

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04387

研究課題名（和文）セメント質のナノ表面形態を模倣したチタンインプラントによる歯根膜誘導

研究課題名（英文）Induction of periodontal ligaments on titanium implants mimicking nanotopography of cementum

研究代表者

山田 将博（Masahiro, Yamada）

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：90549982

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、歯根膜細胞がセメント質表面として認識するチタン表面をナノ技術により確立し、チタン表面にセメント質産生を介したシャープピー線維構造の形成を誘導することで、歯根膜結合をもつ新たなインプラント技術の基盤を構築することである。本研究結果により、セメント質模倣ナノ表面改質処理を施すことにより、間葉系幹細胞と歯根膜マトリックスの存在下で、チタンインプラント上にセメント質形成を伴う歯周組織を再構築することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、インプラント周囲組織の歯周組織化という困難な生体医工学的課題に対して、生体模倣概念を導入したインプラント表面改質による組織誘導というアプローチで解決を試みている点が斬新で独創性に富んでいる。本ナノ表面は簡便な方法で作製可能であること、また、歯根膜細胞は比較的採取しやすい細胞であることから、本研究が達成されれば、歯根膜を獲得したインプラント実現のための組織工学技術および法規制的課題の多くを解決し、歯科補綴治療を革命的に進化させる可能性がある。さらに、歯科補綴学やインプラント学のみならず再生歯学や生体材料学、細胞生物学の学問的発展にも貢献し得る意義深い研究課題である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to create the titanium nano-surface mimicking a cementitious surface and to induce cementum on the titanium implant through regulation of periodontal ligament cells. Cementum mimetic titanium nano-surface might reconstruct the periodontal tissue with cementum formation on the titanium implant in the presence of mesenchymal stem cells and periodontal ligament matrix.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯科補綴学 細胞・組織 再生医学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨結合型インプラントは有用な欠損補綴治療法の一つとして認知されているが、力学的トラブル発生率の高さ<sup>1</sup>や顎骨形態変化への不適応による若年者への応用制限<sup>2</sup>など、歯根膜の欠如に起因する問題点が指摘されている。それゆえ、インプラントが歯根膜を獲得すれば、次世代インプラントと呼ぶべき革新的技術となる。歯根膜の獲得には、セメント質およびシャーピー線維構造が必要となるため、セメント質形成を誘導するインプラント表面改質法が求められている。一方で、セメント質は生理的リモデリングを受けないとされ<sup>3</sup>、人工材料による代替セメント質の可能性も考えられる。

周囲環境の特性を感知し、環境に対応した機能を発揮する細胞機能<sup>4</sup>を利用し、生体環境の特性(表面形態や機械的特性)を模倣することにより、幹細胞の運命決定や体細胞の増殖分化を制御する多くの試みがなされている<sup>5</sup>。この生体模倣の機序は、接着斑より始まるメカノトランスダクション機構の活性化と考えられている<sup>6</sup>。今回、セメント質ナノ表面形態を模倣したチタン表面を作製し、セメント質表面を模倣した環境を歯根膜細胞に与えることで、歯根膜細胞によるセメント質産生を誘導するという着想に至った。

近年、特定条件のアルカリ熱処理により、約1 $\mu$ m厚みの酸化チタン多結晶が、異方性配列した無数のナノ突起や孔を伴い、チタン表面上に形成することが示された。この異方性ナノ表面は線維芽細胞の細胞外基質産生能を向上させるとともに、細胞外基質を表面内部の間隙中に封入することで歯肉結合組織性付着を獲得することが示めされた<sup>7,8</sup>。これら研究成果から、異方性ナノチタン表面は歯根膜線維をも封入する可能性が推測される。さらに、走査型電子顕微鏡(SEM)観察下で、異方性ナノ表面は、損傷ヒトセメント質表面と形態的に類似するとともに、表面の微小硬度と弾性係数は、ヒトセメント質表面の数値と近似していた<sup>9</sup>。

予備的細胞培養実験を行ったところ、機械研磨面や酸処理面上ではヒト歯根膜細胞は大きく伸展した紡錘形を示すのに対し、異方性ナノ表面上では特徴的な小さな円形を示した。また、遺伝子発現解析では、骨基質関連マーカーであるOsteocalcin(OCN)やCollagen type 1 alpha 2(COL1a2)の発現に違いはなかったのに対し、セメント芽細胞関連マーカーであるCementum protein 1(CEMP1)が、機械研磨面と比べてナノ表面上でより早期から発現した。さらに、培養10および30日後の細胞外基質中のカルシウム密度はナノ表面上で著しく増加していた。

