

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15741

研究課題名(和文) オッセオインテグレーションとバイオインテグレーションの本質を細胞サイドから探る

研究課題名(英文) We investigate the essence of osseointegration and biointegration in the cell

研究代表者

宮本 洋二 (MIYAMOTO, Youji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・教授

研究者番号：20200214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：チタン、金およびステンレスをコーティングしたガラスディッシュ上で、ヒト骨髄間葉系幹細胞およびマウス骨芽細胞様細胞を培養し、遺伝子およびマイクロRNAの発現を比較検討した。ヒト骨髄間葉系幹細胞では、ガラス、金、ステンレス上で培養した3群に比較してチタン上で培養すると、2倍以上の発現上昇を示した2遺伝子と5 miRNA、2分の1以下に発現低下した2 遺伝子と2 miRNAを同定した。また、マウス骨芽細胞様細胞では、20倍以上の発現上昇を示した20遺伝子と1.5倍以上発現が上昇した2 miRNA、0.3倍以下の発現低下を示した8遺伝子と0.7倍以下の発現低下を示した14 miRNAを同定した。

研究成果の概要(英文)：Human mesenchymal stem cell (h-MSC) and MC3T3-E1cells were cultured on the glass dishes which were coated by titanium, gold or stainless steel. And the change of the genes and micro RNA (miRNA) expressions by cell cultures on those different dishes were analyzed by the microarray assay. We identified 2 genes and 5 miRNA in h-MSC cultured on titan coated dishes more than twice expression as comparison with cell cultured on other dishes. We also found the half or less expression of 2 genes and 2 miRNA decreased by cell culture on titan coated dishes. Similarly, in MC3T3-E1cells, we identified genes and miRNA related with cell attachment on titan.

研究分野：生体材料

キーワード：イオンプレーティング法 マイクロアレイ解析 マウス骨芽細胞様細胞 ヒト骨髄間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

チタンインプラントは、オッセオインテグレーションすることによって、高い成功率が得られている。しかし、オッセオインテグレーションの定義は、「生活を営む骨組織とインプラント体が光学顕微鏡レベルで直接密着し、加わった力が骨に直接伝達されて機能を維持する」と非常に曖昧である。チタンがなぜオッセオインテグレーションしやすいのか、細胞が何を認識してオッセオインテグレーション開始を決定するかは解明されていない。

生体材料学から、チタンがオッセオインテグレーションしやすい理由として、

(1)チタンは安定な酸化膜 (TiO₂) を有する。
 (2)リン酸カルシウムの析出促進作用がある。
 (3)骨関連タンパク質の吸着作用がある。
 が挙げられている。しかし、チタンと同様に安定な酸化膜を形成するコバルトクロム合金 (Cr₂O₃ の形成) や酸化物そのものであるアルミナ (Al₂O₃) はオッセオインテグレーションしにくい。また、リン酸カルシウムの析出促進作用や骨関連タンパク質の吸着作用は、オッセオインテグレーションした界面を現象論的に捉えた結果であり、その機序は、チタンの最表層に多数存在する塩基性水酸基 (Terminal OH、+ に荷電) が - に荷電したタンパク質と直接結合するためと考えられているが、表面に Terminal OH を有する金属は他にも多く、その殆どはオッセオインテグレーションしないという矛盾がある。これらの研究は材料の物理学的な特徴を捉えているが、細胞がどのようにオッセオインテグレーションする、しないを決定しているかという細胞サイドの情報はない。

細胞サイドからは、最近、マイクロアレイを使って遺伝子発現を解析する研究が幾つか報告されている (Thalji et al. Early molecular assessment of osseointegration, Clin Oral Implants Res, 2014)。しかし、その多くは埋入したインプラントの周囲の組織をサンプルとして用いている。この方法では、線維芽細胞などの混入が避けられず、混入している細胞種の割合によって結果が異なっている。何がオッセオインテグレーションを反映しているのか、オッセオインテグレーションのメカニズムは不明である。

そこで、本研究においては、

表面粗さだけでなく、表面形状が同じで、材質だけが異なる試料を作成する。そのためには、ナノオーダーで金属やハイドロキシアパタイトをコーティングできるスパッタ法が有用である。

