

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11733

研究課題名(和文)カーボンナノ物質修飾による革新的表面構造を有するインプラントの開発

研究課題名(英文)Development of Dental Implants with Innovative Surface Structures by Carbon Nanomaterial Modification

研究代表者

平田 恵理(Hirata, Eri)

北海道大学・歯学研究院・助教

研究者番号：10722019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CNHsを表面修飾したTi(CNH/Ti)を泳動電着によって作製することが可能となった。CNH/Tiは骨の形成を阻害することなく、初期の骨新生を促進した。また、CNH/Ti上のマクロファージはTi上のもものと比較してDNAの転写、修復ならびに複製が下方制御されるとともに、炎症性サイトカインの発現が低下していた。Ti表面のCNHsは、マクロファージのDNAの転写、修復ならびに複製を制御し、炎症反応に影響を与えることが示唆された。また、局所埋入したSWNTの体内動態を観察したところ、他の臓器にほとんど移行せず、埋入部位に留ま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

CNHsを表面修飾したTi(CNH/Ti)は、泳動電着によって簡便に作製することが可能となった。CNH/Tiは骨の形成を阻害することなく、初期の骨新生を促進した。CNHsをTiにコートしたCNH/Tiはマクロファージの炎症反応を制御することが明らかになった。また、CNTsの局所埋入から体内への分布はほとんど見られなかった。この特徴を用いて、安全で効果的なインプラントの新たな表面修飾法への応用が期待された。

研究成果の概要(英文)：Surface-modified Ti (CNH/Ti) with CNHs could be prepared by electrophoretic deposition; CNH/Ti promoted early osteogenesis without inhibiting bone formation. These results suggest that CNHs on Ti surface regulate macrophage DNA transcription, repair, and replication, and that the expression of proinflammatory cytokines is down-regulated. In addition, we observed the dynamics of locally implanted SWNTs in the body, suggesting that they did not migrate to other organs and remained at the site of implantation.

研究分野：補綴歯科学

キーワード：インプラント カーボンナノ物質 チタン マクロファージ 骨再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カーボンナノチューブ(CNTs)、カーボンナノホーン(CNHs)、グラフェン(GI)等のカーボンナノ物質(CNMs)は炭素のみからなる新素材であり、物理的特性および化学的安定性から医学歯学領域を含むバイオ領域において基礎研究が開始されている。申請者はこれまでに、CNTsを用いて3次元細胞培養担体の表面をコーティングすることにより担体深部にまで早期に細胞を付着させ骨芽細胞の分化を促進することや、骨との良好な適合性を示すこと、ポリ乳酸にCNTsをコートすることにより骨芽細胞の接着が促進されることを報告した。また、FGFを化学的に修飾したCNTsをコートしたコラーゲンスポンジが新生骨の形成を促進することを報告した。以上により、CNMsの骨再生医療用生体材料への応用の可能性が示された。

さらにCNMsによる骨再生メカニズムについて解明するために、マクロファージと骨髄間質細胞を共培養しCNHsを添加したところ、CNHsを貪食したマクロファージが骨芽細胞の分化を促進することを報告した。

一方、デンタルインプラントの早期喪失はオッセオインテグレーション(骨結合)の獲得不全が主な原因とされている。生体材料を生体内に埋入した際、最初に起こるのは免疫反応であり、骨再生に深く関与していることはすでに報告されている。また、CNMsに対するマクロファージの挙動は、長さや形態といった物理的特性の違いや化学修飾による官能基の付与によって変化することが知られている。そこで、図に示すように、最適な化学的処理を施したCNMsをインプラント表面に担持させておくことにより、埋入後に周囲のマクロファージがCNMsを貪食し、骨芽細胞の分化と骨形成を促進し早期にオッセオインテグレーションを獲得することができると考えた。

2. 研究の目的

(1) CNMs担持インプラントの創製

CNMsを表面に担持したチタンインプラントを創製する。マクロファージが骨芽細胞に効果的に作用するため、チタン表面に担持するCNMsの量や方法について検討し、その効果を*in vivo*において検証する。