これら予備実験結果から、「異方性チタンナノ表面はヒト歯根膜細胞に損傷セメント質表面として認識させ、セメント質産生を介したシャーピー線維構造の形成を誘導するとともに歯根膜線維を直接的に封入して歯根膜結合をもたらずセメント質模倣表面として機能する」という仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

異方性ナノチタン表面がヒト歯根膜細胞によるセメント質産生を介したシャーピー線維構造の形成誘導と直接的歯根膜結合をもたらずセメント質模倣表面として機能するかどうかを検証することにある。

### 3. 研究の方法

#### (1) <チタンナノ表面の表面特性の解析>

グレードII純チタンディスク(機械研磨加工)に、申請者が確立している表面処理方法を用いて、ナノ表面の試料を作製し、表面特性の評価を行った。ヒト抜去歯のセメント質表面を対照試料として用いた。各種チタン表面とセメント質表面に関して、走査型電子顕微鏡の画像解析により表面形態を、超微小押し込み硬さ試験機により表面の微小弾性率を評価した。

#### (2) <細胞培養試験>

ヒト歯根膜細胞を4種のチタンディスクおよびポリスチレン培養皿上で培養し、以下の評価を行った。

- ・セメント芽細胞関連マーカーの発現: Real-time RT PCRでCEMP1の発現を評価した。
- ・細胞外基質石灰化の評価: SEMによる表面形態観察および電子線マイクロアナライザ(EPMA)による元素解析を行った。

#### (3) <ラット脱細胞化歯周組織 チタン歯ユニットのラット腎皮膜埋植モデル>

5週齢Wisterラットの下顎骨脱細胞化処理し、大白歯と同じ形状をした純チタンインプラントを挿入した脱細胞化歯槽骨-チタンインプラント複合体を、8週齢Wisterラットの腎被膜下に移植した。4および8週間の治療後、チタンインプラント表面上のセメント質形成を、カルセイン生体染色した非脱灰切片における組織学的および組織形態計測的分析によって評価した。

#### (4) <間葉系幹細胞制御法の検討>

ヘテロ細胞集団である歯根膜細胞中に歯根膜幹細胞が含まれる。この歯根膜幹細胞は未分化間葉系幹細胞の特徴を示すと考えられている<sup>10</sup>。歯根膜幹細胞を局所移植することにより、インプラント周囲に歯周組織を誘導する手法を確立するために、移植後の細胞死を回避する細胞前処理法の検討を行った。細胞移植時に生じる酸化ストレスを回避するため、細胞内に取り込まれる抗酸化分子であるN-acetyl-L-cysteine(NAC)を用いた。NACを間葉系幹細胞増殖培地中に添

加し、ラット大腿骨由来骨髄間質細胞を6時間前培養した後に、コラーゲンスキャットホルド中に細胞を播種した。コラーゲンスキャットホルドを単体とした骨髄間質細胞を大腿骨臨界サイズ骨欠損中に自家移植した。NAC前処理が、骨髄間質細胞局所移植後のアポトーシス発生と骨再生に与える影響を組織学的に検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) <チタンナノ表面の表面特性>

表面形態および機械的特性の解析により、機械研磨面と大きく異なり、チタンナノ表面は頂点分布の異方性や表面の微小弾性率で、セメント質表面と類似することが示された(図1)。

##### (2) <チタンナノ表面上でのヒト歯根膜細胞の石灰化>

細胞培養試験により、チタンの表面性状が歯根膜細胞の分化に与える影響を評価した。培養1および5日目に遺伝子発現解析を行った結果、ヒト歯根膜細胞のセメント質関連マーカーCEMP1はチタンナノ表面上でより早く発現し、かつ、培養期間を通じて、それらの発現水準は高かった。培養30日後の走査型電子顕微鏡観察やエネルギー分散型X線元素分析により、チタンナノ表面上ではカルシウムが検出された球状構造物を含む細胞外基質の形成を認めたとに対し、機械研磨面では、カルシウム原子が検出されない滑沢な細胞外基質の形成を認めた(図2)。

##### (3) <チタンナノ表面上でのヒト歯根膜細胞の石灰化>

移植後4週間で、機械研磨面チタンインプラントと抜歯窩骨壁との間の空間である歯根膜腔に多数の細胞成分を有する線維性組織が形成された。しかし、線維はまばらであり、インプラント表面に対して垂直ではなく平行に配向していた。線維性組織の密度は移植8週後でより大きくなった。しかし、機械研磨面チタンインプラント表面上ではカルセイン陽性の石灰化基質を認めなかった。一方、ナノ表面インプラントでは、移植4週後に多くの細胞成分を有する線維組織の付着とインプラント表面に垂直な線維の配向が観察された。さらに移植8週後では、形成された線維構造は歯根膜腔のほぼ全てを満たすとともに、ナノ表面インプラント上にカルセイン陽性の石灰化基質の形成を認めた(図3)。

