

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11149

研究課題名(和文) 義歯床用材料に着目した顎堤吸収の分子機構探索

研究課題名(英文) The surface morphology of titanium plate could change macrophage activity.

研究代表者

奥山 弥生 (OKUYAMA, YAYOI)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30223697

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)：義歯を介した顎堤吸収に関与する破骨細胞の機能亢進に対する報告はほとんどない。そこで表面処理法が確立しているチタンの表面性状の違いによる、マクロファージ分化の方向性を検討した。チタンプレート試料として、表面処理法が確立している平滑面およびマイクロ粗面である機械研磨面(MS)および酸処理面(AS)を準備し、各試料上で、破骨細胞前駆細胞を培養し、その遺伝子発現を検討した。その結果、MSで培養した破骨細胞前駆細胞は炎症性マクロファージのマーカーであるNOS2の発現が高くなった。今後、チタン表面性状がどのようにマクロファージの極性や破骨細胞分化に影響を与えるか明らかにする予定である。

研究成果の概要(英文)：Different surface textured titanium plate such as mechanical polishing surface (MS) and acid treatment surface (AS) were prepared. RAW 264.7 cells known as osteoclast precursor cells were cultured on each surfaces, and their gene expression was examined. As a result, the expression of NOS2, a marker of inflammatory macrophages (M1 macrophages), increased in RAW 264.7 cells cultured on the MS surface. On the other hand, RAW 264.7 cells cultured on the AS surface showed similar to macrophages cultured on polystyrene (negative control). RAW 264.7 cells were cultured on the MS surface and the AS surface, and after 72 hours the culture supernatant was collected. By continuing detailed studies in the future, we plan to clarify how titanium surface properties affect macrophage activity.

研究分野：補綴理工系歯学

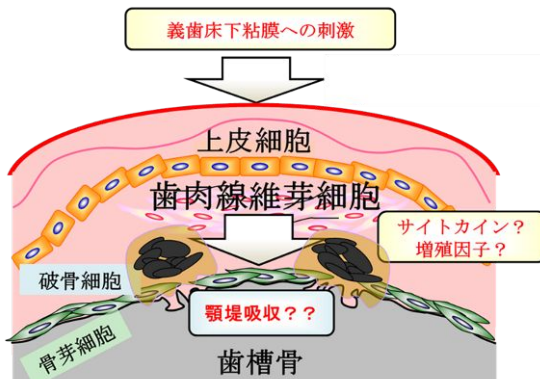
キーワード：顎堤吸収 チタン表面性状 破骨細胞 骨芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

義歯による長期に渡る床下粘膜への刺激は顎堤吸収を引き起こす。顎堤吸収は生涯に渡り回復することはなく、結果として義歯の維持や安定を困難にするばかりでなく、インプラント治療の可否や審美性に多大な影響を与える。そのため、特に我々のような補綴歯科医だけでなく、日常臨床の場においても、顎堤吸収はかいけつすべき難題と考えられる。骨組織は、骨形成を担う骨芽細胞と骨吸収を担う破骨細胞の数や機能がバランスを保つことにより、日々リモデリングを続けている。このバランスが崩れ、破骨細胞の機能が亢進した際、骨吸収が生じる。しかしながら、義歯を介した顎堤吸収に関する破骨細胞の機能亢進に対する報告は未だほとんどない(図1)。

近年、CAD/CAM に代表される Digital Dentistry の発展により、ジルコニアが床用レジンやチタンなどの金属に加え、新たな義歯床材料として使用されるに至った。ジルコニア等の陶材は生体安定性が高く、他の床用材料と比較してアレルギーなどの生体為害性は低いと考えられる。このように義歯床材料の違いが、義歯床下粘膜へ影響を及ぼすと考えられるが、残念ながら詳しい分子機構は未だ不明な点が多い。

図1



近年、骨代謝の分野において、免疫系と骨代謝に密接な関係があるという『骨免疫学 (Osteo-Immunology)』の概念が注目されてきている。この骨免疫学の観点から、義歯床材料の違いによる口腔粘膜組織の反応性の違いが、結果として顎堤吸収機構に関わっている可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は『顎堤粘膜に与える義歯による刺激は、義歯床材料の違いにより変化し、それらの刺激により顎堤粘膜はサイトカイン・増殖因子を産生し、顎堤吸収に関わる骨代謝機構を制御している』との作業仮説を提起し、この仮説を検討することにより顎堤吸収を制御しうる新たな分子標的を探索することである。

我々はまず、チタン上の機械的刺激に対する骨芽細胞反応はチタン表面形態により異なるという過去の報告(Sato N, et al. J Dent Res, 2009)や培養基面の表面形態の特徴に沿った細胞形態をとることにより、マクロファージ分化の方向性が変化するという報告(McWhorter FY, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013)に基づき、床用材料とメカニカルストレス、骨免疫との関わりという観点から、表面処理法が確立している純チタンを用いて、チタン表面形態が骨免疫に与える影響を調べることにした。

