

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11185

研究課題名(和文)インプラント周囲の硬組織・歯周組織複合体への再生誘導

研究課題名(英文) Induction of regeneration to hard tissue / periodontal tissue complex around the implant

研究代表者

楠本 哲次 (KUSUMOTO, Tetsuji)

大阪歯科大学・医療保健学部・教授

研究者番号：70186394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、インプラント埋入周囲組織の歯周組織の再生方法として、エムドゲインの主要タンパク質の一つであるアメロジェニンをスピンコート法によりコーティングすることで、更なる硬組織分化誘導を促す新規インプラント材料の創製を目指したところ、濃アルカリ処理を施した純チタン金属表面へのアメロジェニンのコーティングがin vitroおよびin vivoレベルでインプラント埋入周囲組織の硬組織分化誘導に大きな影響を与えることを明らかにした。また、この硬組織はセメント質である可能性が遺伝子解析から明らかでこの新規材料は硬組織および軟組織を同時再生できる材料として期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop new implant materials aiming at the regeneration of periodontal tissues as well as hard tissues by coating nano-modified titanium with amelogenin, which is one of main proteins contained in Emdogain®. We confirmed by quartz crystal microbalance evaluation that amelogenin is easy to adsorb onto the nano-modified titanium surface as a coating. Scanning electron microscopy, scanning probe microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, and Fourier-transform infrared spectroscopy analyses confirmed that amelogenin coated the nano-modified titanium surface following alkali-treatment. In vitro evaluation using rat bone marrow and periodontal ligament cells revealed that the initial adhesion of both cell types and the induction of hard tissue differentiation such as cementum were improved by amelogenin coating. Additionally, the formation of new bone in implanted surrounding tissues was observed in in vivo evaluation using rat femurs.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：ナノ材料 インプラント アメロジェニン

1. 研究開始当初の背景

近年、歯科治療においてインプラント治療にも QOL の概念が浸透し、快適性、審美性、咀嚼満足度が強く求められるようになってきた。我々は今まで、インプラントが良好な咬合状態を維持するための検査について長く検討してきた。しかし、顎骨内に埋入されたインプラントがその良好な咬合状態を維持するためには、埋入後の初期安定性と二次安定性の獲得が重要であり、このことが長期的に安定し咀嚼機能を維持できるオッセオインテグレーション獲得へとつながっていく。申請者は、純チタン金属を 10M の水酸化ナトリウム水溶液に室温で 24 時間浸漬することで純チタン金属表面にナノ構造が析出することを明らかにし、*in vitro* レベルで本構造が SD 系ラットの骨髄間葉系細胞の培養開始 3 日後の Runx2 mRNA の発現および培養開始 14, 21 日後 ALP 活性、培養開始 2 日後の Ca 量、Osteocalcin 量の値を有意に上昇させ硬組織誘導能を向上させる可能性を示唆した。また、同構造はラットの下大動脈より抽出した血管内皮細胞の初期接着および遺伝子発現、および管腔形成能を向上させ、インプラント埋入周囲組織の微小血管構築にも有用であることを報告した。本構造はインプラントの初期固定時に優れた構造であることが推察される。また、純チタン金属板を SD 系ラットの大腿骨に埋入後、術後 3, 4 週の純チタン金属板周囲の組織を切り出し、HE 染色を行い病理組織学的観察および骨接触率を求めたところ、TNS 表面ではチタンプレート周囲に著明な新生骨骨梁が形成され、高い骨接触率を示し、*in vivo* レベルにおいても有用であるという結果を示した。

インプラント周囲組織の歯周組織再生に期待されるものとしてエムドゲイン (EMD) が臨床応用されている。しかし、EMD はヒト由来ではないことより、患者からの拒否感も否めない。そこで、EMD 含有の主要なタンパク質の一つであるアメリロジェニンに着目し、ヒト歯根膜細胞への応用を検討したところ、該当細胞の増殖・遊走能および各種遺伝子の発現また硬組織誘導能の向上に寄与することを明らかとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ナノレベルでの表面構造制御およびアメリロジェニンの応用により早期の硬組織形成および歯周組織早期再生を促し、オッセオインテグレーションの期間を短縮させる新規インプラント材料の創製を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 試料作製

