

令和元年6月13日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11635

研究課題名(和文) CXCL12を利用した創傷治癒促進能をもつ再生医療材料の開発

研究課題名(英文) Development of regenerative medical materials with the ability to promote wound healing using CXCL12.

研究代表者

三浦 直 (MIURA, TADASHI)

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：10266570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：創傷治癒の因子に着目、チタンインプラントの表面改質により量的に変動する物質の探索を行った。静脈血をチタン上で培養、RNAを抽出し、サイトカイン検出をした。数種遺伝子が確認できた。表面処理チタンと接触すると、発現量上昇する遺伝子があった。創傷治癒反応の中心を担うヒトSDF1を、遺伝子組換えで大量生産を試みた。最終的に組換えタンパク精製品を取得できた。表面処理法を用いインプラント周囲炎の関連細菌の付着を検討した。チタンとジルコニアで細菌付着に相違があることを発見した。今後、組換え体を用い創傷治癒を促進する表面改質法を探索する一方、周囲炎関連細菌の表面付着抑制をも相乗的に付与できる条件を検討したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科インプラントのオッセオインテグレーションに関するSDF1の役割を解明することは、創傷治癒メカニズムの解明に直結する意味で、当該研究は学術的に独創的である。具体的には、チタン表面改質技術を駆使し、インプラント表面に創傷治癒促進物質を有利に接着させることでオッセオインテグレーションの成功へ導くことができると予想される。

この結果、創傷治癒促進能をもつインプラントとして臨床応用することで、質の高いインプラント創製が実現され、失敗やダメージのない治療法の確立につながる。また、臨床現場にエビデンスを与え、学問的にも口腔インプラント学の構築に寄与すると考えられ、社会的貢献度は非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：We focused on factors of wound healing and researched for substances that varied quantitatively by surface modification of titanium implants. Venous blood was cultured on titanium, RNA was extracted and cytokines were detected. Several genes were detected. When blood was contacted with surface-treated titanium, some genes whose expression level increased were detected. We tried to mass-produce human SDF1, which plays a central role in wound healing response, by gene recombination. Finally, purified recombinant protein could be obtained. The adhesion of bacteria related to peri-implant inflammation also were investigated using surface treatment method. We found that there is a difference in bacterial adhesion between titanium and zirconia. In the future, we would like to investigate surface modification methods that promote wound healing using recombinants, and to examine conditions that can synergistically provide inhibition of surface adhesion of peri-implantitis related bacteria.

研究分野：生化学、分子生物学、材料科学

キーワード：オッセオインテグレーション インプラント チタン 表面改質 サイトカイン 微量タンパクの検出
創傷治癒 組換えタンパク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラント治療の成功は osseointegration の可否で決まるといわれている。チタンインプラント埋入後、インプラントと新生骨の境界には 10 nm オーダーのタンパク多糖複合体からなる有機質成分の層が形成される。しかし、osseointegrated implant の成否を決定する材料表面の因子の存在が知られているものの、実態は未解明のままである。また、埋入直後からの治癒のメカニズムも詳細が未だ不明である。従って、osseointegration mechanism の解明を創傷治癒の観点から取り組むことは重要であると考えた。間葉系幹細胞から、骨細胞へ変化する過程でサイトカイン、ケモカインの刺激が誘発される。そのうち創傷治癒に關与する CXCL12-CXCR4 系のシステムに着目した。創傷治癒が開始される血液を介した初発のイベントから osseointegration を左右する因子と、インプラント材料表面の影響が解明される必要があると考えた。これはより高い骨形成能を有するインプラント素材開発に貢献し、患者の満足度の高いインプラントの創製に寄与できると考えた。

2. 研究の目的

歯科インプラント学の分野において、osseointegration mechanism と、それを決めるインプラント材料の表面因子が何か解明されていない。特に、創傷治癒の中で血液を介する反応と、osseointegration を決定する因子、及びインプラント材料の表面性状がそれにどう関わっているかが不明である。その中で特に、創傷治癒に関わる血液中のケモカイン CXCL12 に着目する。具体的な研究目的は下記の通りとする：