(2) CNMsに対するマクロファージの挙動と骨芽細胞の分化への影響評価

Ti表面のCNMsによるマクロファージの挙動について検索し、骨芽細胞や骨形成への影響について検討する。

(3) CNMsの体内動態の検索および長期的な安全性の評価

CNMsを臨床応用するにあたり、局所埋入した後の体内動態を検索することは必須である。CNTsは近赤外蛍光によるイメージングが可能である。この特性を用いて、局所に埋入したCNTsの体内動態と集積性、排出を評価する。また、CNMsの安全性を評価するために、3年間の長期にわたり経時的な生体反応を観察することにより安全性を評価する。また、CNMsの構造の変化を観察し、生体反応との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CNMs担持インプラントの創製

チタン表面へのCNMsの修飾

右図のように泳動電着法により、CNMsをチタン表面に担持させる。電着条件を検討することにより、CNMsの量や厚さ、付着状態を制御した。

*in vitro*での検証

CNMsを担持させたチタン板上でマクロファージと骨芽細胞を共培養し、骨芽細胞の増殖と分化について評価した。

*in vivo*での検証

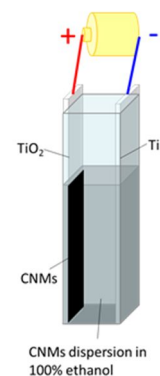
CNMsを担持させたチタンワイヤーをラット骨内に埋入し、マクロファージの動態と新生骨量について組織学的定量を行った。

(2) マクロファージの挙動および機能への影響評価

マクロファージをCNMs存在下で培養し、ELISAを用いてサイトカインを定量的に測定する。またDNAマイクロアレイを用いて発現する遺伝子を網羅的に解析し、遺伝子的な差異をリアルタイムPCRにて比較検討した。

(3) CNMsの体内動態の検索および長期的な安全性の評価

CNTsをラットの皮下、粘膜下、顎骨内に埋入し、経時的に体内のCNTsの発光(1000-1300nm)を撮影することにより、体内動態を検索する。組織学的、超微細構造学的観察を行い、生体反応とともに材料の変化についても検討した。



4. 研究成果

(1) CNH 担持チタン(CNH/Ti)の創製と *in vitro*, *in vivo* での評価

骨芽細胞様細胞 Saos2 培養後の SEM 観察像 (図 1) では CNH/Ti 上で良好に細胞が付着しており, 細胞の仮足は CNHs に直接伸張して伸展していた. Ti 上と比較して, CNH/AnTi に付着した細胞の DNA 量は有意に高く ($p < 0.01$), ALP 活性は有意差が認められなかった ($p > 0.1$). これにより, CNH/Ti 上では細胞の増殖が促進され, 分化には影響を与えないことが示された.

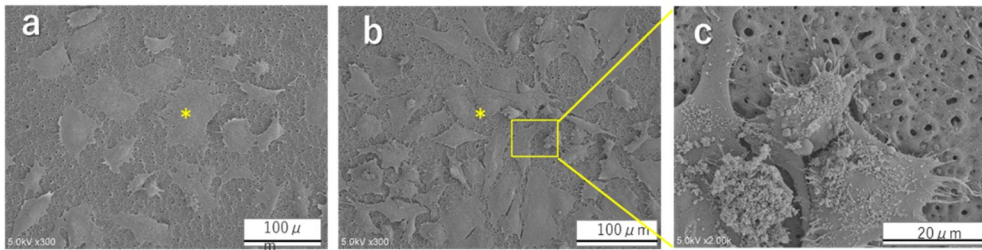


図 1. Saos2 培養 24 時間後の SEM 像 (a. Ti 上, b. CNH/Ti 上)

AnTi および CNH/AnTi ワイヤを大腿骨に埋入した 7 日後の光学顕微鏡観察では, Ti 周囲に骨芽細胞が整列し幼若な新生骨組織が観察された (図 2a). また, 新生骨の一部は直接 Ti に付着しており, CNH/AnTi の BCR は, AnTi と比較して有意に高かった ($p < 0.05$) (図 2b). 埋入 28 日後では, 7 日後と比較して, 両サンプルとも Ti 周囲に形成された骨量は増加していた. また, 新生骨上に観察された CNHs を TEM により観察したところ, 一部が骨基質と接して存在していることが確認された (図 2c,d) これらの結果から, CNHs が骨組織との適合性を有することが明らかになった.

