

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462980

研究課題名(和文) 紫外線照射したチタン製インプラントの免疫応答の解明

研究課題名(英文) The effect of ultraviolet functionalization of titanium on inflammation control

研究代表者

月村 直樹 (TSUKIMURA, Naoki)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：10301558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：今回、光機能化の機序の理解を深めるため、その免疫担当細胞に対する影響を検索した。in vitroでは、光機能化されたチタン上で培養されたマクロファージの分泌するTNF- $\alpha$ は未処理群と比較して減少し、一方でIL-10の分泌は増加することが明らかとなった。動物実験モデルの結果、光機能化されたインプラント表面に付着するM1マクロファージは未処理群と比較して減少することが観察された。本研究の結果は、光機能化によるインプラント表面の改質が免疫担当細胞の挙動に影響することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this present study, we evaluated the effect of UV treatment of titanium on the cellular reaction of macrophage. The amount of TNF- $\alpha$  in the supernatant of an untreated group was higher than that of UV treated group. In contrast, UV treatment increased the expression of IL-10 in the supernatant compared to untreated group. UV treatment decreased the number of CD48+ cells attached to titanium surface compared to the untreated surface. The results suggest that a surface alteration using UV-light treatment affect a cellular behavior of macrophage.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：チタン インプラント オッセオインテグレーション 紫外線 マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

歯科、整形外科を中心に使用されるチタン製インプラントは、開封されたばかりの新品であっても表面に化学的な汚染が認められ、治療成績に影響するという驚くべき事実があります。

過去の報告では、チタン表面に対する化学的汚染の正体は炭素とされ、炭素の汚染の有無により、骨とインプラント結合率において約 35%もの違いがあることが明らかになっています。しかしながら炭素は、大気中や包装に用いられるプラスチックなどに由来していることから、その予防は困難と考えられてきました。

そこで現在、チタンインプラント表面から炭素を除去することができるかと期待されている方法が、紫外線照射処理です。特定波長の紫外線照射により、チタン表面に付着した炭素の約 30%が除去できることが確認されました。このメカニズムは、チタン表面の酸化チタンに紫外線が照射されることで生じる光触媒作用によると考えられています。

以下にこれまでの研究で明らかになっている、チタン表面に対する紫外線照射による効果をまとめます。

(1) 紫外線照射によりチタン表面に付着した炭素量が低下する。

(2) *In vivo* のインプラント埋入実験において、紫外線照射されたチタンに対して得られる骨結合がコントロールと比較して有意に高い。

(3) *In vitro* の細胞培養実験において、紫外線照射されたチタン上で培養した骨芽細胞の増殖能と分化能がコントロールと比較して有意に高い。

過去の研究では、紫外線照射されたチタン表面に骨芽細胞の高い増殖能と分化能並びに強固な骨結合率が認められました。しかし、生体内で骨芽細胞をチタンインプラント表面に誘導する明確な機序は未だ不明です。そこで、注目したのがチタンインプラント埋入部周囲組織の細胞に影響を与える可能性が高い免疫細胞の分泌するサイトカインです。生体内に埋入されたインプラントは、まず免疫細胞により異物と認識されます。その中でも自然免疫を担当するマクロファージはいち早く異物に反応し、多種多様なサイトカインの分泌を行います。この分泌されたサイトカインは周囲の細胞環境に大きな影響を与えられと考えられます。

また、研究代表者はすでに、チタン表面に付着した炭素による化学的汚染の有無により、骨芽細胞において細胞レベルのストレスに影響があることをこれまで明らかにしてきました。このことは、免疫細胞に対する反

応にも違いがあることが予測されます。さらに、炭素の付着したチタンが抗原と認識され必要以上の免疫反応を引き起こし、治癒を妨げている可能性が疑われます。

一方、紫外線照射されたチタンインプラント周囲の良好な骨治癒は基礎研究と臨床研究の両方で確認されており、紫外線照射により浄化されたチタン表面では理想的な治癒形態が予測できます。

本研究においては、

(1) 炭素汚染されたチタンはマクロファージに対して抗原と認識される。

(2) 炭素汚染されたチタンに反応したマクロファージは、不必要な炎症サイトカインを分泌して治癒を妨げる。

(3) 紫外線照射により炭素の化学的汚染を取り除かれたチタン周囲においては、マクロファージによる過剰な炎症性サイトカインの分泌は無く、速やかな治癒が行われる。

上記の一連の仮説に基づき、サイトカインのプロファイルとチタンインプラント周囲の治癒の関連性を観察し、その関連性を検索することにしました。

## 2. 研究の目的

チタンに対して紫外線照射を行うことは、表面の化学的汚染が浄化されることはもとより、生体に対する免疫原性が低下すると考えます。すなわち、浄化されたインプラントでは、骨髄由来のマクロファージが産生する免疫細胞による異物反応が減ることで、高い骨インプラント結合率の獲得につながることを想定されます。チタン表面に付着した炭素汚染の有無によるチタンインプラントに対する免疫反応に関する報告はありません。最善の治療を行うにあたり、チタンインプラント表面に付着する化学的汚染の問題は致命的であり重要性は高いと考えられます。

