

令和元年9月20日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19742

研究課題名(和文)骨免疫制御を可能にするインプラントナノ表面形態の探索

研究課題名(英文) Exploring nano-surface topography of dental implants to regulate osteoimmunology

研究代表者

山田 将博 (Yamada, Masahiro)

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) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウスマクロファージ(M<sub>1</sub>)細胞株を用いた細胞培養試験を行った結果、機械研磨面とは異なり、ナノ表面上ではM<sub>1</sub>の分極が制御されることが示された。さらに、ラット上顎骨におけるインプラント周囲炎モデルを作製し、インプラント周囲骨吸収の組織学的評価を行った結果、平滑面インプラントの周囲組織では著しい炎症反応と骨吸収を認めた。一方、ナノ粗面インプラント周囲では歯肉中に炎症反応を認められたものの、歯肉構造の崩壊や骨吸収をほとんど認めなかった。以上の結果から、ナノ粗面チタン表面は、M<sub>1</sub>の分極化を促進することにより、細菌感染性炎症による歯肉の崩壊と骨吸収を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨結合促進を目的としたチタン表面のナノ改質技術は散見されるが、インプラント頸部に慢性炎症の結果生じる骨吸収という問題に対して、骨免疫機序に着目し、細胞移植や生理活性物質の投与ではなく、ナノ技術を駆使してチタンインプラント表面の改質のみで制御することを証明した学術的意義は大きい。本研究の成果は、未だ解決策が無いインプラント周囲骨吸収に対して具体的な予防技術を提供するとともに、整形外科インプラントや骨補填材を含む生体材料に関連した慢性炎症の問題解決の一助にもなる。さらに、広い分野の臨床・基礎研究領域で活かされる可能性を大いに含んでおり、萌芽的な技術概念を創出したと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The cell culture experiment using mouse macrophage (M<sub>1</sub>) cell line showed that the polarization of M<sub>1</sub> is controlled on the titanium nano-roughened surface in contrast with the machined titanium surface. In addition, histological evaluations of peri-implant bone resorption around titanium implants were performed in a peri-implantitis model on rat maxilla. Severe gingival inflammation and bone resorption were observed in the peri-implant tissue around the machined titanium implants. In contrast, despite inflammatory reactions in peri-implant gingival tissue, gingival degradation and bone resorption were hardly observed in the peri-implant tissue around titanium implants with the nano-roughened surface. Those results suggested that nano-roughened titanium surfaces may inhibit the gingival degradation and bone resorption due to bacterial infectious inflammation by promoting the polarization of M<sub>1</sub>.

研究分野：生体材料学

キーワード：メカノトランスダクション ナノテクノロジー 表面改質 骨免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

歯科用インプラント治療は欠損歯の治療法の一つとして確立されてはいるが、経年的なインプラント顎部骨吸収の問題については未だその決定的な予防法は無い。

近年、骨組織の恒常性維持における免疫細胞の役割が注目されている。破骨細胞の前駆細胞となるマクロファージ (MΦ) は慢性炎症性疾患の骨吸収において重要な役割を担う (Adamopoulos IE et al., *Nat Rev Rheumatol*, 2015)。インプラント周囲組織の炎症や顎部骨吸収は、細菌感染だけでなく、インプラント由来のチタン摩耗粉やイオンが MΦ を活性化することによっても引き起こされる可能性が指摘されている (Soloviev A et al., *J Orthop Res*, 2005; Pettersson M et al., *J Periodontal Res*, 2016)。インプラント周囲炎における歯肉組織への MΦ の浸潤密度は歯周炎の場合よりも高いことから (Berglundh T et al., *J Clin Periodontol*, 2011)、MΦ はインプラント顎部骨吸収の発症に深く関与している可能性がある。

非活性化状態の MΦ (M0 型) は、リガンド刺激に依存して、炎症性 MΦ (M1 型: 古典的活性化 MΦ) と抗炎症性 MΦ (M2 型: 選択的活性化 MΦ) に分極する。M1 型は炎症性サイトカインを産生し炎症を促進する。一方、M2 型は抗炎症性サイトカインを産生し、炎症を寛解する (Benoit M et al., *J Immunol*, 2008)。近年、骨吸収を伴う様々な慢性炎症性疾患において、MΦ の各サブセットの役割が明らかにされつつある。歯周炎では、M1 型 MΦ が、インターフェロンガンマ (IFN- $\gamma$ ) の分泌を介して、特異的に破骨細胞分化を抑制し、歯槽骨の吸収を軽減することが報告された (Yamaguchi T et al., *Infect Immun*, 2016)。一方、マウス歯周炎モデルにおいて、歯周炎惹起後の M2 型 MΦ の増加は破骨細胞形成量と歯槽骨吸収量を著しく減少させることも報告されている (Zhuang Z et al., *J Dent Res*, 2019)。

リガンド刺激だけでなく、インテグリンからのシグナル伝達とアクチン線維収縮による核の牽引というメカノトランスダクション機構の活性化も、MΦ の分極化を制御する (Patel NR et al., *PLoS One*, 2012)。メカノトランスダクションが MΦ の分極化に及ぼす影響は、リガンド刺激と同等以上との報告もある (McWhorter FY et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013)。メカノトランスダクション機構は足場の表面形態や剛性などの表面特性により活性化される (Walters NJ et al., *Acta Biomater*, 2015; Kumar S., *Nat Mater*, 2014) 一方、ナノ表面形態は、付着細胞のメカノトランスダクション機構を活性化させる最も効果的な表面特性の一つである (Teo BK et al., *ACS Nano*, 2013)。

以上を背景に、代表者は「MΦ の分極化を制御するナノ表面形態をインプラント顎部に付与することで、分極化 MΦ が作り出す骨免疫環境を介した破骨細胞形成の抑制を可能にし、インプラント顎部の骨吸収を防ぐ新たな技術を創出する」ことを着想した。

