

令和元年6月24日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20546

研究課題名(和文) タンパク質固定化技術を用いた生体適合性インプラントの開発

研究課題名(英文) Development of biocompatible implant using protein immobilization method

研究代表者

鈴木 琢磨 (SUZUKI, TAKUMA)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：80739334

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)：SEM観察でGM-CSFは粗造で不規則な表面形態を生じ、MTTアッセイでは48時間後に細胞生存率に有意差が認められた。TNF- $\alpha$ 分泌はGM-CSFなしで48時間後に24時間後と比較して有意に減少し、GM-CSFは24、48時間後にTNF- $\alpha$ の分泌を有意に増加した。IL-4分泌は、24時間、48時間でGM-CSF刺激の有無に関わらず有意に異なった。GM-CSF刺激の24、48時間後にIL-4分泌が有意に増加した。これらの結果は、Ti上で培養したマクロファージについてGM-CSFによって刺激すると抗炎症性および炎症性サイトカインの分泌を促進する可能性があることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インプラント埋入後の創傷治癒は、生活反応期、創内浄化期、組織修復期、組織再構築期の4つのステージに分けられる。各ステージにおいて働く細胞があり、各細胞を活性化するサイトカインが存在する。今回の研究では、初期の治癒反応に関係するマクロファージとGM-CSFに狙いを絞って評価した。その結果、マクロファージをGM-CSFで刺激することにより創傷性サイトカインおよび炎症性サイトカインが促進された。今後これらのサイトカインを組み合わせることでチタン表面へ固定化し各ステージで働く細胞活性を促進することにより創傷治癒を短縮できる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-4 (IL-4) from mouse macrophages(RAW264.7) activated by GM-CSF. RAW264.7 cells were cultured on titanium (Ti) discs. Secretion of TNF- $\alpha$  and IL-4 was evaluated using ELISA at 24h and 48h. Cell morphologies were observed using SEM, and cell viability was accessed by an MTT assay. GM-CSF caused rough and irregular surface morphology on the macrophages and resulted in a significant difference in cell viability after 48h. TNF- $\alpha$  secretion significantly decreased after 48 h without GM-CSF compared with that at 24h. GM-CSF significantly increased the secretion of TNF- $\alpha$  after 24h and 48h. IL-4 secretion was significantly different with or without GM-CSF stimulation at 24h and 48h. There was a significant increase in IL-4 secretion 24h and 48h after GM-CSF stimulation.

These results suggest that macrophage stimulated GM-CSF may promote secretion of anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines on Ti.

研究分野：生体材料学

キーワード：GM-CSF マクロファージ TNF- $\alpha$  IL-4 チタン

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

1. 研究開始当初の背景

チタンは優れた機械的性質と生体適合性を有することから、歯科および整形外科領域で幅広く臨床応用されている。しかしながら、チタンは、組織の治癒過程を促進および向上することはできない。そのため様々な機械的処理、化学的処理による表面改質が行われている。チタンに細胞接着タンパク質や成長因子などを固定化して、生体適合性を向上させる試みも報告されているが、固定化手法が煩雑で大がかりな設備を使用するという欠点を有している。近年、タンパク質固定化手法として、トレシルクロリド法が開発された (J Biomed Mater Res A 2003; 67A: 684-688., Biomed Res 2003; 24: 223-230.) 本法は、Nilsson と Mosbach らが報告した方法を改良したものである。トレシルクロリド法とは、図1 に示すようにチタン表面の塩基性水酸基をトレシルクロリド (CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>Cl) で活性化し、トレシル化したチタン表面とタンパク質のアミド基をカップリング反応させ化学結合によって固定化する技術である。この方法では、他の方法と比較して大規模な設備を必要とせず、簡便で確実に固定化でき、その結果としてチタンの生体適合性を向上できるという利点を有している。インプラント埋入後の創傷治癒は、図2のように生活反応期、創内浄化期、組織修復期、組織再構築期の4つのステージに分けられる。各ステージにおいて働く細胞があり、各細胞を活性化するサイトカインが存在する。生活反応期では、血小板から放出される血管内皮細胞増殖因子 (PDECGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)

上皮細胞増殖因子 (EGF)、  
などが細胞促進に寄与する。

また、創内浄化期では顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) などが、組織修復期では、FGF、組織再構築期ではトランスフォーミング増殖因子 (TGF- $\beta$ ) 骨形成因子 (BMP) などである。