本研究は、チタン製インプラントに対する紫外線照射による免疫原性の低下の機序を解明することを目的としており、このことは、低侵襲なインプラント技術を支持する有意義なエビデンスの一つとなると思います。

## 3. 研究の方法

*in vitro* の細胞培養実験では、初代培養のラット骨髄由来マクロファージを用いました。8 週齢 SD ラットから両側の大腿骨を無菌的に採取します。その後、両骨端を骨鋏にて切除し、骨髄を Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) にて洗い流します。回収した骨髄を、70m セルストレーナーにて濾過した後、(1300rpm、7 分間)遠沈します。沈殿した細胞を、M-CSF10ng/ml、10%ウシ胎児血清含有 DMEM 中で、(37℃、5%二酸化炭素含有大気、湿度 100%条件下で一週間)培養します。培養一週間後、上清を吸引、リン酸緩衝

液で二回洗浄し、0.25%トリプシン EDTA にて処理し、壁吸着細胞を剥離します。トリプシン EDTA を培地で中和した後、(1300rpm、3分間)遠沈し、リン酸緩衝液で沈殿した細胞を洗浄し、再度(1300rpm、3分間)遠沈したものを実験に用います。

サイトカインの検索では、得られた細胞を10%ウシ胎児血清含有 DMEM で懸濁し、12 ウェルマルチカルチャープレートの各ウェルに入れられたチタンディスク上に  $1.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$  の濃度で播種します。培養条件は、上記同様 37 °C、5%二酸化炭素含有大気、湿度100%で行います。培養24時間後、QIAGEN 社製 Rat Inflammatory Cytokines Multi-Analyse ELISArray Kit を用いて培養細胞から分泌される以下の炎症性サイトカインを定量します。本定量を用いて IL1A, IL1B, IL2, IL4, IL6, IL10, IL12, IL13, IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , GM-CSF, RANTES の定量を行います。

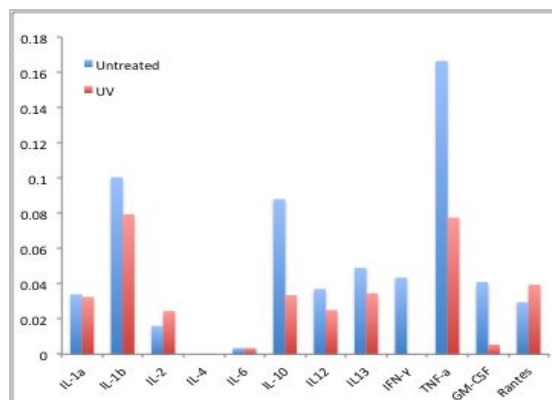
今回の実験では、サイトカインアレーで得られた結果の再現性を確認するために、創傷治癒に関連する IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-10 について、再度個別のサイトカイン定量試験も行いました。サイトカインの定量には、R&D Systems 社製 Human IL-1 Quantikine ELISA Kit、Human TNF- $\alpha$  Quantikine ELISA Kit、Human IL-10 Quantikine ELISA Kit を用いました。

In vivo の動物実験では、インプラント表面に付着したマクロファージを蛍光免疫染色法で観察しました。すなわち、8 週齢 SD ラット大腿骨に直径1mm 長さmm のインプラントを埋入し、埋入 1 日後にラットを屠殺し、大腿骨を回収しインプラント表面に付着した細胞を染色し観察します。

今回マクロファージを染色するにあたり、pro-inflammatory cytokine を分泌し炎症を促進させる M1 マクロファージと anti-inflammatory cytokine を分泌し炎症を抑制する M2 マクロファージを区別するため、それぞれの得意的表面抗原である CD68 と CD163 に対するモノクローナル抗体を用いました。

#### 4. 研究成果

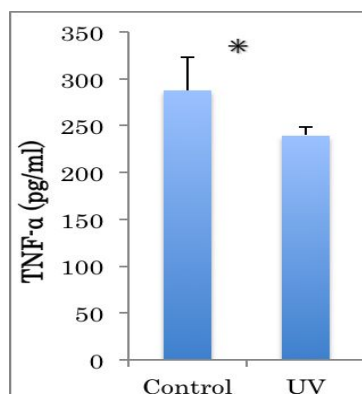
はじめに *in vitro* の実験系として、骨髄由来マクロファージを未処理と光機能化したそれぞれのチタンディスク上で培養し、24 時間後に培養上清中のサイトカインを定量しました。Cytokines Multi-Analyse ELISArray Kit を用いた解析では IL1B, IL2, IL10, IL12, IL13, IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , GM-CSF, RANTES で未処理群と光機能化群間で違いが認められました(図1)。