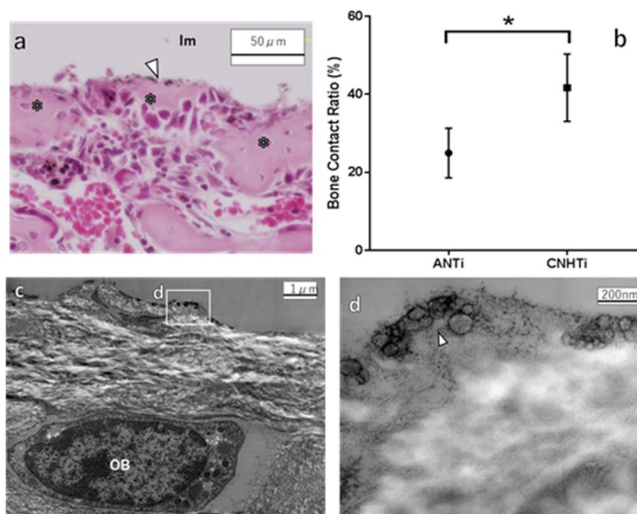


図 2. CNH/ANTI ワイヤ埋入 7 日後

a. 光学顕微鏡像 (*: 新生骨, 白矢頭: CNH)

b. チタン表面との骨接触率

c. 新生骨周囲組織の TEM 像

d. c の拡大像 (白矢頭: CNH)

(2) マクロファージの挙動および機能への影響評価

マウス由来単球マクロファージ様細胞 (J774A-1) を CNH/Ti および Ti 上に 4.0×10^4 cell/disc となるように播種し, 培養 24, 72 時間後に SEM および TEM による観察を行った. SEM 観察では, 細胞の形態は Ti 上では扁平であったが, CNH/Ti 上では球体のものが多く観察され, CNHs に伸展した仮足が認められた. CNHs/Ti の TEM 観察では, 細胞内に少量の CNHs が観察された. また, 培養 24, 72 時間後の培養上清中のサイトカイン (TNF α , IL-6, IL-10) を ELISA によって測定した. CNH/Ti の TNF α と IL-6 は, Ti と比較して有意に低く, IL-10 は, 両者の間に有意差を認めなかった. TNF α と IL-6 は, M1 型マクロファージが分泌する炎症性サイトカインであり, 骨形成の障害因子であることが報告されている. 一方, IL-10 は M2 マクロファージによる抗炎症性サイトカインとして知られている. さらに, 培養 24 時間後の J774A-1 から抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った. 転写産物単位の発現比で average が 1 以上の 424 個または -1 以下の 989 個について Gene Ontology 解析を行ったところ, CNH によって発現が増加した転写産物については有意の結果は得られなかったが, DNA の転写, 修復ならびに複製に関する遺伝子が down regulate されていた. 以上のことから, Ti 表面の CNHs は, DNA の転写, 修復ならびに複製を制御し, 炎症反応に影響を与えることが示唆された.

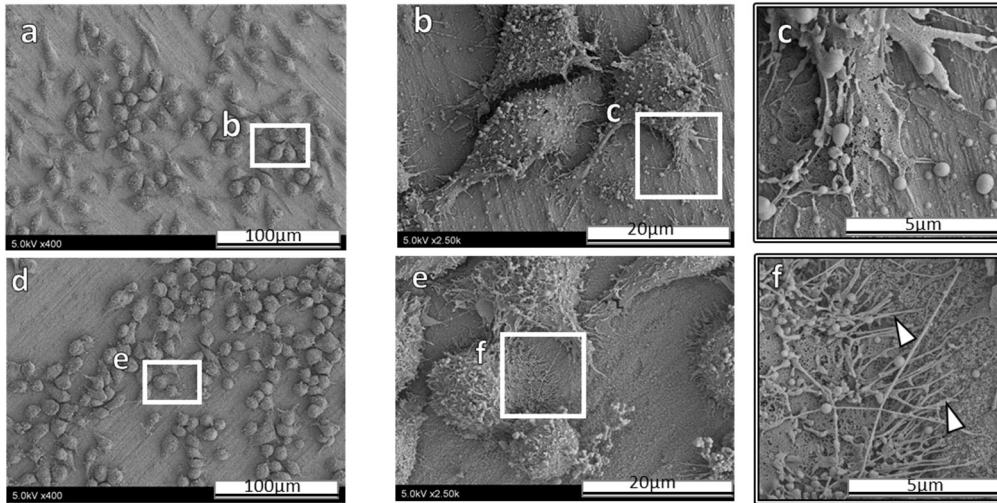


図 3 . J774A-1 培養 24 時間後の SEM 像 (a.b.c. Ti 上 , d.e.f. CNH/Ti 上;白矢頭: 細胞仮足)