具体的に本研究では以下の項目を明らかにすることを目的とした。

(1) チタンプレートの表面性状の違いにより、RAW264.7 細胞がマクロファージとしての活性型に変化を生じるかを明らかにする。

(2) チタンプレートの表面性状の違いにより、RAW264.7 細胞の破骨細胞分化に影響を及ぼすかを明らかにする。

(3) マウスの単球・マクロファージ様細胞株である J774A.1 細胞を用いることにより、マクロファージにおけるチタンプレートの表面性状による影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) チタンプレートの表面性状の違いによる RAW264.7 細胞および J774A.1 細胞の形態変化の観察

表面性状の異なるチタンプレート試料として、表面処理法が確立している平滑面およびマイクロ粗面である機械研磨面 (MS) および酸処理面 (AS) を準備し、各試料上で、RAW264.7 細胞および J774A.1 細胞を培養した。

培養 24 時間後に試料を固定し、走査型電子顕微鏡により各試料上の細胞形態の観察を行った。

(2) チタンプレートの表面性状の違いによる RAW264.7 細胞および J774A.1 細胞の遺伝子発現の検討

MS および AS チタンプレートを準備し、各試料上で、各試料上で、RAW264.7 細胞および J774A.1 細胞を培養した。

培養 3 日および 5 日後に細胞からトリゾール法によりトータル RNA を抽出し、通常にしたがって cDNA を作製した。作製した cDNA を用いて炎症性マクロファージ (M1 マクロファージ) マーカーおよび抗炎症型マクロファージ (M2 マクロファージ) マーカーの遺伝子発現を半定量型 RT-PCR 法を用いて検討した。

(3) チタンプレートの表面性状の違いによる RAW264.7 細胞の破骨細胞分化への影響の検討

MS と AS 上で RAW264.7 細胞を培養し、72 時間後にその培養上清を回収した。回収した培養上清および破骨細胞分化メディウム (RANKL: 50 ng/mL 添加) で RAW264.7 細胞を破骨細胞分化誘導し、培養 5 日後に細胞を固定した。固定した試料に、通法通り TRAP 染色を行い、顕微鏡下で多核の巨細胞数を観察することにより破骨細胞の分化誘導能を検討した。

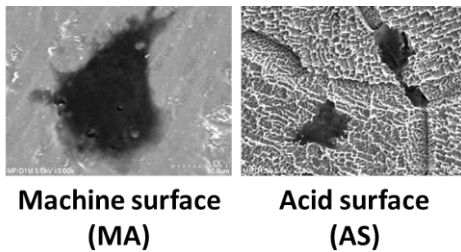
#### 4. 研究成果

(1) チタンプレートの表面性状の違いによる RAW264.7 細胞の形態変化

MA および AS の各試料上で培養した RAW264.7 細胞は各試料の走行に合わせて、形態を変化させることが明らかとなった (図 2)。

このことから、チタンプレート表面の性状の違いにより異なる機械的刺激が生じ、RAW264.7 細胞に差を生じさせる可能性が示唆される。

図 2



チタン表面上 RAW264.7 細胞の SEM 像 (×3000)

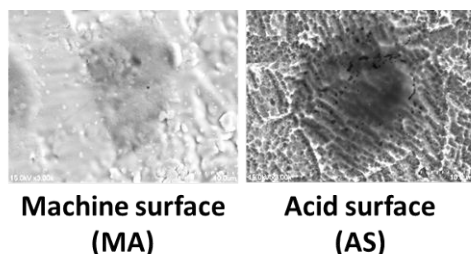
(2) チタンプレートの表面性状の違いによる J774A.1 細胞の形態変化

MA および AS の各試料上で培養した J774A.1 細胞は RAW264.7 細胞と同様に各試料の走行に合わせて、形態を変化させることが明らかとなった (図 3)。

このことから、チタンプレート表面の性状の違いにより異なる機械的刺激が生じ、J774A.1 細胞においても差を生じさせる可能性が示唆された。

しかしながら、その形態変化は RAW264.7 細胞ほど著明ではなく、これらの結果の違いがどのように影響を及ぼすかに関しては更なる検討が必要である。

図 3

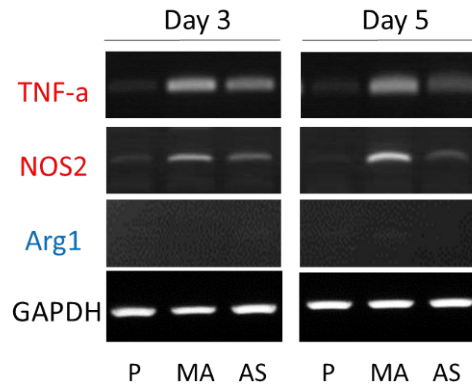


チタン表面上 J774A.1 細胞の SEM 像 (×3000)

