

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19627

研究課題名（和文）カーボンナノ物質の生物学的特性を用いた革新的組織修復・骨再生のストラテジーの構築

研究課題名（英文）Construction of the strategy on innovative tissue repair and bone regeneration using biological properties of carbon nano-materials

研究代表者

横山 敦郎（YOKOYAMA, ATSURO）

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：20210627

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）：カーボンナノ材料の生物学的特性を用いた新たな組織修復・骨再生のストラテジーを構築するため、チタン表面にカーボンナノホーン（CNHs）を修飾し、骨組織との反応を解析するとともに、マクロファージを培養し、炎症性サイトカインの分析と蛍光免疫染色を行った。CNHs表面修飾チタンは、骨組織への埋入初期において骨形成を促進した。マクロファージ培養3日後のCNH/TiのTNF とIL-6はTiと比較して有意に低く、IL-10は有意差を認めなかった。CNH/Tiでは、CD206の蛍光強度が高い細胞の割合が有意に高いことが示され、CNH/Ti上でM2マクロファージに分極してい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

インプラント材料として広く臨床応用されているチタン表面を炭素のみから構成される新素材であるカーボンナノホーン（CNHs）でコーティングすることにより初期の骨形成が促進されることが明らかとなり、また、CNHsが組織修復に関与するM2マクロファージの分極に影響している可能性が示された。これらの成果は、インプラントにおける骨再生の新たなストラテジーの構築に大きく寄与するとともに、新素材であるCNHsを用いた新たなインプラント材料の開発に発展するものと考えられ、将来のさらなる展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, to establish new strategy on tissue and bone regeneration with the biological characteristics of CNHs, titanium was coated with CNHs with using electrodeposition. CNH/Ti was implanted in rat bone. Inflammatory cytokines and gene expression of macrophages cultured on CNH/Ti and Ti were analyzed and also fluorescent immunostaining was carried out. CNH/Ti promoted bone formation in early stage. The amounts of TNF and IL-6 on CNH / Ti were significantly lower than those on Ti, and there was no significant difference in IL-10. Gene Ontology analysis by microarray showed genes related to transcription, repair and replication of macrophage DNA in CNH / Ti were down-regulated compared to Ti. More macrophages with high intensity for CD206 was observed on CNH/T compared with Ti. Therefore, it was suggested that CNHs on the Ti surface regulate transcription, repair and replication of DNA of macrophage, and effect on M2 macrophage polarization.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：カーボンナノ材料 カーボンナノホーン マクロファージ チタン 表面処理 骨形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、十数年来、カーボンナノマテリアル(CNMs)の医学・バイオ領域への応用を目的としてCNMsのin vitroおよびin vivoにおける反応について研究を行うとともに、現在まで各種のCNMsを用いて細胞培養用スキャホールド、骨補填材、GBR膜の開発、さらにチタンへの表面修飾等を行い、CNMsの生体材料への応用の可能性を検討してきた。生体材料の開発においては、生体内での動態と効果発現のメカニズムは非常に重要な要素であるが、CNMsについて未だ十分に解明されておらず、CNMsを生体材料として開発・実用化するためには、解決しなければならない大きな問題である。純度の高い様々なCNMsの合成が可能となり、その生体内分解性の研究がなされ、CNMsの生体内での分解におけるマクロファージの関与が注目されている。これまで、申請者らは、CNMsが骨形成を促進し、マクロファージが関係していることを報告してきた。以上のような経緯から、申請者らは、「CNMsの軽微な刺激により産生されるサイトカインがマクロファージを誘導、分化(例えばM2マクロファージ)し、組織の間葉系幹細胞を介して組織修復・骨再生を促進するのではないか」という考えに至った。

2. 研究の目的

申請者らは、CNMsが骨形成を促進し、マクロファージが関係していることを報告している。本研究においては、「CNMsの軽微な刺激により産生されるサイトカインがマクロファージを誘導、分化(例えばM2マクロファージ)し、組織の間葉系幹細胞を介して組織修復・骨再生を促進するのではないか」という申請者らが構築した仮説を実証することにより、CNMsの生物学的特性を用いた革新的な組織修復・骨再生のストラテジーを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CNHsを泳動電着した陽極酸化チタンに対する骨芽細胞ならびに骨組織の反応