(3) SWNT の体内動態の観察

頭蓋部皮下に埋入した SWNT は埋入部で蛍光が観察された。肝臓をはじめとする他の臓器では蛍光が観察されず、組織切片においても蛍光はみられなかった。埋入部の蛍光強度は経時で減少が見られたが、56 日後においても鮮明に観察された。また、埋入部位の組織を TEM 観察したところ、細胞内に CNTs が取り込まれている状態が観察された。以上より、図 7 に示すように、局所埋入した SWNT は、他の臓器にほとんど移行せず、埋入部位に留まることが示唆された。

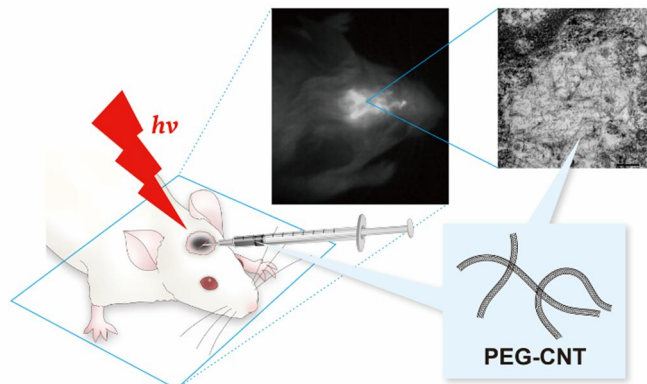


図 4 .SWNT を頭蓋部に埋入した模式図

Hirata E et al. Fate of Carbon Nanotubes Locally Implanted in Mice Evaluated by Near-Infrared Fluorescence Imaging: Implications for Tissue Regeneration, ACS Applied Nano Materials, 2019, 2, 1382-1390

研究成果の総括

CNHs を表面修飾した Ti(CNH/Ti) を泳動電着によって作製することが可能となった。CNH/Ti は骨の形成を阻害することなく、初期の骨新生を促進した。また、CNH/Ti 上のマクロファージは Ti 上のもものと比較して DNA の転写、修復ならびに複製が下方制御されるとともに、炎症性サイトカインの発現が低下していた。Ti 表面の CNHs は、マクロファージの DNA の転写、修復ならびに複製を制御し、炎症反応に影響を与えることが示唆された。

また、局所埋入した SWNT の体内動態を観察したところ、他の臓器にほとんど移行せず、埋入部位に留まることが示唆された。

以上より、CNHs を Ti にコートした CNH/Ti はマクロファージの炎症反応を制御し、局所埋入から体内への分布はほとんど見られなかったことから、安全で効果的なインプラントへの応用が期待された。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirata Eri, Yudasaka Masako, Ushijima Natsumi, Sakaguchi Norihito, Maeda Yukari, Tanaka Takeshi, Kataura Hiromichi, Yokoyama Atsuro	4. 巻 2
2. 論文標題 Fate of Carbon Nanotubes Locally Implanted in Mice Evaluated by Near-Infrared Fluorescence Imaging: Implications for Tissue Regeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 1382-1390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsnm.8b02267	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 Russier Julie, Leon Verolinica, Orecchioni Marco, Hirata Eri, Virdis Patrizia, Fozza Claudio, Sgarrella Francesco, Cuniberti Gianarelio, Prato Maurizio, V?zquez Ester, Bianco Alberto, Delogu Lucia G.	4. 巻 56
2. 論文標題 Few-Layer Graphene Kills Selectively Tumor Cells from Myelomonocytic Leukemia Patients	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ANGEWANDTE CHEMIE- INTERNATIONAL EDITION	6. 最初と最後の頁 3014 ~ 3019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.201700078	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 該当する

1. 著者名 Hirata Eri	4. 巻 38
2. 論文標題 Carbon nanomaterials for bone tissue regeneration	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hokkaido Journal of Dental Science	6. 最初と最後の頁 99-103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 4件/うち国際学会 10件）