実験材料として TNS を析出させた市販の JIS2 級金属板 (直径 15mm, 厚さ 10mm) を使用し、実験群としてアメリロジェニンをコーティングした同材料、対照群を無処理の TNS

析出純チタン材料とした。TNS の析出には、各試料を 10M 水酸化ナトリウム水溶液に浸漬し、攪拌した状態で室温および大気圧条件下で 24 時間反応させた。反応後、試料を取り出し、イオン交換水にて導電率が 5 μ S/cm 以下になるまで洗浄を行った。その後、自然乾燥させ、純チタン金属表面に TNS を析出させた。その後、実験試料をアメリロジェニンに 37 $^{\circ}$ C で 3 時間浸漬した。

(2) 表面解析

試料の微細構造の観察には、実験群および対照群の純チタン金属表面を走査型電子顕微鏡 (SEM, S-4000, 島津)、走査型プローブ顕微鏡 (SPM, SPM-9600, 島津) を使用して X, Y および Z 方向に 2 μ m の範囲をスキャンした。試料表面における元素分析を X 線電子分光分析装置 (XPS, PHI x-tool, アルバックファイ) にて行い、元素の結合状態をフーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR, アルバックファイ) にて解析した。各種 QCM センサ表面におけるタンパク質の吸着挙動について分子間相互作用定量 QCM 装置 (INITIUM 社製 AFFINIX QN μ ユニット型) を用いて比較検討を行った。評価対象はアメリロジェニンを用いた。

(3) 細胞培養

生後 8 週齢の SD 系雄性ラットの両側大腿骨から、骨髄間葉細胞を採取した。本研究は、大阪歯科大学動物実験委員会の承認を得て行った。骨髄間葉細胞の初代培養を確立、継代し 3 代目を実験に共試した。培地を分化誘導培地に交換し、分化誘導を開始した。細胞を 37 $^{\circ}$ C, 5 %CO₂ を含む加湿条件下で培養した。細胞はコン플レントに達するまで、各試料上で培養した。また、Lonza より歯根膜線維芽細胞を購入し、Lonza 社製の各種培養キットを使用し、歯根膜細胞の初代培養を確立、継代し 3 代目を実験に供試した。

(4) 接着試験および増殖試験

実験群および対照群の純チタン金属板を 24well プレート (Falcon, Becton Dickson Labware, NJ, USA) に配置し、ラット骨髄細胞を 4 \times 10⁴ 個/ml ずつ播種し、1, 3, 8, 24 および 72 時間それぞれ培養し、各培養後の細胞増殖について CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA) を用いて測定した。

(5) ALP 活性

培養開始 7 および 14 日後における各々の培養細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、0.2 % トライトン (Sigma, St. Louis, MO, USA) にて抽出・溶解した。ALP 活性の測定には、Alkali Phosphatase Luminometric ELISA Kit® (Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いメーカー指示に従い ALP 活性の測定を行った。DNA の定量を、the Pico green Double

standard DNA Assay Kit (DS ファーマバイオメディカル, 大阪, 日本) を用いメーカー指示に従って行った. DNA の定量後, DNA の定量あたりの ALP 活性を算出した.

(6) カルシウム析出量

培養 21 および 28 日後における細胞外マトリックスに析出したカルシウム量を 10 %ギ酸にて抽出した. カルシウム析出量は, Calcium E-test Kit (和光純薬, 東京, 日本) を用いて定量した.

(7) OCN 産生量

本研究で用いた ELISA Kit (DS ファーマバイオメディカル, 大阪, 日本) は, 細胞培養上清中で直接 OCN 産生量を測定するラット OCN に特異的な検査薬である. 培養の 21 および 28 日後に, 細胞培養上清中の OCN 産生量は, メーカー指示に従って測定した.