(3) チタンプレートの表面性状の違いによる RAW264.7 細胞の遺伝子発現への影響

MS 上で培養した RAW264.7 細胞は炎症性マクロファージ (M1 マクロファージ) のマーカーである NOS2 の発現が高くなった。一方、AS 上で培養した RAW264.7 細胞はコントロールであるポリスチレン上で培養したマクロファージと同様の遺伝子発現を示した (図 4)。

図 4



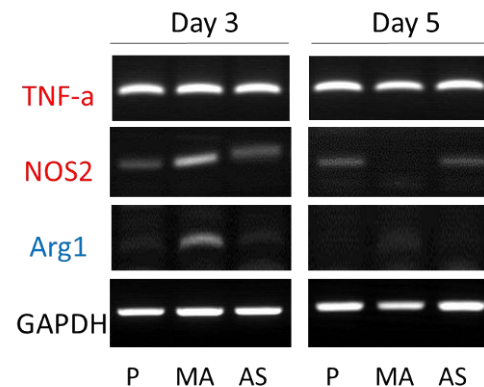
各種表面上の RAW264.7 細胞の遺伝子発現  
P: Polystyrene, MA: Machine surface, AS: Acid Surface

(4) チタンプレートの表面性状の違いによる J774A.1 細胞の遺伝子発現への影響

MS 表面上で培養した J774A.1 細胞は M1 マクロファージのマーカーである NOS2 の発現が上昇しており、AS 表面上で培養した J774A.1 細胞は NOS2 の発現に変化がなかった。一方で、MS 表面上で培養した J774A.1 細胞は抗炎症型マクロファージ (M2 マクロファージ) のマーカーである Arg1 の発現が上昇していた (図 5)。

この現象は RAW264.7 細胞では観察されていないことから、マクロファージの各分化段階で、表面形態への反応性が異なることが示唆された。今後、詳細な検討を続けることにより、チタン表面性状がどのようにマクロファージの極性や破骨細胞分化に影響を与えているか明らかにしていく予定である。

図 5

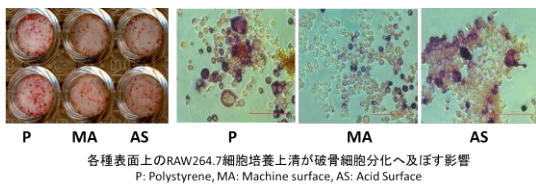


各種表面上の J774A.1 細胞の遺伝子発現  
P: Polystyrene, MA: Machine surface, AS: Acid Surface

(5) チタンプレートの表面性状の違いによる RAW264.7 細胞の破骨細胞分化への影響  
MS や AS 上で RAW264.7 細胞を培養した培養上清はポリスチレン上の培養上清に比べ、TRAP 陽性の破骨細胞の出現を減少させることが明らかとなった。破骨細胞分化抑制効果は、MS 上の培養上清でより顕著であった(図6)。

このことから、チタン表面性状の違いにより RAW264.7 細胞の性状が変化し、破骨細胞分化抑制因子を放出していることが示唆されるが、詳細なメカニズムは明らかではなく、更なる検討が必要であると考えている。

#### 図6



#### 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 4 件)

Osathanon T, Manokawinchoke J, Egusa H, Pavasant P./Notch signaling partly regulates the osteogenic differentiation of retinoic acid-treated murine induced pluripotent stem cells./J Oral Sci/2017/59(3):405-413. 査読有

Niibe K, Suehiro F, Oshima M, Nishimura M, Kuboki T, Egusa H./Challenges for stem cell-based "Regenerative Prosthodontics"./J Prosthodont Res/2017/61(1):3-5. 査読有

Akiba Y, Mizuta A, Kakihara Y, Nakata J, Nihara J, Saito I, Egusa H, Saeki M/The inhibitors of cyclin-dependent kinases and GSK-3 $\beta$  enhance osteoclastogenesis. BiochemBiophys Rep/2016;5:253-258. 査読有

原田章生, 山田将博, 江草 宏/インプラント上部構造に何を選びますか? ~知っておきたい歯冠修復材料の特徴~/日本歯科医師会雑誌/2016; 69(1): 41-47 査読無

〔学会発表〕(計 1 件)

江草 宏/再生歯科医療を材料と生体から理解する/大阪口腔インプラント研究会 創立 30 周年記念例会 招待講演シンポジウム「組織再生の最前線」/2016 年 11 月 13 日/大阪市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

奥山 弥生 (OKUYAMA, Yayoi)  
東北大学・大学病院・助教  
研究者番号: 30223697

##### (2) 研究分担者

江草 宏 (EGUSA, Hiroshi)  
東北大学・歯学研究科(研究院)・教授  
研究者番号: 30379078

##### (3) 研究分担者

新部 邦透 (NIIBE, Kunimichi)  
東北大学・大学病院・助教  
研究者番号: 50468500

##### (4) 連携研究者

0 ( )

##### (5) 研究協力者

0 ( )