これらサイトカインを組み合わせ

てチタン表面へ固定化し、各ステージで働く細胞活性を促進することにより創傷治癒を短縮できると考えられる。

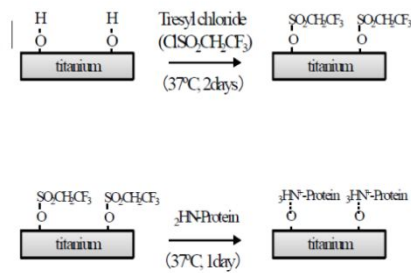


図 1

インプラント埋入後の創傷治癒



図 2

2. 研究の目的

歯科領域において、咬合機能の回復を目的としてチタンインプラントが用いられており、埋入後、咀嚼・咬合が可能となるまで3~6ヶ月の治癒期間が必要となり、その間、患者の摂食機能は著しく低下する。

近年チタンの生体適合性を向上させるため、さまざまな手法、材料を用いて研究が行われているが、チタン材料自体には周囲組織の治癒を促進するような機能は認められていない。そこで、チタン表面へのタンパク固定化技術であるトレシルクロリド法を用いて、複数のサイトカインを組み合わせ固定化し周囲組織の治癒状態を組織形態学的に分析する。それにより、インプラント埋入後、生体の治癒を促進する機能を持った生体適合性インプラント材料を開発することを目的とする。

研究代表者は、これまでにチタンに TGF- $\beta$  2 を固定化することに成功し、(図3)ラット大腿骨モデルにおいて無処理チタンと比較して骨接触率および骨形成量が有意に向上したことを確認している。(図4,5)この研究結果を基にし、まずは、PDE, FGF, M-CSF, GM-CSF などさらに細胞活性を高め治癒促進するようなサイトカインと組み合わせ固定化することによりチタンインプラントの生体適合性を向上させることで、インプラント埋入から咬合・咀嚼できるようになるまでの治癒期間を短縮させることを目的としている。前段階として GM-CSF に対するマクロファージの挙動を評価した。

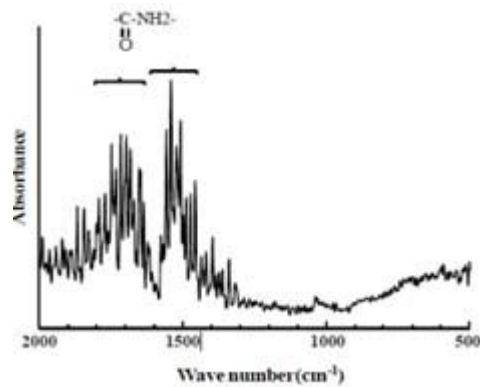
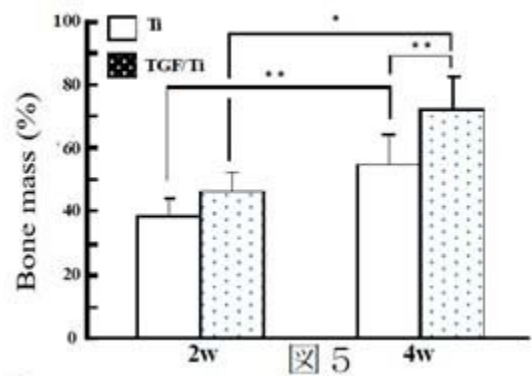
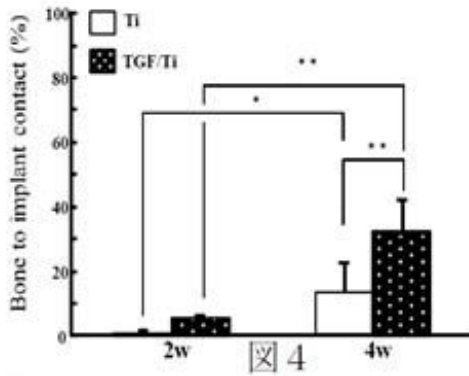


図 3



### 3. 研究の方法

市販のチタンディスク (99.9%, グレード 2, 5 mm, thin 0.5 mm, 15 mm, thin 1 mm, フルイチ化学) を使用した. チタンサンプルは研磨紙 (#1200) で研磨し, エチレンオキシサイドガスにて滅菌を行った.

細胞形態の観察において, 24 ウェルプレートにチタンディスク (15 mm, thin 1 mm) を静置し  $4.3 \times 10^5$  cell/well でマウス由来マクロファージ (RAW264.7) を播種し培養 12 時間後に Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) 添加培地へ交換し 24, 48 時間培養した. 培養後, 細胞の固定, 凍結乾燥を行い走査型顕微鏡 (SEM) を用いて観察を行った.