(8) 骨形成に関する遺伝子の発現

実験群および対照群のナノジルコニア表面上の培養 3 日後の培養細胞より逆転写後, mRNA を抽出し, アプライドバイオシステム社製 StepOne Plus™ Real-Time PCR System を用いて実験群と対照群における骨形成に関する遺伝子のマーカーについて比較検討した.

(9) in vivo 評価

実験群および対照群の純チタン金属スクリューを生後 8 週齢の SD 系雄性ラットの大腿骨に埋入後 8 週間生育した後安楽死させ, 大腿骨を摘出後, Micro-CT により CT 画像を撮影した. 1 週後にテトラサイクリン, 4 週後にアリザリンレッド, 8 週後にカルセインを注射し, 埋入後 8 週間生育した後安楽死させ, 大腿骨を摘出後, 通常法に従い, 10%中性緩衝ホルマリンによる灌流固定後に大腿骨を一塊として摘出した. 採取した大腿骨をスクリュー挿入部に沿って, 矢状断方向の約 5-7 μ m の厚さの切片を作製し, Villanueva 染色を行い, 組織学的観察を行った. また解析項目は BA, BIC, LBA とした.

4. 研究成果

(1) 表面解析

各種表面解析の結果から, TNS 析出純チタン表面上にアメロジェニンがコーティングされていることが明らかとなった. (図 1-3) また, QCM 解析の結果から, ナノ構造はアメロジェニンを吸着しやすいということが明らかとなった.

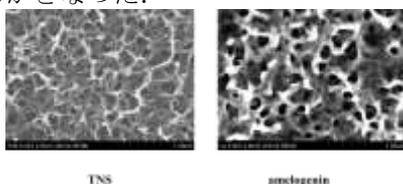


図 1 SEM 像

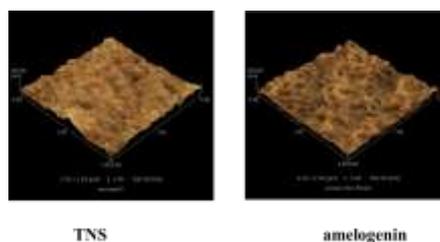


図 2 SPM 像

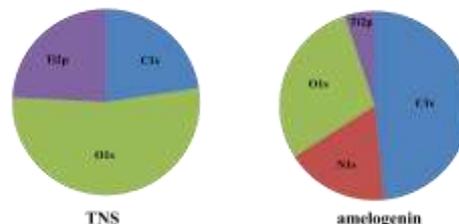


図 3 XPS 解析結果

(2) 細胞接着および増殖

すべての計測時間で, 細胞接着および増殖量は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した.

(3) ALP 活性

すべての計測時間で, ALP 活性は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した.

(4) カルシウム析出量

すべての計測時間で, カルシウム析出量は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した.

(5) OCN 産生量

すべての計測時間で, OCN 産生量は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した.

(6) 骨形成に関与する遺伝子マーカーの発現

すべての計測時間で, 骨形成に関与する遺伝子マーカーの発現量は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した. また, 歯根膜細胞を利用した実験では, cemp-1 の遺伝子の高い発現を認め, この硬組織はセメント質である可能性が認められた.

(7) in vivo 評価

すべての計測データにおいて実験群で対照群より統計学的に有意に高い値を示した. これは実験群で硬組織の形成量が多いことを示している.

以上の結果により, 濃アルカリ処理を施した純チタン金属表面へのアメロジェニンのコーティングがインプラント埋入周囲組織の硬組織および軟組織の複合形成に大きな影響を与えることを明らかにした.