オッセオインテグレーションが最も典型的に現れるのは皮質骨ではなく、海綿骨部分であるため、骨髄細胞をターゲットにして、

さらに均質な培養骨髄間葉系幹細胞を用いる。

上記の2点に着目して、遺伝子とマイクロRNAのマイクロアレイ解析を行えば、細胞サイドからみたオッセオインテグレーションの解明に繋がると発案している。

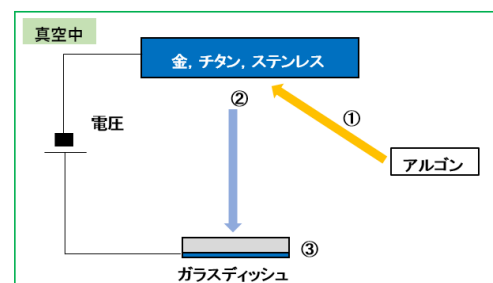
2. 研究の目的

チタン製インプラントは、骨とオッセオインテグレーションすることによって、高い成功率が得られる。しかし、オッセオインテグレーションについては材料学の立場から、チタンの物性的研究があるだけで、細胞が何を認識してオッセオインテグレーションを引き起こすかについての情報は解明されていない。そこで、本研究では、表面粗さや表面形状が全く同じで、材質だけが異なる試料を作成し (チタン、金およびステンレス)、この上でヒト骨髄間葉系幹細胞およびマウス骨芽細胞様細胞を培養し、遺伝子およびマイクロRNAの発現をマイクロアレイにて解析し、オッセオインテグレーションの初期段階における細胞の分子メカニズムを解明することを目的とした。さらに、候補遺伝子およびマイクロRNAに対して機能阻害実験を行い、それらの生理学的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 表面荒さおよび表面形状が同じで、材質だけが異なるディスク状の試料の作製

スパッタ法を用いて (図1)、ガラスディッシュ (径 105mm フラットシャーレ アズワン社製) を、チタン、金、ステンレスでコーティングしたディッシュを作製した (株) 協同インターナショナルで作製)。作製したディッシュの表面形態は走査電子顕微鏡「S-3400N」 (日立ハイテクノロジーズ社) で観察し、表面粗さは3Dレーザーマイクロスコープ「VK-9700」 (KEYENCE社) で測定した。



- ① 不活性な物質 (アルゴン) を金・チタン・ステンレスにそれぞれ衝突させる。
- ② 金、チタン、ステンレスを構成する原子や分子が飛散される。
- ③ スパッタ粒子が基板に付着し、膜が形成される。

図1 スパッタ法

(2) 4種類のディッシュ上で培養したヒト骨髄間葉系幹細胞の遺伝子およびマイクロRNA発現の網羅的検索
 細胞培養

ヒト骨髄間葉系幹細胞 (Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow) (hMSC-BM) (Promo Cell 社) を Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (Promo Cell 社) を用いて、チタン、金、ステンレス (316L)、ガラスの4種類のディッシュ上で、37℃、5%CO₂条件下で培養した。6時間後に、TRIzol RNA Isolation Regants (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。

マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は、Gene Chip Human Gene 2.0 ST Array (Affymetrix 社)、Gene Chip miRNA 4.0 Array (Affymetrix 社) を用いて行った。

(3) 4種類のディッシュ上で培養したマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) のマイクロ RNA 発現の網羅的検索

細胞培養

マウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) (RIKEN 社) を MEM 培地 (10 % FBS 添加) (ナカライテスク社) を用いて、チタン、金、ステンレス (316L)、ガラスの4種類のディッシュ上で、37℃、5%CO₂条件下で培養した。6時間後に、TRIzol RNA Isolation Regants (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。

マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は、3D Gene Mouse miRNA Oligo chip (東レ社製) を用いて行った。

で選定した候補となったマイクロ RNA の発現定量

候補 miRNA は、TaqMan® Small RNA assays (Invitrogen) で逆転写し、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System と TaqMan® MicroRNA Assays によるリアルタイム PCR 法にて発現を定量した。

(4) 統計的解析法

得られたデータは平均値 ± 標準偏差で表記し、Student's *t* 検定を用いて有意差検定を行い、*p* < 0.05 を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) チタン、金、ステンレスでコーティングしたディッシュの表面形態と粗さ

表面形態

作製したディッシュ (チタン、ステンレス、金) とガラスの表面形態は走査電子顕微鏡「S-3400N」 (日立ハイテクノロジーズ社) で観察したところ、いずれもほぼ同一であった (図2)。