以上の結果により、セメント質模倣ナノ表面改質処理を施すことにより、間葉系幹細胞と歯根膜マトリックスの存在下で、チタンインプラント上にセメント質形成を伴う歯周組織を再構築できる可能性が示唆された。

##### (4) 抗酸化分子による細胞前処理が移植後の細胞死におよぼす効果

移植3日後にTUNEL染色によりアポトーシスの発生状況を解析した結果、NAC前処理しなかった骨髄間質細胞を移植した骨欠損中には、移植部位に広範なTUNEL陽性領域を認めた(図4)。一方、NACで前処理した骨髄間質細胞を移植した群では、TUNEL陽性領域が著しく減少した。NAC前処理した群では、前処理しなかった群に比べて、移植3週後の新生骨量が著しく増加した。骨髄間質細胞を骨分化誘導した骨芽細胞様細胞でも同様の結果がえられた。

以上の結果により、インプラント周囲に歯周組織を誘導するために歯根膜幹細胞を移植する

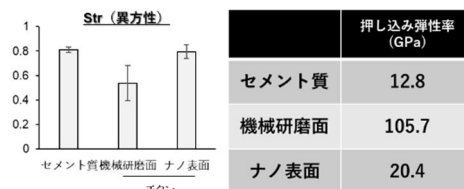


図1 セメント質およびチタン機械研磨面、ナノ表面のStr(異方性)(左)および微小弾性率

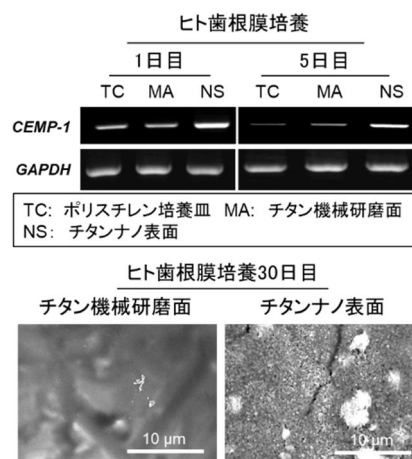


図2 ヒト歯根膜細胞をチタン機械研磨面およびナノ表面上で培養後のセメント質細胞関連マーカーの遺伝子発現状態(上)と形成された細胞外基質の走査型電子顕微鏡像(下)