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 7 件)

1. Komasa S, Nishizaki M, Kusumoto T, Terada C, Yin D, Kawamoto A, Yamamoto S, Yoshimine S, Nishizaki H, Shimizu H, Okazaki J, Kawazoe T. Osteogenesis-Related Gene Expression on Alkali-Modified NANOZR and Titanium Surfaces with nanonetwork Structures. *バイオインテグレーション学会雑誌* 査読有 7:87-94,2017.
2. Kusumoto T, Yin D, Zhang H, Chen L, Nishizaki H, Komasa Y, Okazaki J, Komasa S. Evaluation of the Osteointegration of a Novel Alkali-Treated Implant System In Vivo. *Journal of Hard Tissue Biology* 査読有 26(4):355-360, 2017.
3. Su Y, Komasa S, Li PQ, Nishizaki M, Chen L, Terada C, Yoshimine S, Nishizaki H, Okazaki J. Synergistic effect of nanotopography and bioactive ions on peri-implant bone response. *International Journal of Nanomedicine* 査読有 12:925-934, 2017.
4. Komasa S, Satoh W, Naito D, Nishizaki M, Zhang H, Nakai K, Kusumoto T, Yoshimine S, Kon-I H, Takahashi K, Nishizaki H, Komasa Y, Okazaki J. Impact of clinical experience on the attitude of dentists toward nonmetal clasp dentures. *Journal of Osaka Dental University* 査読有 50(2):85-92, 2016.
5. Komasa S, Miyake A, Fujio M, Nishizaki M, Taguchi Y, Kusumoto T, Okajima Y, Yoshioka K, Yoshimine S, Yamamoto S, Onchi Y, Kon-I H, Nishizaki H, Okazaki J. Influence of titanium surface topography on in vitro differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblasts. *バイオインテグレーション学会雑誌* 査読有 6:17-26, 2016.
6. Komasa S, Su Y, Taguchi Y, Yamawaki I, Tsutsumi Y, Kusumoto T, Nishizaki H, Miyake T, Umeda M, Tanaka M, Okazaki J. Bioactivity of titanium surface nanostructures following chemical processing and heat treatment. *Journal of Hard Tissue Biology* 査読有 24(3): 257-266, 2015.
7. Komasa S, Taguchi Y, Nakazawa Y, Kusnoki T, Tashiro Y, Kusumoto T, Nishizaki H, Komasa Y, Okazaki J. Effect of a nanosheet surface structure of titanium on initial attachment of cells. *日本口腔リハビリテーション学会雑誌* 査読有 28(1):1-10, 2015.

[学会発表] (計 15 件)

1. 寺田知里, 小正 聡, 楠本哲次, 西崎 真理子, Chen L, Yin D, 波床 真依, 藤原到, 吉峰茂樹, 西崎 宏, 小正 裕, 岡崎定司. アメロジェニンコーティングナノ構造析出純チタン金属がインプラント埋入周囲組織

に与える影響について

平成 29 年度日本補綴歯科学会関西支部総会ならびに学術大会

2018 年 1 月 21 日

京都市歯科医師会館 (京都府京都市)

2. 寺田知里, 小正 聡, 楠本哲次, Chen L, 波床真依, Yin D, 西崎 宏, 岡崎定司. アメロジェニンコーティングナノ構造析出純チタン金属がインプラント埋入周囲歯周組織に与える影響

第 15 回日本再生歯科医学会大会

2017 年 10 月 21 日

大阪歯科大学 100 周年記念館 (大阪府大阪市)

3. 楠本哲次, 小正 聡, 寺田知里, Chen L, 西崎 宏, 田口洋一郎, 岡崎定司, 小正 裕. タンパク質をコーティングしたナノ構造析出純チタン金属の生体適合性について

第 47 回日本口腔インプラント学会学術大会

2017 年 9 月 24 日

仙台国際センター (宮城県仙台市)

4. 小正 聡, 楠本哲次, Zhang H, Chen L, 小正 裕, 西崎 宏, 岡崎定司.

歯根膜細胞がタンパク質をコーティングしたナノ構造析出純チタン金属のインプラント材料へ与える影響について

第 47 回日本口腔インプラント学会学術大会

2017 年 9 月 24 日

仙台国際センター (宮城県仙台市)

5. 寺田知里, 小正 聡, 楠本哲次, Chen L, Yin D, 波床真依, 西崎 宏, 岡崎定司.