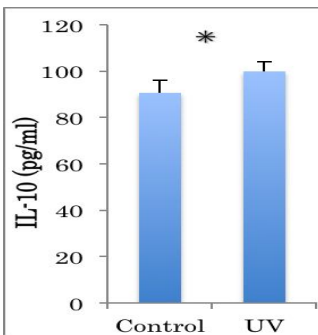
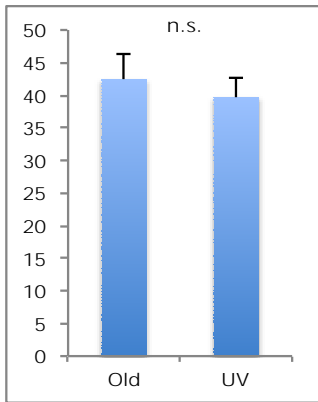


(図1) サイトカインアレー

サイトカインアレーで得られた結果の再現性を確認するために、創傷治癒に関連する IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-10 について、再度個別のサイトカイン定量試験を行いました。その結果、光機能化群は未処理のコントロール群と比較して、上清中の Proinflammatory cytokine である TNF- $\alpha$  は優位に少なく、一方で anti-inflammatory cytokine である IL-10 は優位に多いという結果が得られました。IL-1 においては、二群間に差異は認められませんでした(図2)。TNF- $\alpha$  は骨芽細胞の分化を抑制し、破骨細胞の分化を促進するという報告があり、IL-10 は治癒を促進する作用があるため、今回得られた二群間の違いはオッセオインテグレーションの獲得において影響を与える可能性があります。

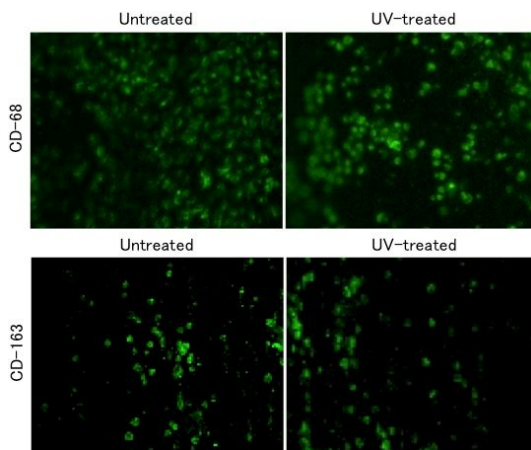
また、今回サイトカインアレーを用いた網羅的な解析と、個別のサイトカイン定量を行なって、IL-1、IL-10 において異なった傾向が見られました。これは、用いた検査キットが異なる製造元の物を使用したことに起因すると考えられます。光機能化群で TNF- $\alpha$  が優位に少ない点においては、一貫した傾向が見られています。





(図2) サイトカイン定量試験

動物実験モデルを用いた観察の結果、光機能化されたインプラント表面に付着する M1 マクロファージは未処理群と比較して減少することが観察されました。M2 マクロファージについては差が認められませんでした。(図3)



(図3) マクロファージ蛍光免疫染色

本研究の結果は、チタンインプラント材料に生じる炭素のコンタミネーションが、マクロファージの接着挙動や分泌するサイトカインに影響を与えることを示唆しています。そして、紫外線を用いた脱炭素表面改質処理が、過剰な炎症生サイトカインの分泌を防

ぎ、理想的なインプラント治療の開発につながる可能性を示しています。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

月村直樹、紫外線照射したチタン製インプラントの免疫応答の解明、第 38 回日本炎症・再生医学会、大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2017 年 7 月 18 日~19 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

月村 直樹 (TSUKIMURA, Naoki)  
日本大学・歯学部・准教授  
研究者番号：10301558

##### (2) 研究分担者

池田 貴之 (IKEDA, Takayuki)  
日本大学・歯学部・講師  
研究者番号：30366603

萩原 芳幸 (HAGIWARA, Yoshiyuki)  
日本大学・歯学部・准教授  
研究者番号：00228389

本田 雅規 (HONDA, Masaki)  
愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号： 7 0 3 6 1 6 2 3

本田 和也 (HONDA, Kazuya)  
日本大学・歯学部・教授  
研究者番号： 3 0 1 9 9 5 6 7

(3)連携研究者

新井 嘉則 (ARAI, Yoshinori)  
日本大学・歯学部・教授  
研究者番号： 2 0 2 1 2 0 6 7

(4)研究協力者

小川 隆弘 (OGAWA, Takahiro)