陽極酸化チタンに(AnTi)にCNHsを電圧、時間などの条件を変えて泳動電着し、最適となる条件で試料(CNH/AnTi)を製作した。骨芽細胞様細胞(Saos-2)をディスク状試料上で7日間培養し、DNA量とALP活性の測定を行うとともに、ワイヤー状試料をラット大腿骨に埋入し、組織学的、超微細構造学的ならびに組織計量学的に解析した。

(2) CNHs修飾チタン上におけるマクロファージの挙動

CNHsをチタン板に泳動電着により表面修飾し試料(CNH/Ti)を製作した。CNH/TiならびにTi上でマクロファージ(J774A1)を培養し、走査型電子顕微鏡(SEM)ならびに透過型電子顕微鏡(TEM)で観察するとともに、M1が分泌する炎症性サイトカインであるTNFおよびIL-6、ならびにM2が分泌する抗炎症性サイトカインであるIL-10の発現を比較した。また、マイクロアレイにより遺伝子の発現を解析した。さらにCD206(M2マーカー)の発現を観察した。

4. 研究成果

(1) CNHsを泳動電着した陽極酸化チタンに対する骨芽細胞ならびに骨組織の反応

骨芽細胞様細胞の培養結果

細胞培養7日後、CNH-AnTi上では細胞が良好に付着・伸展し(図1)、細胞の仮足はCNHsに直接接していた。また培養7日後のCNH-AnTiにおけるDNA量は、AnTiと比較し有意に多かったが、ALP活性については差が認められなかった(図2)。

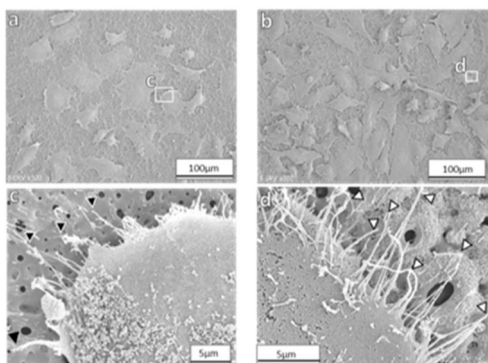


図1 培養1日後のSEM像

a: AnTi b: CNH/AnTi c: aの拡大像 d: bの拡大像

CNHを泳動電着したCNH/AnTiのほうが細胞数が多く、仮足の伸展も多く、CNHと接触が認められる。

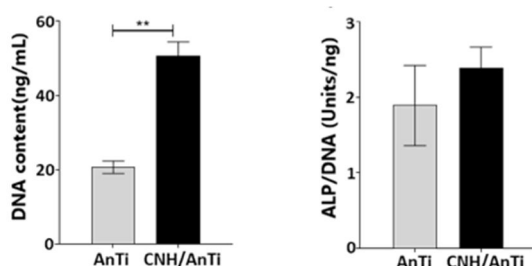


図2 培養7日後のDNA量(左)ALP活性(右)

CNH/AnTiのほうがDNA量が多く、有意差が認められたが、DNAあたりのALP活性には有意差は認められない。

骨組織における組織学的、超微細構造学的ならびに組織計量学的解析結果

骨髄腔埋入7日後では、AnTi、CNH/AnTiともに周囲に幼弱な新生骨組織が観察され、一部の新生骨は、CNHsと直接接していた(図3)。7日後のCNH/AnTiの骨接触率はAnTiに比較し有意に高かった(図4)。28日後において、一部のCNHsが骨基質と接していることがTEM観察にて明らかとなった(図5)。

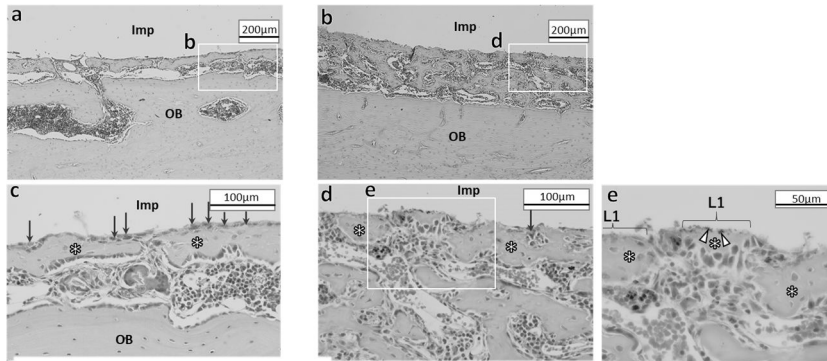
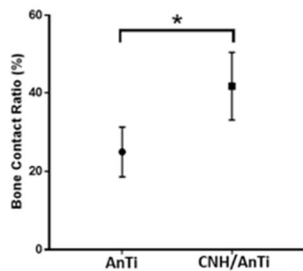