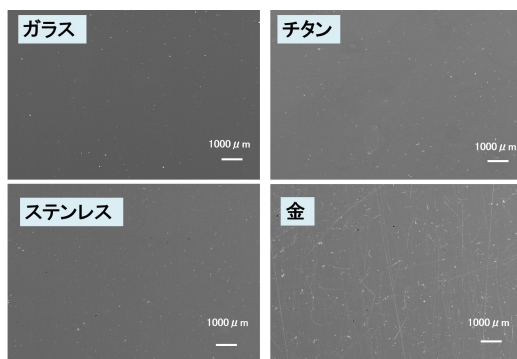


図2 ガラス、チタン、ステンレス、金の表面形態

表面粗さ

作製したディッシュ (チタン、ステンレス、金) とガラスの表面粗さは、試料を 1cm × 1cm に切断し、それを 9 領域に分割して、3D レーザーマイクロスコープ「VK-9700」 (KEYENCE 社) で測定した。チタン、金、ステンレスの表面粗さに有意差はなく、ガラスはやや小さかった (図3)。

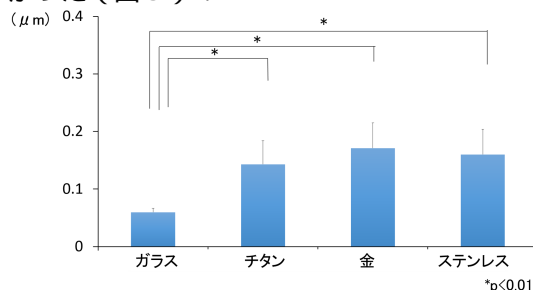


図3 ガラス、チタン、ステンレス、金の表面粗さ

(2) 4種類のディッシュ上で培養したヒト骨髄間葉系幹細胞の遺伝子およびマイクロ RNA 発現の網羅的検索

ガラス、金、ステンレス上での培養に比較して、チタン上での培養で2倍以上に発現上昇した11遺伝子 (既知の2遺伝子) と6マイクロ RNA (既知の5マイクロ RNA)、1/2以下に発現が低下した6遺伝子 (既知の2遺伝子) と5マイクロ RNA (既知の3マイクロ RNA) を同定した (図4)。

これらの遺伝子およびマイクロ RNA がオッセオインテグレーション獲得に関与している可能性が考えられた。

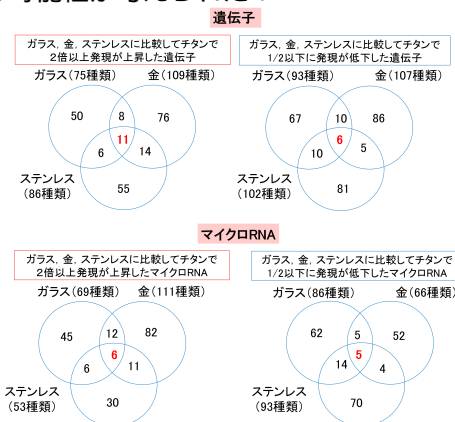


図4 4種類のディッシュ上で培養したヒト骨髄間葉系幹細胞の遺伝子およびマイクロRNA発現

(3) 4種類のディッシュ上で培養したマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) のマイクロRNA発現の網羅的検索

ガラス, 金, ステンレス上での培養に比較して, チタン上での培養が1.5倍以上に発現上昇した2マイクロRNA, 2/3以下に発現が低下した14マイクロRNAを同定した(図5)。

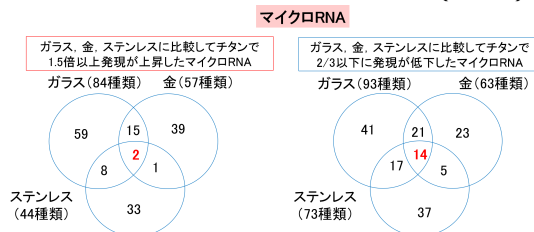


図5 4種類のディッシュ上で培養したマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) のマイクロRNA発現

(4) (3)で選定した候補となったマイクロRNAの発現定量

その候補となった mmu miR155-5p の定量では, ガラス, 金, ステンレス上での培養に比較して, チタン上での培養が有意に低下していた(図6)。

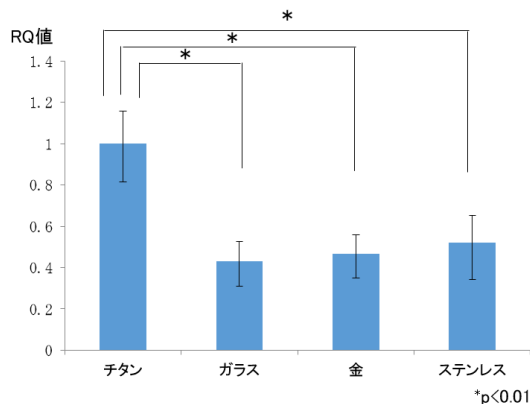


図6 候補となったマイクロRNAの発現定量

このマイクロRNAがオッセオインテグレーション獲得に関与している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計 10件)

(1) Takahashi A, Sugawara C, Kudoh T, Ohe G, Takamaru N, Tamatani T, Nagai H, Miyamoto Y. Prevalence and imaging characteristics of palatine tonsilloliths evaluated on 2244 pairs of panoramic radiographs and CT images. Clin Oral Investigations 査読有 21(1): 2017,85-91.