1. 発表者名 前田由佳利、平田恵理、高田紗理、木村貞仁、横山敦郎
2. 発表標題 カーボンナノホーンに担持したミノサイクリンの静菌作用と徐放性
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会第39回東北・北海道支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sadahito Kimura、 Eri Hirata、 Sari Takada、 Masatoshi Sakairi、 Masako Yudasaka、 Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Macrophage behavior on the titanium electrodeposited carbon nanohorn .
3. 学会等名 NT19 20th International Conference on the Science and Application of Nanotubes and Low-Dimensional Materials (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村貞仁、平田恵理、 高田紗理、 坂入正敏、 湯田坂雅子、 横山敦郎
2. 発表標題 カーボンナノホーン修飾チタン上でのマクロファージの挙動
3. 学会等名 第九回ナノカーボンバイオシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eri Hirata、 Masako Yudasaka、 Yukari Maeda、 Takeshi Tanaka、 Hiromichi Kataura、 Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Observation of Carbon Nanotubes Locally Implanted in Mice: Implications for Tissue Regeneration.
3. 学会等名 7th International Conference for young chemists. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Occlusal considerations in dental implant therapy.
3. 学会等名 The 6th Indonesian Symposium of Implant Dentistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eri Hirata
2. 発表標題 The advantages of carbon nanomaterials for bone tissue engineering.
3. 学会等名 NT19 20th International Conference on the Science and Application of Nanotubes and Low-Dimensional Materials (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eri Hirata
2. 発表標題 Applications of carbon nanomaterials in bone tissue engineering.
3. 学会等名 CNRS Institut de Biologie Moleculaire et Cellulaire, Laboratoire d'Immunopathologie et Chimie Therapeutique IBMC seminaire. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Prognosis and Efficacy of Partial Denture Treatment.
3. 学会等名 66th Japanese Association for Dental research. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eri Hirata, Masako Yudasaka, Yukari Maeda, Takeshi Tanaka, Hiromichi Kataura, Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Near-infrared photoluminescent imaging of carbon nanotubes locally implanted in mice.
3. 学会等名 the 256th American Chemical Society National Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sadahito Kimura, Eri Hirata, Sari Takada, Masatoshi Sakairi, Masako Yudasaka, Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Macrophage behavior on the carbon nanohorn coated anodized titanium
3. 学会等名 The 11th Congress of Asian Academy of Osseointegration 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sadahito Kimura, Eri Hirata, Sari Takada, Masatoshi Sakairi, Masako Yudasaka, Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Activation of macrophage on the carbon nanohorn functionalized anodized titanium.
3. 学会等名 The 66th Annual meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eri Hirata, Masako Yudasaka, Yukari Maeda, Takeshi Tanaka, Hiromichi Kataura, Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 In vivo Kinetics of Carbon Nanotubes Locally Implanted in Mice
3. 学会等名 The 66th Annual meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田由佳利, 平田恵理, 高田紗理, 坂入正敏, 木村貞仁, 横山敦郎.
2. 発表標題 静菌作用を付与したカーボンナノホーンの開発.
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会 北海道ブロック第3回研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村貞仁, 高田紗理, 坂入正敏, 湯田坂雅子, 平田恵理, 横山敦郎.
2. 発表標題 骨伝導性向上を目的としたカーボンナノホーンによる陽極酸化チタンの表面修飾.
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会 北海道ブロック第3回研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田由佳利, 平田恵理, 高田紗理, 坂入正敏, 木村貞仁, 横山敦郎
2. 発表標題 カーボンナノホーンのリノサイクリン担持による静菌作用の付与.
3. 学会等名 日本補綴学会第127回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村貞仁, 平田恵理, 高田紗理, 坂入正敏, 湯田坂雅子, 横山敦郎.
2. 発表標題 カーボンナノホーン修飾陽極酸化チタン上でのマクロファージの活性.
3. 学会等名 第八回ナノカーボンバイオシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田由佳利, 平田恵理, 小松原浩実, 山本悟, 横山敦郎.
2. 発表標題 ミノサイクリンを担持したカーボンナノホーンの開発.
3. 学会等名 第47回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高田紗理, 平田恵理, 前田由佳利, 小松原浩実, 山本悟, 横山敦郎.
2. 発表標題 カーボンナノホーン修飾陽極酸化チタン上の骨形成
3. 学会等名 第47回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Eri Hirata, Masako Yudasaka, Yukari Maeda, Takeshi Tanaka, Hiromichi Kataura, Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Biodistribution of carbon nanotubes after local implantation of mice
3. 学会等名 第54回フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	横山 敦郎 (Yokoyama Atsuro) (20210627)	北海道大学・歯学研究院・教授 (10101)	
連携 研究者	湯田坂 雅子 (Yudasaka Masako) (70159226)	名城大学・理工学研究科・特任教授 (33919)	