図3
7日後の組織像
a: AnTi
b: CNH/AnTi
c: aの拡大像
d: bの拡大像
e: dの拡大像
CNH/AnTiはAnTiに比較し直接骨組織が接している部分が多く、一部表面には、CNTを示す黒点が観察され



た(e)。

図4
7日後の骨接触率
7日後のCNH/AnTiはAnTiに比較し有意に骨接触率が高かった。

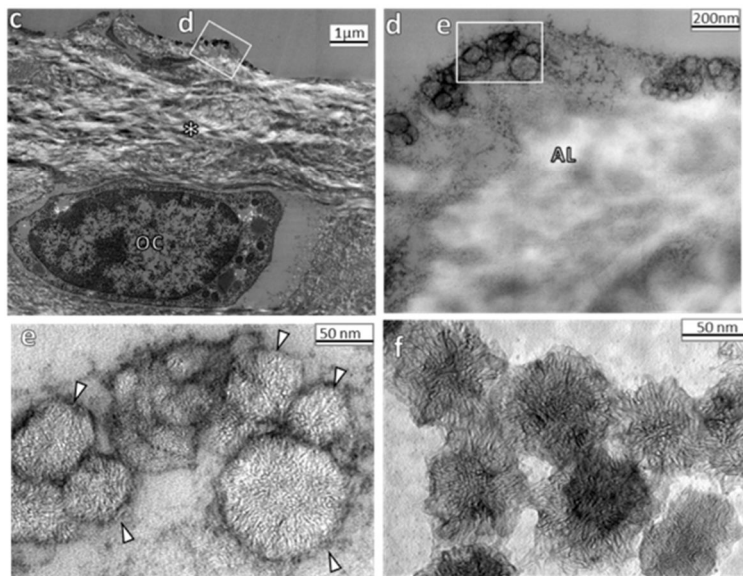


図5
28日後CNH/AnTiのTEM像
c: 周囲骨組織
d: cの拡大像 CNHと骨組織のコラーゲン線維の間には、アモルファスな構造が認められた。
e: dの拡大像 CNHの構造が明確に観察された。
f: CNHのTEM像

以上の結果から、CNHsを泳動電着法によって陽極酸化チタン表面に均質に表面修飾することが可能であること、また、CNHsを表面修飾した陽極酸化チタンが優れた骨伝導性を有することが明らかとなり、CNHsを表面修飾した陽極酸化チタンの新たなインプラント材料としての可能性が示された。

(2) CNHs修飾チタン上におけるマクロファージの挙動

SEMおよびTEM観察

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。(図6) CNHs/TiのTEM観察では、細胞内に少量のCNHsが観察された(図7)。

サイトカインおよびマイクロアレイによる解析

培養3日後のCNH/TiにおけるTNFとIL-6は、Tiに比較して有意に低く、IL-10では両者の間に有意差はなかった(図8)。マイクロアレイによるGene Ontology解析により、CNH/Ti上のマクロファージでは、Ti上と比較してDNAの転写・修復・複製に関する遺伝子が下方制御されていることが明らかとなった。