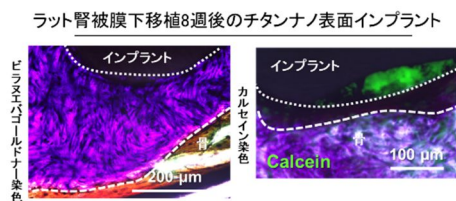


図3 脱細胞化歯周組織に挿入したチタンインプラントをラット腎被膜下に移植8週後の組織像

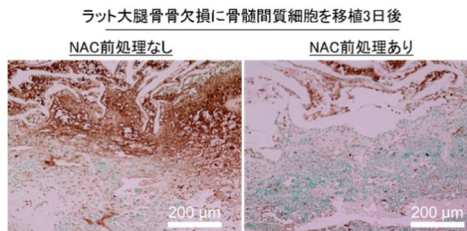


図4 NAC前処理した(右)または前処理をしなかったラット骨髄間質細胞を大腿骨骨欠損に自家移植3日後のTUNEL染色組織像

骨芽細胞様細胞でも同様の結果がえられた。

際に、NAC 前処理を施すことにより、局所移植後の細胞死を防止し、細胞移植による誘導効率を向上させる可能性が示唆された。

<引用文献>

1. Greenstein G, Carpentieri J, Cavallaro J., *J Am Dent Assoc.* 147(1), 2016, 28-34.
2. Oesterle LJ, Cronin RJ Jr. Adult growth, aging, and the single-tooth implant. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 15(2):252-60, 2000.
3. Zhao N, Foster BL, Bonewald LF. The cementocyte—an osteocyte relative ? *J Dent Res.* 95(7): 734–741, 2016.
4. Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(1): 21-33, 2009.
5. Lv H, Li L, Sun M, Zhang Y, Chen L, Rong Y, Li Y. Mechanism of regulation of stem cell differentiation by matrix stiffness. *Stem Cell Res Ther.* 27;6(1):103, 2015.
6. Teo BK, Wong ST, Lim CK, Kung TY, Yap CH, Ramagopal Y, Romer LH, Yim EK. Nanotopography modulates mechanotransduction of stem cells and induces differentiation through focal adhesion kinase. *ACS Nano.* 25;7(6): 4785-98, 2013.
7. Kato E, Sakurai K, Yamada M. Periodontal-like gingival connective tissue attachment on titanium surface with nano-ordered spikes and pores created by alkali-heat treatment. *Dent Mater.* 31(5): e116-30, 2015.
8. Yamada M, Kato E, Yamamoto A, Sakurai K. A titanium surface with nano-ordered spikes and pores enhances human dermal fibroblastic extracellular matrix production and integration of collagen fibers. *Biomed Mater.* 2;11(1):015010, 2016.
9. Ho SP, Yu BO, Yun W, Marshall GW, Ryder MI, Marshall SJ. Structure, chemical composition and mechanical properties of human and rat cementum and its interface with root dentin. *Acta Biomater.* 5(2):707-18, 2009.
10. Zhu W, Liang M. Periodontal ligament stem cells: current status, concerns, and future prospects. *Stem Cells Int.* 2015:972313, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamada M, Watanabe J, Ueno T, Ogawa T, Egusa H.	4. 巻 20
2. 論文標題 Cytoprotective Preconditioning of Osteoblast-Like Cells with N-Acetyl-L-Cysteine for Bone Regeneration in Cell Therapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 pii: E5199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20205199.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe J, Yamada M, Niibe K, Zhang M, Kondo T, Ishibashi M, Egusa H.	4. 巻 185
2. 論文標題 Preconditioning of bone marrow-derived mesenchymal stem cells with N-acetyl-L-cysteine enhances bone regeneration via reinforced resistance to oxidative stress.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomaterials.	6. 最初と最後の頁 25-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.08.055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada M, Egusa H	4. 巻 62
2. 論文標題 Current bone substitutes for implant dentistry.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Prosthodont Res.	6. 最初と最後の頁 152-161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpor.2017.08.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Watanabe J, Yamada M, Niibe K, Maolin T, Kondo H, Egusa H.
2. 発表標題 Redox biology-based preconditioning of MSCs to assist bone regeneration.
3. 学会等名 96th general session and exhibition of the IADR IADR Pan European regional congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田将博
2. 発表標題 バイオメテックインプラントによる軟組織付着獲得への挑戦
3. 学会等名 第48回日本口腔インプラント学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada M, Kimura T, Nakamura N, Egusa H.
2. 発表標題 Induction of periodontal ligaments around titanium dental implants in transplanted decellularized alveolar bone.
3. 学会等名 The 3rd International Symposium on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田将博, 吉岡勇人, 新野秀憲, 木村 剛, 中村奈緒子, 江草 宏
2. 発表標題 歯周組織を誘導する生体模倣チタンナノ表面インプラントの開発
3. 学会等名 平成30年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watanabe J, Yamada M, Egusa H.
2. 発表標題 Redox biology-based strategy in bone regeneration for efficient transplantation of osteoblastic cells.
3. 学会等名 International meeting the 7th Temu Ilmiah Nasional and 4th Scientific Meeting in Dentistry
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田将博
2. 発表標題 インプラント表面性状の解釈とその骨結合能を推測する方法
3. 学会等名 平成29年度（公社）日本補綴歯科学会 東北・北海道支部学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Watanabe J, Yamada M, Egusa H.
2. 発表標題 N-acetyl-L-cysteine Reinforces Apoptosis Resistance of MSCs to Promote Bone Regeneration.
3. 学会等名 Hatton competition in Japanese Association for Dental Research 65th Annual Meeting
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田将博, 吉岡勇人, 新野秀憲, 江草 宏
2. 発表標題 歯根セメント質表面の微小硬度と表面形態の評価
3. 学会等名 平成29年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 船登彰芳, 山田将博, 吉松繁人	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 240
3. 書名 The Fabric of the Modern Implantology 近代インプラント治療のテクニックとサイエンス	

〔産業財産権〕

〔その他〕

&#8203;東北大学 大学院歯学研究科 分子・再生歯科補綴学分野ホームページ  
<http://crbr.dent.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	江草 宏  (Egusa Hiroshi)  (30379078)	東北大学・歯学研究科・教授    (11301)	
研究 協力者	新野 秀憲  (Shinno Hidenori)	東京工業大学・未来産業技術研究所・教授    (12608)	
研究 協力者	木村 剛  (Kimura Tsuyoshi)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授    (12602)	
研究 協力者	吉岡 勇人  (Yoshioka Hayato)	東京工業大学・未来産業技術研究所・准教授    (12608)	
研究 協力者	中村 奈緒子  (Nakamura Naoko)	芝浦工業大学・システム理工学部・助教    (32619)	