- (1) CXCL12 の動向を分子生物学的および免疫化学的に解明する。
- (2) インプラントの表面汚染や表面性状が CXCL12 の動態に与える影響を検討する。
- (3) CXCL12 のインプラント基材表面への吸着特性を評価する。最終的には創傷治癒を早める因子を表面に吸着させたインプラント基材の開発につなげる。

3. 研究の方法

研究開始当初の実験方法は以下の通りである。

- (1) チタンに表面改質を実施し、ヒトボランティアより採取した血液とともに培養する。
- (2) 培養後継時的にサンプリングした血液成分中のサイトカインの活性測定および定量を行う。
- (3) チタン表面に物理化学的改質を実施し、血液由来タンパク質を固定させインプラント表面に対する吸着特性の測定を行う。

4. 研究成果

まずチタンインプラントの表面汚染によって発現量に変動をもたらすサイトカインの検出を行った。健康ボランティアから採取した静脈血を、様々な表面処理を実施したチタンディスク上で 37 °C 5% CO₂ 条件下で培養開始し、経時的に一定量サンプリングし RNA を抽出した。チタンの表面処理に関しては、物理的処理として UV 照射処理、Plasma 処理、化学的処理として NaClO、NaOH または ClCH=CCl₂ による洗浄処理を検討した。検討したサイトカイン遺伝子は血液反応に関わるものを中心に 11 種類をターゲットとして RNA 検出を行った。その結果、検出された遺伝子は TLR4 などの炎症性サイトカイン、骨髄単球系のタンパク、CXCL12 のレセプターである CXCR4 であった。供試した条件下では CXCL12 は検出できなかった。また、検出された遺伝子に対し、培養開始からの発現量の経時変化を調べたところ、TLR4 が血液培養開始から 1 時間後に表面処理を実施しないコントロールと比較して、物理的および化学的改質を実施したチタンにおいて有意に発現量が上昇した ($p < 0.01$) (Fig.1)。CD14 については、培養 1 時間ごと 4 時間後にコントロールと比較して、化学的改質を実施したチタンにおいて有意に発現量が上昇した ($p < 0.05$)。CXCR4 については、同様に培養 1 時間後で物理的改質を実施したチタンにおいて有意に発現量が上昇し、8 時間後でも発現量が上昇傾向を示した ($p < 0.01$)。以上よりチタンの表面処理の違いによって、血液中の遺伝子の発現量が異なることが示された。

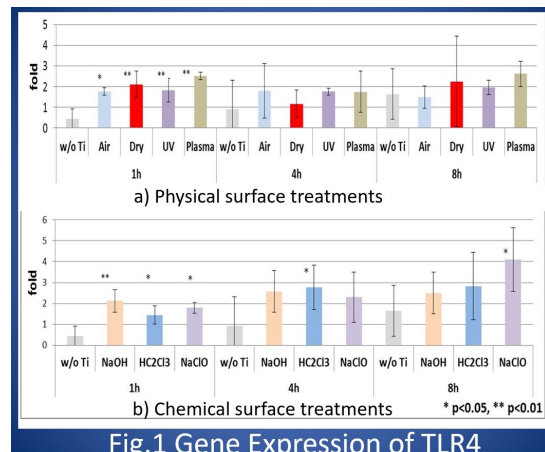


Fig.1 Gene Expression of TLR4

創傷治癒反応に関わるケモカインについて遺伝子レベルおよびタンパクレベルにおいて検出を行ってきたが、いずれも非常に微量であったため、当初中心的存在として考えていた CXCL12 は検出できなかった。そこで、相当量の試料を、遺伝子組み換えを駆使して取得することを念頭において取り組んだ。このタンパクは、市販品は mg オーダーで数百万円と高価な試薬なので、大腸菌に当該遺伝子のヒト型 DNA を組み換え実験により合成させ、細胞外に分泌させることをゴールとした。CXCL12 gene は variant が 3 種知られており、そのうち生理活性が同じ SDF1 と SDF1 を選択した。両者は N 末および C 末の構造の違いがあり、アミノ酸の電荷の違いだけである。この配列を元に 2 本鎖 linear DNA の合成を行った。pPAL7 vector に挿入し、E. coli BL21 にて発現させた (Fig.2)。

