

令和 2 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：2017～2019

課題番号：17K17226

研究課題名(和文) DNA/プロタミンレイヤー固定化チタンインプラントの開発

研究課題名(英文) Development of a Multilayered DNA/protamine Coating on Titanium Implants

研究代表者

櫻井 敏継 (Sakurai, Toshitsugu)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：10784978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNA-d/プロタミンおよびDNA-s/プロタミンレイヤー固定化が骨形成に与える有効性が明らかとなった。しかしながら、DNAの立体構造による差は認められず、DNAのリン酸基が骨形成に参与している可能性が示唆された。
固定化されたDNA/プロタミンレイヤーの吸収性は、レイヤー固定化に対する被着面の違いが影響が少ないことが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA/プロタミンレイヤー固定化によりインプラント体周囲の骨形成を促す可能性が示唆された。また、2本鎖及び1本鎖DNAに有意差が認められなかったことから、DNAの立体構造の違いが骨形成に及ぼす影響は少ないことが示唆された。また、被着面の性状がレイヤーの吸収性に影響が少ないことが示唆された。DNA/プロタミンレイヤー固定化チタンインプラントの骨適合性に関する明確なエビデンスを確立できれば、インプラントの適応範囲の拡大、早期荷重が可能になるなど患者にとって有益なインプラント治療を提供することができることも多くの国民のQOL向上に寄与することができることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We conclude that both DNA-d/protamine and DNA-s/protamine coatings enhanced early bone formation. We suggest that a DNA-multilayer coating is useful for the surface modification of a Ti implant.
It is possible that it was inferred that the absorbability of the immobilized DNA/protamine layer was less affected by the difference in the adhered surface to the layer immobilization.

研究分野：デンタルインプラント

キーワード：DNA プロタミン インプラント

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

デオキシリボ核酸 (DNA) は遺伝子情報の担い手として広く知られており、数多く報告されている。一方、DNA はリン酸エステルを主鎖に、塩基対を側鎖に有している高分子化合物である。負に荷電する官能基、特にリン酸基を有する持つ化合物は、リン酸カルシウム結晶の形成過程における誘導物質となる事が期待でき、DNA もリン酸基を有する化合物である。また、DNA は塩基対間に抗生物質や成長因子などをインターカレーションやグルーブバインディングすることができる特性を有している。生分解性であり、生体材料としての有効性が期待される材料である。今までに DNA を高分子材料、特に生体材料として用いた研究はほとんどない。

福島らは、DNA とキトサンやポリ-L-リジンなど各種ポリカチオン高分子との複合体を合成し、その特性について検討してきた。特に、プロタミンは、微生物に対する抗菌性を有しており、天然物由来の安全な食品保存料として広く用いられていることから、DNA とプロタミンとの複合体に着目し、詳細な検討を行った。その結果、DNA (bp300) /プロタミン複合体粉末を水で練和することにより、臨床応用に適切な粘性を持ったペースト状になり、さらにこのペーストがグラム陽性菌に対して抗菌性を有し、生体親和性も良好で、細胞毒性もほとんどないこと、骨形成能を示すことを見出した。DNA/プロタミン複合体はアパタイトなどの従来のセラミックスやポリ乳酸などの吸収性高分子材料に代わる新規な骨補填剤として期待される。

今までに、DNA やプロタミン、或いは DNA/プロタミン複合体をチタンインプラントに固定化してその骨形成能を調べた研究はほとんどない。我々は、トレシルクロリド法および交互積層法を用いて、DNA/プロタミンをレイヤー状にチタンに固定化することを試み、成功した。DNA/プロタミンをレイヤー固定化したチタンは擬似体液浸漬実験においても浸漬初期でコントロールである非コートチタンと比較し有意なアパタイトの析出が認められ、ラット上顎へのインプラント埋入実験においても良好な骨適合性を示し (図 1)、DNA/プロタミンをレイヤー固定化したチタンインプラントはより実用的で臨床応用できる可能性が明らかとなった。

しかしながら、DNA/プロタミンレイヤーのチタンへの接着性と長期耐久性や DNA の立体構造の違いなどについては未だ明確ではなく、検討する必要がある。理想的な DNA の立体構造や確実な接着が認められれば、in vivo においてもこれまでの研究成果を上回る骨-インプラント間接触率 (BIC) を得ることができる可能性がある。