CD206(M2マーカー)の発現の観察

蛍光免疫染色では CNH/Ti の CD206 の蛍光強度は、Ti に比較し有意に高かった (図 9)。

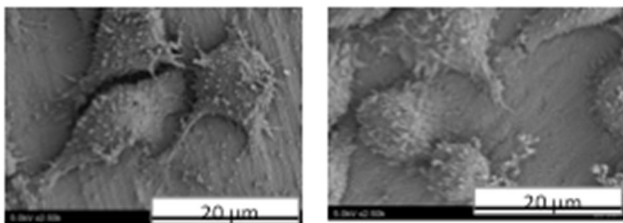


図 6 培養 1 日後の SEM 像
左図:Ti 右図:CNH/Ti CNT/Ti 上のマクロファージは球形をていしている。

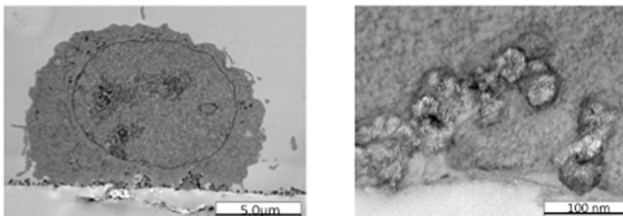


図 7 培養 3 日の TEM 像
左図:CNH/Ti 右図:左図の拡大像
マクロファージは円形を呈し、細胞内に CNH が観察される。

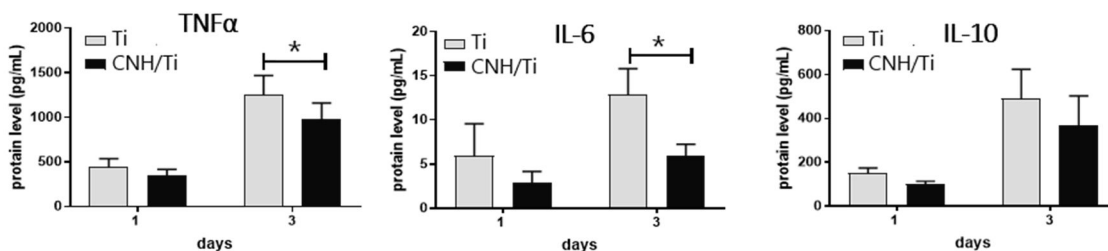


図 8 培養 1 および 3 日後の各種サイトカインの発現
3 日後の TNF- と IL-6 については、Ti の方が高く、有意差が認められる。

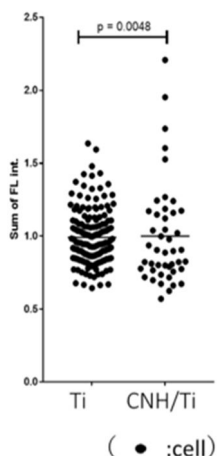


図 9 CD206 について蛍光免疫染色後、蛍光強度を数値化し、正規分布の平均を基準として規格化したグラフ
CNH/Ti が Ti に比較して高く、有意差が認められる

以上の結果から、Ti 表面に修飾した CNHs は、マクロファージの DNA の転写・修復・複製に影響し、組織再生に関与する M2 マクロファージへの分極を誘導する可能性が示された。

結論：CNHs をチタンに表面処理することにより、初期の骨伝導性が向上すること、チタンに表面処理した CNHs は、マクロファージの分極に関与することが示唆された。今後のカーボンナノ物質の生体材料への応用と展開が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0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 Takada Sari, Hirata Eri, Sakairi Masatoshi, Miyako Eijiro, Takano Yuta, Ushijima Natsumi, Yudasaka Masako, Iijima Sumio, Yokoyama Atsuro	4. 巻 49
2. 論文標題 Carbon nanohorn coating by electrodeposition accelerate bone formation on titanium implant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 20～29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/21691401.2020.1865388	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14件（うち招待講演 1件／うち国際学会 7件）

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 Eri Hirata
2. 発表標題 Applications of carbon nanomaterials in bone tissue engineering.
3. 学会等名 CNRS Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Laboratoire d'Immunopathologie et Chimie Thérapeutique IBMC séminaire. (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ミ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 木村貞仁, 平田恵理, 高田紗理, 横山敦郎
2. 発表標題 チタン表面に修飾したカーボンナノホーンに誘導されるマクロファージ遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第129回学術大会
4. 発表年 2020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培養したマクロファージの極性と遺伝子発現の検索
3. 学会等名 第十回ナノカーボンバイオシンポジウム
4. 発表年 2020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	山本 悟 (YAMAMOTO SATORU) (10344524)	北海道大学・歯学研究院・助教 (10101)	
研究分担者	平田 恵理 (HIRATA ERI) (10722019)	北海道大学・歯学研究院・助教 (10101)	
研究分担者	高野 勇太 (TAKANO YUUTA) (60580115)	北海道大学・電子科学研究所・准教授 (10101)	

	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
研究協力者	木村 貞仁 (KIMURA SADAHITO)	北海道大学・歯学院・大学院生 (10101)	
研究協力者	高田 紗理 (TAKADA SARI)	北海道大学・北海道大学病院・医員 (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)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	坂口 紀史 (SAKAGUCHI NORIHITO) (70344489)	北海道大学・学内共同利用施設等・准教授 (10101)	
連携研究者	花方信孝 (HNAGATA NOBUTAKA) (10302796)	国立研究開発法人・材料研究機構・ナノテクノロジー融合ステーション・ステーション長 (82108)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
フランス	フランス国立科学研究所(CNRS)		