細胞生存能および tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) および創傷治癒関連サイトカインである interleukin-4 (IL-4) の分泌量の評価については, 96well plate にチタンディスク (5 mm, thin 0.5 mm) を静置し,  $3.35 \times 10^5$  cell/well で播種した. 細胞を播種してから 12 時間後, GM-CSF 添加培地へ交換し 24, 48 時間後に MTT アッセイおよび ELISA 法を行い評価した.

### 4. 研究成果

SEM による観察では, GM-CSF 添加群において非添加群と比較して凹凸感や不規則性が増加していた (図 6). 細胞増殖能については, 非添加群では経時的に増加していたが添加群では細胞数の増加はほとんど認められなかった (図 7). TNF- $\alpha$  については, 非添加群では経時的に減少していたが添加群では経時的に上昇していた (図 8). IL-4 については, 両群で経時的に上昇していたが, 添加群においては著しく上昇していた (図 9).

動物実験において, トレシルクロリド法を用いて 250 ng/mL GM-CSF 溶液, 250 ng/mL GM-CSF+1  $\mu$ g/mL TGF- $\beta$  2 溶液をチタンプレート (1.5  $\times$  2.0  $\times$  0.5 thin) へ固定化し, 未処理チタンプレートをコントロールとしてラット大腿骨へ埋入し, 2 週間後に屠殺し病理切片を作製, 光学顕微鏡にて観察した. 組織学的形態観察において, チタンインプラント周囲の骨組織に対して明らかな差は認められなかった.

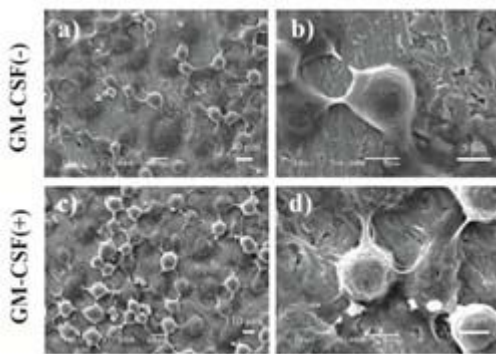


図 6

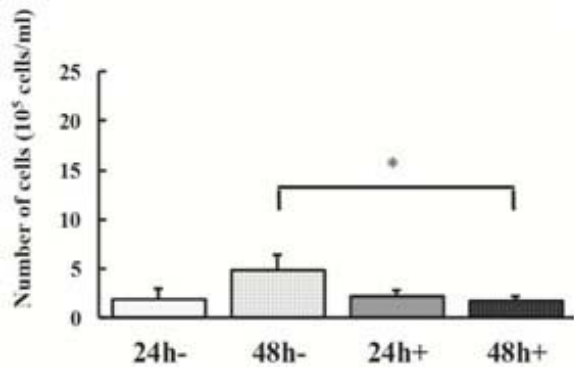


図 7

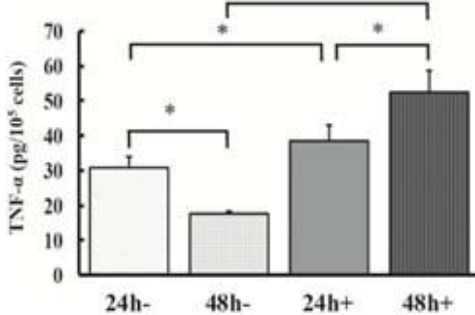


図 8

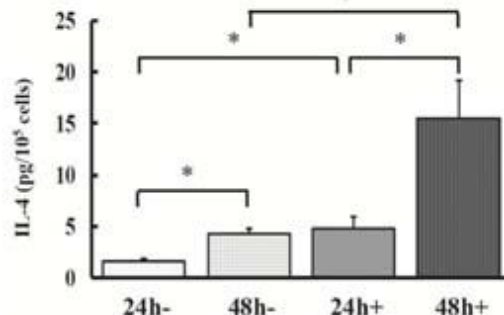


図 9

今後は画像解析ソフトなどを用いて骨接触率や骨量を分析していくとともに、GM-CSF と TGF- $\beta$ 2 の比率や埋入期間などを検討していき両群で違いが観察できるか評価していく予定である。なお本研究で得られたデータは論文にまとめ、Journal of Hard Tissue Biology に投稿し 2018.11.27 に受理された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takuma Suzuki, Tohru Hayakawa, Kazuhiro Gomi. GM-CSF Stimulates Mouse Macrophages and Causes Inflammatory Effects in Vitro Journal of Hard Tissue Biology. 4(28): 37-42 2019  
DOI : 10.2485/jhtb.28.37

査読の有無 : あり

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。