## 2. 研究の目的

本研究は、MΦ の骨免疫制御を利用して破骨細胞によるインプラント顎部の骨吸収を抑制する技術の開発を目的とし、MΦ の分極化を制御するチタンナノ表面改質技術によってこれを達成しようとする、斬新かつ挑戦的な戦略を提案する。

## 3. 研究の方法

グレード 純チタンディスクあるいはインプラント体を用い、機械研磨面、典型的なマイクロ粗面である濃硫酸で処理した酸処理面およびナノ粗面の試料を用意した。

### (1) チタンナノ粗面が MΦ 細胞株の分極に与える影響

平成 29 年度で細胞培養実験を遂行し、MΦ の M1 型分極の誘導効果と破骨細胞分化の抑制効果が高いチタンナノ表面を同定した。マウス MΦ 様細胞株を、各チタンディスク上で培養し、Real-time PCR を用いて、M1 型と M2 型のマーカー分子の発現を比較検討した。

### (2) チタンナノ粗面が実験的インプラント周囲炎モデルにおける炎症性骨吸収に与える影響

平成 30 年度は、マウス動物実験から、チタンナノ表面による MΦ 分極化を介した骨免疫制御および骨吸収抑制を動物実験モデルで検証した。ラット上顎骨第一大臼歯相当部に埋入したインプラント顎部に 4-0 絹糸を結紮し、4 週間留置することによりインプラント周囲炎を惹起させ、インプラント周囲骨吸収の定量的評価および組織学的評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1) チタンナノ粗面が MΦ 細胞株の分極に与える影響

マウス MΦ 細胞株を機械研磨面、酸処理面およびナノ粗面のチタンディスク上で培養し、MΦ の分極化を解析した結果、既存のインプラント表面である機械研磨面や酸処理面上と比べて、ナノ粗面上では、M1 および M2 型マーカー双方の発現が増加した。

(2) チタンナノ粗面が実験的インプラント周囲炎モデルにおける炎症性骨吸収に与える影響  
ラット上顎骨第一大臼歯相当部に埋入したインプラントに絹糸結紮による炎症反応を惹起させ、マイクロ CT による解析を行った結果、機械研磨面や酸処理面インプラント周囲では、骨内部のスレッドが露出する程度の周囲骨吸収を認めた。一方、ナノ粗面インプラント周囲では骨吸収はほとんど生じなかった。機械研磨面や酸処理面周囲に比べて、ナノ粗面周囲では、骨吸収量が著しく少なかった。

また、組織学的解析により、機械研磨面や酸処理面インプラント周囲歯肉組織では炎症性サイトカインやコラーゲン分解酵素の産生とともに、活発な TRAP 陽性細胞の形成を認めた。一方、ナノ粗面インプラント周囲では歯肉中に炎症性サイトカインは産生されたものの、コラーゲン分解酵素の産生や破骨細胞形成をほとんど認めなかった。

以上の結果から、ナノ粗面チタンインプラントは、MΦ の分極化を制御することにより、感染性炎症による歯肉線維構造の崩壊と破骨細胞形成を抑制することが示された。本研究成果は、チタン表面改質により、インプラント周囲の免疫細胞の機能を制御することで、炎症性骨吸収を抑制できる可能性を示しており、今後、歯科領域のみならず医学領域におけるインプラント治療への貢献が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Watanabe J, Yamada M, Niibe K, Zhang M, Kondo T, Ishibashi M, Egusa H.  
Preconditioning of bone marrow-derived mesenchymal stem cells with N-acetyl-L-cysteine enhances bone regeneration via reinforced resistance to oxidative stress.  
Biomaterials, 185: 25-38, 2018.  
査読有  
10.1016/j.biomaterials.2018.08.055.
2. Yamada M, Egusa H.  
Current bone substitutes for implant dentistry.  
J Prosthodont Res, 62(2): 152-161, 2018.  
査読有  
10.1016/j.jpor.2017.08.010.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Kartikasari N, Yamada M, Egusa H.  
Effects of titanium nano-surfaces on prevention of peri-implantitis.  
第 8 回補綴若手研究会, 2019 年 3 月 10 日, 鹿児島
2. 山田将博  
バイオミメティックインプラントによる軟組織付着獲得への挑戦  
第 48 回日本口腔インプラント学会シンポジウム  
2018 年 9 月 16 日(日), 仙台
3. Watanabe J, Yamada M, Egusa H.  
N-acetyl-L-cysteine Reinforces Apoptosis Resistance of MSCs to Promote Bone Regeneration.  
Hatton competition in Japanese Association for Dental Research 65<sup>th</sup> Annual Meeting,  
November 17, 2017, Tokyo, Japan
4. 山田将博  
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  
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  
シンポジウム 「インプラント・再生歯科材料 update」, 2017 年 10 月 29 日, 仙台
5. Watanabe J, Yamada M, Egusa H.  
Redox biology-based strategy in bone regeneration for efficient transplantation of osteoblastic cells.

International meeting the 7<sup>th</sup> Temu Ilmiah Nasional and 4<sup>th</sup> Scientific Meeting in Dentistry,  
October 5-7, 2017, Surabaya, Indonesia.

〔図書〕(計1件)

1. 船登彰芳, 山田将博, 吉松繁人(編著)(分担執筆)

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, 医  
歯薬出版株式会社, 東京, 2017

〔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:  
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:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

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

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 江草 宏

ローマ字氏名: Egusa Hiroshi

所属研究機関名: 東北大学

部局名: 大学院歯学研究科

職名: 教授

研究者番号(8桁): 30379078

### (2)研究協力者 なし

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。