(2) Kudoh K, Kudoh T, Tsuru K, Miyamoto Y. A case of tophaceous pseudogout of the temporomandibular joint extending to the

base of the skull. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 査読有 46(3): 2016, 355-359.

(3) 藤澤健司, 大江 剛, 永井宏和, 安陪 晋, 宮本洋二. 上顎洞底挙上術を併用したインプラントの3年経過後の臨床的評価 日本口腔インプラント学会誌 査読有 29(3): 2016, 22-27.

(4) Hara K, Fujisawa K, Nagai H, Takamaru N, Ohe G, Tsuru K, Ishikawa K, Miyamoto Y. Fabrication and Physical Evaluation of Gelatin-Coated Carbonate Apatite Foam. Materials 査読有 9(9): 2016, 711.

(5) 山村佳子, 藤澤健司, 鎌田久美子, 高丸菜都美, 工藤景子, 大江 剛, 工藤隆治, 高橋 章, 玉谷哲也, 永井宏和, 宮本洋二. 口腔がん患者の歯科疾患罹患状況 日本歯科人間ドック学会誌 査読有 11(1): 2016, 29-32.

(6) 宮本洋二, 玉谷哲也, 大江 剛, 高丸菜都美, 工藤景子, 山村佳子, 藤澤健司, 永井宏和. 新しい外科の概念と手術手技の進歩 Journal of Oral Health and Biosciences 査読有 29(1): 2016, 7-12.

(7) N. Takamaru, H. Nagai, G. Ohe, T. Tamatani, K. Sumida, S. Kitamura, Y. Miyamoto. Measurement of the zygomatic bone and pilot hole technique for safer insertion of zygomatic implants. Int J Oral Maxillofac Surg 査読有 45: 2016, 104-109.

(8) 山本修史, 藤澤健司, 大江 剛, 永井宏和, 宮本洋二. インプラントの表面性状がオッセオインテグレーション喪失に及ぼす影響: 滑面(機械加工面)と粗面(陽極酸化面)インプラント体の比較 日本口腔インプラント学会誌 査読有 28(3): 2015, 18-25.

(9) 藤澤健司, 大江 剛, 永井宏和, 安陪 晋, 宮本洋二. インプラント体の表面性状の違いが周囲骨吸収に及ぼす影響: 埋入後5年経過時の同一患者の隣接するインプラント体により比較 日本口腔インプラント学会誌 査読有 28(3): 2015, 12-17.

(10) Nagai H, Kobayashi-Fujioka M, Fujisawa K, Ohe G, Takamaru N, Hara K, Uchida D, Tamatani T, Ishikawa K, Miyamoto Y. Effects of low crystalline

carbonate apatite on proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow cells. J Mater Sci Mater Med 査読有 26(2): 2015, 99.

【学会発表】(計 15件)

(1) 大江 剛, 藤澤健司, 永井宏和, 宮本洋二. 低結晶性炭酸アパタイトを用いた骨再建に関する基礎的研究 (第20回公益社団法人日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会 2016.12.3-4 東京医科歯科大学 M&Dタワー 東京都・文京区)

(2) 山村佳子, 玉谷哲也, 大江 剛, 藤澤健司, 高丸菜都美, 工藤景子, 永井宏和, 宮本洋二. チタン上で培養したヒト骨髄間葉系幹細胞の遺伝子および microRNA 発現の解析 (第61回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会 2016.11.25-27 幕張メッセ 千葉県・幕張市)

(3) 山村佳子, 玉谷哲也, 大江 剛, 藤澤健司, 高丸菜都美, 工藤景子, 永井宏和, 宮本洋二. チタンが培養ヒト骨髄間葉系幹細胞に及ぼす影響 -マイクロアレイによる解析-(日本バイオマテリアル学会 シンポジウム 2016 2016.11.21-22. 福岡国際会議場 福岡県福岡市)