アメロジェニンコーティングナノ構造析出純チタン金属板が骨髄細胞および歯根膜細胞の初期接着に与える影響について

第 47 回日本口腔インプラント学会学術大会

2017 年 9 月 24 日

仙台国際センター (宮城県仙台市)

6. 寺田知里, 小正 聡, 楠本哲次, 西崎真理子, Su Y, Zhang H, Chen L, 西崎 宏, 岡崎定司

ナノ構造析出純チタンへのタンパク質のコーティングが硬組織分化誘導能に与える影響

日本補綴歯科学会第 126 回学術大会

2017 年 7 月 1 日

パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

7. Zhang H, Komasa S, Su YM, Mashimo C, Kusumoto T, Wang PL, Wanghong Zhao, Nishizaki H, Okazaki J

Antibacterial effect of silver nanoparticles coated titanium nanosheet

The 95th General Session and Exhibition of the IADR

2017 年 3 月 24 日

Moscon West, San Francisco, USA

8. 寺田知里, 小正 聡, 楠本哲次, 西崎 宏, 岡崎定司

タンパク質のコーティングがナノ構造析出純チタン金属表面の硬組織分化誘導能に与える影響について

日本口腔インプラント学会 第 36 回近畿・

北陸支部学術大会
2016年12月18日
富山国際会議場（富山県富山市）
9. 西崎真理子, 小正 聡, 藤尾美穂, 寺田知里, 楠本哲次, 西崎 宏, 田中昌博, 岡崎定司
ナノ構造析出純チタン金属表面に対する細菌付着の検討
第30回日本口腔リハビリテーション学会学術大会
2016年11月20日
京都市国際会館（京都府京都市）
10. 小正 聡, 田口洋一郎, 楠本哲次, 岡島裕梨, 吉岡紀代子, 篠原憲吾, 武田智香子, 西崎 宏, 岡崎定司.
糖尿病状態が TNS 析出純チタン金属表面に及ぼす影響について
第23回日本歯科医学会総会
2016年10月21日
福岡市国際会議場（福岡県福岡市）
11. 小正 聡, 西崎真理子, 田口洋一郎, 楠本哲次, 佐藤 航, 寺田知里, 西崎 宏, 岡崎定司.
濃アルカリ処理を行った新規インプラント材料の生体適合性
第46回日本口腔インプラント学会学術大会
2016年9月17日
名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）
12. 藤尾美穂, 小正 聡, Su Y, 西崎真理子, 楠本哲次, 関野 徹, 西崎 宏, 岡崎定司.
加熱処理ナノ構造析出純チタン金属が骨髄細胞の初期接着能に与える影響について
日本補綴歯科学会第125回学術大会
2016年7月9日
石川県立音楽堂（石川県金沢市）
13. 小正 聡, 田口洋一郎, 西崎真理子, 楠本哲次, 西崎 宏, 岡崎定司.
チタン合金への濃アルカリ処理が硬組織形成誘導に与える影響について
第29回日本口腔リハビリテーション学会学術大会
2015年11月15日
徳島大学長井記念ホール（徳島県徳島市）
14. 小正 聡, 田口洋一郎, Su Y, 藤尾美穂, 西崎真理子, 内藤大介, 楠本哲次, 西崎 宏, 岡崎定司.
グルコース濃度の変化が TNS 析出純チタン金属表面に及ぼす影響について.
平成27年度日本補綴歯科学会関西支部学術大会
2015年11月7日
兵庫医療大学（兵庫県神戸市）
15. 小正 聡, 田口洋一郎, 楠本哲次, 西崎宏, 岡崎定司.
純チタン金属表面に析出されたナノ構造への加熱処理がラットの骨髄細胞の硬組織分化誘導に与える影響について.
第45回日本口腔インプラント学会学術大会
2015年9月23日
ホテルグランヴィア岡山（岡山県岡山市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠本 哲次 (KUSUMOTO, Tetsuji)
大阪歯科大学・医療保健学部・教授
研究者番号：70186394

(2) 研究分担者

田口 洋一郎 (TAGUCHI, Yoichiro)
大阪歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：60434792

小正 聡 (KOMASA, Satoshi)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：70632066