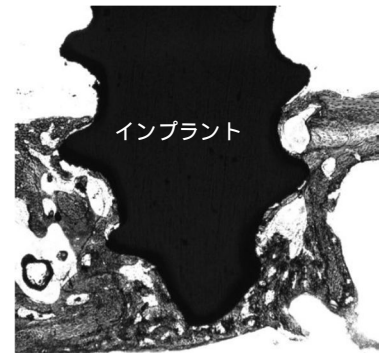


図 1 DNA/プロタミンレイヤー固定化インプラント周囲での骨形成

2. 研究の目的

本研究における DNA/プロタミンレイヤー固定化チタン製法は非加熱下で行う簡便なものであり、従来のチタンの表面処理法に比較して、より簡便で確実かつ安価である。また、本研究で用いられている DNA とプロタミンは年間約 1 万トンの産業廃棄物となっているサケの白子より分離精製される点から、産業廃棄物の減少にもつながる技術である。本研究で用いたトレシルクロリド法、交互浸漬法は溶液法であるので、複雑な形態のインプラント体にも均一に固定化することができ、ポーラス体などの 3 次元構造体への固定化も可能性があり、インプラントのみならず、新たな骨補填材の開発につながることも期待できる。また、プロタミンは多くの微生物に抗菌静菌作用を示すことから埋入初期のインフェクションコントロールという点でも有望な可能性がある。DNA/プロタミンレイヤー固定化チタンインプラントの骨適合性に関する明確なエビデンスを確立できれば、インプラントの適応範囲の拡大、早期荷重が可能になるなど患者にとって有益なインプラント治療を提供することができることも多くの国民の QOL 向上に寄与することができることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 立体構造の異なる DNA コーティングチタンインプラントの骨形成

2 本鎖 DNA と 1 本鎖 DNA を用いて、DNA の立体構造の違いが骨形成に与える影響について動物実験により検討した。さらに、水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法を用い、疑似体液中でのアパタイト沈着挙動の観察を行った。

DNA/プロタミンレイヤー固定化 Ti の作製

Ti 基材として、Ti ディスク (厚さ 1.0 mm, 12.0 mm) および Ti スクリュー (長さ 3.0 mm, 1.5 mm) の 2 種類を用いた。DNA には、サケ白子由来 DNA である DNA-d (bp300) および DNA-s (分子量 = 約 4,500) を用いて、DNA/プロタミンレイヤー固定化 Ti を作製した。はじめにトレシルクロリド法を用いて、Ti 表面に塩基性タンパクであるプロタミンを化学的に結合させる処理を行った。すなわち、Ti 表面をトレシルクロリドで処理後、プロタミン水溶液にトレシル化 Ti を浸漬することでチタン表面にプロタミンを固定化した。次に、プロタミン固定化された Ti ディスクまたは Ti スクリューを DNA-d または DNA-s 水溶液およびプロタミン水溶液に 7 分ごとに交互に浸漬し、プロタミンと DNA のレイヤー固定化を行った。5 層となるように DNA/プロタミンレイヤーを積層し、表層は DNA とした。以上の方法を用いて、DNA-d/プロタミンレイヤー

固定化 Ti (DNA-d/プロタミン Ti), ならびに DNA-s/プロタミンレイヤー固定化 Ti (DNA-s/プロタミン Ti) を作製した(図 2) .

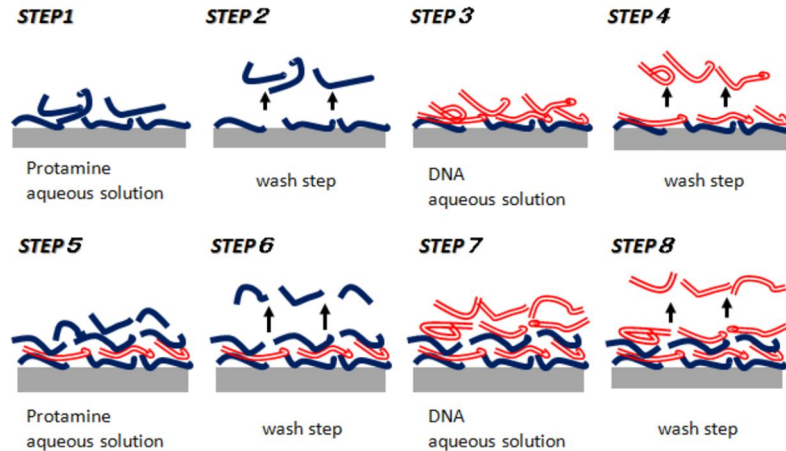


図 2 DNA/プロタミンレイヤー固定化

DNA/プロタミンレイヤー固定化 Ti 表面のキャラクタリゼーション
固定化 Ti ディスクの表面状態を原子間力顕微鏡 (AFM) にて観察し, 表面粗さの測定を行った .
また, 接触角計を用いて純水に対する接触角を計測した .