(4) 玉谷哲也, 高丸菜都美, 永井宏和, 宮本洋二. 口腔扁平上皮癌における SOX2 発現の臨床病理学的意義 (第75回日本癌学会学術大会総会 2016.10.6-8 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市)

(5) 藤澤健司, 永井宏和, 高丸菜都美, 都留寛治, 石川邦夫, 宮本洋二. 低結晶性炭酸アパタイトのインプラント領域への応用 -イヌ顎骨へのインプラント体との同時埋植- (第46回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会 2016.9.16-18 名古屋国際会議場 愛知県・名古屋市)

(6) 大江 剛, 小林真左子, 藤澤健司, 永井宏和, 宮本洋二. 炭酸アパタイト被膜炭酸カルシウムを用いた新規骨置換材料による骨再生の試み (第46回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会 2016.9.16-18 名古屋国際会議場 愛知県名古屋市)

(7) Tamatani T, Takamaru N, Fujisawa K, Nagai H, Miyamoto Y. Expression of ALDH1, Bmi-1 and CD24 in human oral squamous cell carcinoma and its relationship with clinical factors (AACR Annual Meeting 2016 2016.4.16-20 USA・New Orleans)

(8) 大江 剛, 鎌田久美子, 藤澤健司, 永井宏和, 宮本洋二. 低結晶性炭酸アパタイトを用いた骨再生療法に関する基礎的研究 (第19回日本顎顔面インプラント学会学術大会 2015.11.28-29 ホテルメルキュール 横須賀 神奈川県・横須賀市)

(9) 藤澤健司, 永井宏和, 高丸菜都美, 大江 剛, 都留寛治, 石川邦夫, 宮本洋二. ゼラチン複合型炭酸アパタイトフォームの物理学的評価 (第37回日本バイオマテリアル学会大会 2015.11.9-10 京都テルサ 京都府・京都市)

(10) 藤澤健司, 大江 剛, 高丸菜都美, 玉谷哲也, 山村佳子, 工藤景子, 永井宏和, 宮本洋二. 上顎洞底挙上術を併用したインプラントの予後に関する臨床的検討 (第63回 NPO 法人日本口腔科学会中国・四国地方部会 2015.11.7 岡山大学 J-Hall 岡山県・岡山市)

(11) 永井宏和, 藤澤健司, 大江 剛, 小林真左子, 高丸菜都美, 工藤隆治, 玉谷哲也, 宮本洋二. 低結晶性炭酸アパタイトの骨再建への応用 第1報 イヌ歯槽骨欠損部への移植 (第60回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会 2015.10.16-18 名古屋国際会議場 愛知県・名古屋市)

(12) 玉谷哲也, 高丸菜都美, 大江 剛, 永井宏和, 宮本洋二. 口腔扁平上皮癌における CD44, ABCG2 および ALDH1 の発現に関する検討 (第60回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会 2015.10.16-18 名古屋国際会議場 愛知県・名古屋市)

(13) 玉谷哲也, 高丸菜都美, 大江 剛, 永井宏和, 宮本洋二. 口腔癌における Bmi-1 と CD24 発現の臨床病理学的意義 (第74回日本癌学会学術総会 2015.10.8-10 名古屋国際会議場 愛知県・名古屋市)

(14) 永井宏和, 藤澤健司, 都留寛治, 石川邦夫, 宮本洋二. 低結晶性炭酸アパタイトの骨再建への応用 イヌ顎骨に作製した骨欠損部への移植 (第45回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会 2015.9.21-23 岡山コンベンションセンター 岡山県・岡山市)

(15) 宮本洋二. 外科の新しい概念および手術手技 (四国歯学会第47回例会 2015.6.25 徳島大学歯学部 徳島県・徳島市)

【図書】(計 1件)

(1)宮本洋二,福田雅幸.永末書店 日本口腔
ケア学会編,口腔ケア基礎知識 口腔ケア 4
級・5級認定資格基準準拠 「歯ぎしりがひ
どい高齢者への対応」2017,361(335-336).

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮本 洋二 (MIYAMOTO, Youji)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (歯学
系)・教授
研究者番号: 20200214

(2)研究分担者

玉谷 哲也 (TAMATANI, Tetsuya)
徳島大学・病院・講師
研究者番号: 30274236

高丸 菜都美 (TAKAMARU, Natsumi)
徳島大学・病院・助教
研究者番号: 40513031

永井 宏和 (NAGAI, Hirokazu)
東北大学・歯学研究科・准教授
研究者番号: 50282190

大江 剛 (OHE, Go)
徳島大学・病院・助教
研究者番号: 60432762