル25回)。その後、遠心分離を10 min at 16,000 \times gの条件下で行い、その上清を細胞溶解液として用いた。その細胞溶解液をBCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Scientific)を用いてタンパク定量 (吸光度:562nm) を行った。タンパク定量したサンプルをSDS-PAGEでタンパク分離を行い、転写装置 (Bio-rad) にてメンブレンに転写した。5% スキムミルク in TBST (20mM Tris-HCL pH 7.6、150mM NaCl、0.1% Tween20) にてブロッキング後、一次抗体を5% スキムミルク in TBSTにて1000倍に希釈して4 $^{\circ}$ Cでオーバーナイト反応させた。使用した抗体は、COX-2 (炎症マーカー)、COX-1、GAPDH (ハウスキーピング遺伝子、コントロール) を用いた。翌日に、TBST にて3回30分間、振盪機にてメンブレンを洗浄後、5% スキムミルク in TBSTにて1000倍に希釈した二次抗体 (ペルオキシダーゼ標識した抗ウサギ抗体) を室温で2時間反応させた。反応後、TBSTにて3回30分間、振盪機にて

メンブレンを洗浄後、Pierce Western Blotting Substrate Plus (Thermo Scientific)にて発色させ、ImageQuant LAS500 (GE healthcare) にてタンパク質を検出した。

4. 研究成果

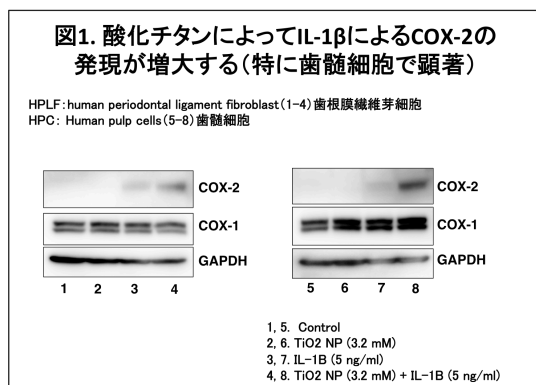
細胞毒性を評価するために酸化チタンを用いて、培養細胞に対するMTT assayを行った。酸化チタンの濃度系列を作成し、評価した結果、数mMで80%以上の細胞生存率を得られた。そこで、炎症反応の実験には3.2mMで酸化チタンを添加することにした。この実験は、3回行い評価した。

次に、HPLF およびHPCについての培養条件から検討し、適切な培養条件のもとで酸化チタンを3.2mM反応させた。実験の結果、酸化チタンおよびIL-1 β 単独ではCOX-2の発現は強く誘導されないが(図1 lane2, 3, 6, 7)酸化チタンとIL-1 β を両方作用させるとCox-2の発現が増大した(図1 lane4, 8)。特に歯髄細胞では、増大が顕著である結果が得られた。以上の結果から、酸化チタンは、歯根膜や歯髄において炎症反応を惹起させることが示唆された。歯科治療において、酸化チタンを用いる場合は、このような炎症反応の増大に気をつける必要性が改めて示唆された。特に、歯髄細胞では炎症反応が顕著なことから、歯髄に対するナノ粒子の使用は今後も検討していくべき事案であることが推測される。今後は、他の口腔関連培養細胞株(HSC-2など)を用

いて同様の結果が得られるのか評価したい。今回は、培養細胞レベルでの実験であったが、ラットを用いた実験での酸化チタン炎症反応評価も研究計画中に準備を整えてきた。今後は、In vivo での実験を中心に酸化チタンの評価を行いたいと考えている。

ナノ材料は、生命科学の分野で近年注目の研究分野である。炎症反応の惹起ばかりでなく、ゲノムへの応答や発がん関連の報告も相次いでいる。特に、ゲノム不安定性は、遺伝子変異の誘発にもつながることが危惧されており、今後の研究発展が望まれる。このように、多くの研究者が疾患発症に起因している可能性を指摘し、ナノ材料を用いた医療分野や生命工学分野はナノ素材の使用の検討を再度見直す必要があるのかもしれない。歯科医療分野においても、様々な歯科材料を使用するためこのような材料による口腔への二次被害を防ぐためにも、さらなるナノ材料の研究分野の発展が望まれる。筆者の研究グループも今後は、In vivo の実験を行うと同時に、ゲノム不安定性に関連する研究を立案中である。今回の研究を足がかりとして、酸化チタンのナノ粒子が与えるゲノムへの影響についても今後実験を行う予定である。また、今回の実験では、酸化チタンナノ粒子の炎症反応は、歯髄で顕著に見られた。この結果は、神経細胞関連で酸化チタンは炎症反応をさらに強力に誘導する可能性を秘めている。ヒトのニューロン細胞株等で酸化チタンナノ粒子の実験を行うことで脳神経細胞での酸化チ

タンの影響もみることも今後の展開としたい。



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)

[学会発表] (計2件)

1. Masahiko Kobayashi, Lippo lassila, Pekka Vallittu, Timo Narhi. 94th General session & exhibition of the IADR, 0466-Fiber-reinforced composite as an oral implant abutment material, 2016 6月22日-25日、韓国 (筆頭発表者)
2. Masahiko Kobayashi, Aous Abdulmajeed, Jongyun Moon, Risto Punkkinen Jun Shimada. 2016 AADR/CADR Annual Meeting, 1679-The effect of ultraviolet treatment on surface characteristics, bacterial adhesion, and cellular response of TiO₂ nanotubes, 2016 3月16日-19日米国 (筆頭発表者)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林真彦 (KOBAYASHI, Masahiko)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：20758271

(2) 研究協力者

・坂上宏 (SAKAGAMI, Hiroshi)

明海大学・歯学部・教授

担当：研究計画立案補助

・奥平准之 (OKUDAIRA, Noriyuki)

明海大学・歯学部・助教

担当：実験指導