IPTG 発現誘導を行ったところ、誘導開始 3 時間後で飽和に達していた。しかし、発現したタンパクは膜画分に存在し、可溶化するステップが必要なことが判明した。目的タンパクの効率の良い発現の条件を見つけるため、温度、培養時間、膜からの溶出条件等を検討した。大腸菌ではタンパクの発現まではうまく行くものの、タンパクの精製段階でカラムから酵素による切断がうまく行かないようで、効率の良いタンパクの回収までは至らなかった。大腸菌体内で封入体になってしまっていた。

この inclusion body を可溶化し、単離して扱いやすい状態にすることができた。予想外の展開で SDF1

および のヒト型タンパクの大腸菌による大量生産への取組みに時間を要し、科研費採択中のデータ蓄積までは至らなかったが、これでこの先のタンパクを用いて、チタン基材の表面処理と、タンパクの吸着実験を行うことにより、表面処理が吸着へ及ぼす影響について解明することが可能になった。

遺伝子組み換え実験から発現タンパクの可溶化という難関に対処する間に、チタン表面処理を用いたインプラントを用いた再生医療材料の開発に関連し、以下の実験も行ったので報告する。インプラント周囲炎の予防を念頭に置き、初期付着細菌群のチタンとジルコニア表面上への付着を評価した。ディスク上に成型したチタンとジルコニア表面上にそれぞれ、Streptococci 菌群の培養液を上層し、24 時間培養後の生菌数を測定した。これで培養 24 時間前後の細菌数の増殖の程度をみる事ができる。細菌細胞の ATP 活性を指標とした発光試薬を利用した測定法により、*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii* および *Streptococcus oralis* のジルコニア上の付着菌数はチタン上のそれより有意に少なかった ($p < 0.05$)。一方、*Streptococcus mutans* の場合は、両材料の間で有意差はみられなかった (Fig.3)。また、基板上的細菌付着の様子を SEM 観察した結果、ジルコニアに比べてチタン表面上に付着している菌数が多くみられた (Fig. 4)

今後データが出る予定の、上記タンパクのチタン基材上への吸着の、表面処理の影響について、この予備実験の結果を合算すれば、将来の創製インプラントの開発の一助となると確信できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

- (1) ODA Y, MIURA T(3), (他 5 人), Bone marrow stromal cells from low-turnover osteoporotic mouse model are less sensitive to the osteogenic effects of fluvastatin. 査読有, PLOS ONE, 2018, 13(8), 1-14. DOI 10.1371/journal.pone.0202857
- (2) TANABE K, MIURA T(2), TSUKAGOSHI E(5), (他 3 人), The effect of dexamethasone on the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells when using fluvastatin. 査読有, J Oral Tissue Engin, 2017, 14, 151-156. DOI 10.11223/jarde.14.151
- (3) MIURA T, TANABE K(5), (他 4 人), Debridement effect on periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis cultured on titanium by application of atmospheric-pressure plasma. 査読有, J Biomed Sci Engin, 2017, 10, 51-59. DOI 10.4236/jbise.2017.102006
- (4) YANG L, TANABE K(2), MIURA T(3), (他 4 人), Influence of lyophilization factors and gelatin concentration on pore structures of atelocollagen/gelatin sponge biomaterial. 査読有, Dent Mater J., 2017, 36, 429-437. DOI 10.4012/dmj.2016-242
- (5) KIDA K, TANABE K(2), MIURA T(5), (他 4 人), Release properties of atelocollagen-gelatin complexes as carriers for local administration of fluvastatin. 査読有, Dent Mater J., 2017, 36, 408-414. DOI 10.4012/dmj.2016-179
- (6) MIYAKE N, MIURA T(2), TANABE K(3), (他 4 人), Effect of Physicochemical surface modifications on bovine serum albumin adsorption to tetragonal zirconia polycrystal in vitro through the change of the zeta potential. 査読有, J. Oleo Sci, 2016, 65, 1003-1010. DOI 10.5650/jos.ess16053
- (7) MIURA T, TANABE K(2), TSUKAGOSHI E(3), SHIZAWA Y(5), MIYAKE N(6), (他 2 人), Potential antimicrobial effects of gatifloxacin on periodontopathic bacteria in vitro. 査読有, J Biomed Sci Engin, 2016, 9, 354-359. DOI 10.4236/jbise.2016.97030
- (8) SHIRAI R, MIURA T, (他 5 人), Antimicrobial effect of titanium dioxide after ultraviolet irradiation against periodontal pathogen., 査読有, Dent Mater J., 2016, 35(3), 511-516. DOI

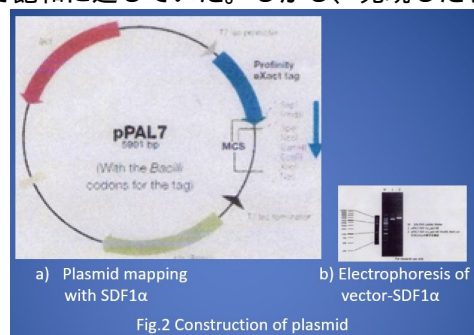


Fig.2 Construction of plasmid

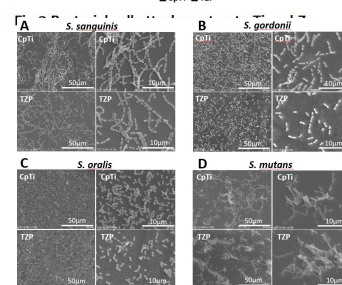
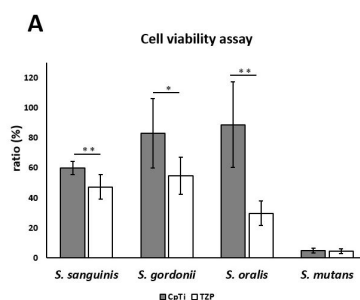


Fig.4 Scanning electron microscopy evaluation

10.4012/dmj.2015-406

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 小田由香里, 三浦直, 他, The attachment evaluation of *S. sanguinis* and *S. gordonii* on zirconia and titanium., 第 37 回日本口腔インプラント学会, 2018.
- (2) 小田由香里, 三浦直, 他, ジルコニア及びチタンディスク上における *Streptococci* の付着の評価, 第 61 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2018.
- (3) YOSHINARI M, YANG L, MIURA T, et al., An easy method to fabricate Atelocollagen/Gelatin sponge biomaterial with lyophilization technique., 第 15 回日本再生歯科医学会大会, 2017.

〔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

特になし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 志澤 泰彦

ローマ字氏名: Shizawa Yasuhiko

所属研究機関名: 日本大学

部局名: 生物資源科学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 30413131

研究分担者氏名: 三宅 菜穂子

ローマ字氏名: Miyake Nahoko

所属研究機関名: 東京歯科大学

部局名: 歯学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 40276978

研究分担者氏名: 塚越 絵里

ローマ字氏名: Tsukagoshi Eri

所属研究機関名: 国立医薬品食品衛生研究所

部局名: 医薬安全科学部

職名: 任期付研究員

研究者番号(8桁): 60615384

研究分担者氏名: 田辺 耕士

ローマ字氏名: Tanabe Koji

所属研究機関名: 東京歯科大学

部局名: 歯学部

職名: 助教

研究者番号(8桁): 80638156

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 吉成 正雄

ローマ字氏名: Yoshinari Masao

研究協力者氏名: 小野寺 一清

ローマ字氏名: Onodera Kazukiyo

研究協力者氏名: 楊 隆強

ローマ字氏名: Yang Longqiang

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。