動物埋入実験

Wistar 系ラット (6 週齢, オス) の上顎第一大臼歯を抜歯後, DNA-d/プロタミン Ti, ならびに DNA-s/プロタミン Ti インプラント, およびコントロールとして無処理 Ti インプラントを埋入した(図 3) .

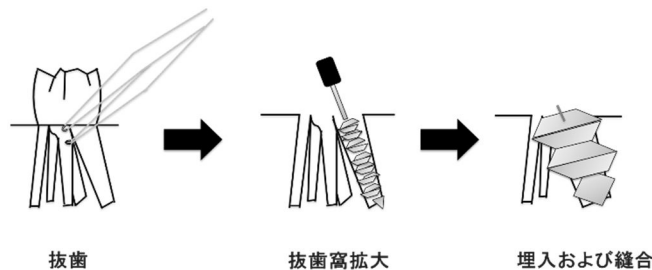


図 3 インプラント体の埋入

また, インプラント体周囲の新生骨を蛍光顕微鏡で観察するため, 試料摘出 1 週前にカルセインを皮下に注射した . インプラント体埋入 3 週後および 6 週後に試料を摘出し, 厚さ 50 - 70 μ m の非脱灰薄切標本を作製した . 共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による蛍光ラベリングの観察後, 塩基性フクシン・メチレンブルーによる重染色を行い, 光学顕微鏡を用いてインプラント体周囲の骨形成の状態を観察した . さらに画像解析ソフトを用いて, 蛍光標識長ならびに骨インプラント接触率 (BIC) を求めた .

QCM 測定

周波数 27MHz の QCM 装置を用いた . Ti センサーに同様の DNA-d/プロタミンまたは DNA-s/プロタミンレイヤー固定化を行った . コントロールとして無処理 Ti センサーを用いた . 各センサーを装着後, センサーセル内に疑似体液としてハンクス溶液 (pH=7.4) を 0.5 ml 注入した . ハンクス溶液注入後からの振動数変化を測定し, 各センサーでのアパタイトの析出開始時間ならびに 10 時間後のアパタイト析出量を求めた .

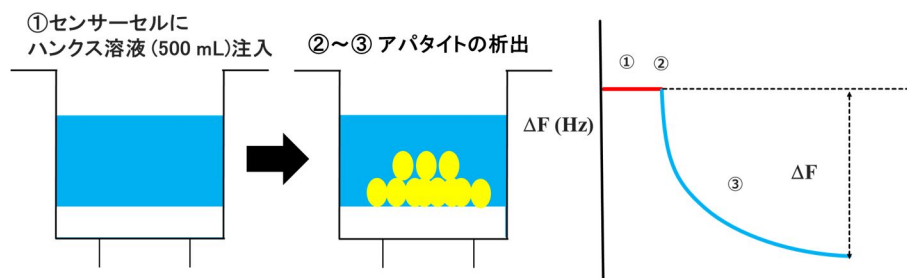


図 4 QCM 測定

(2) コート前の前処置による影響

コーティング前処理: Ti ディスク(厚さ 1.0 mm, 12.0 mm)に対し, 150 μ m アルミナサンドブラスト, UV 照射を行う。

DNA/ プロタミンレイヤー固定化(図 2): DNA/ プロタミンレイヤー固定化は既報に準じ, トレシルクロリド処理後, DNA 水溶液, プロタミン水溶液を交互に浸漬する交互積層法によって DNA/ プロタミンレイヤー固定化チタンを作製する。

キャラクタリゼーション

(a)形態的観察: 各試料の形態的観察を行うため, 走査型電子顕微鏡(SEM)による表面観察を行う。また, 表面の凹凸状態を観察するため, 原子間力顕微鏡(AFM)を用いて試料表面の平均粗さなどを算出し, 三次元的な分析を行う。

DNA/プロタミンレイヤーの接着性

(a)リン酸緩衝水溶液への長期浸漬

各条件の実験群の各ディスク試料を, 25ml のリン酸緩衝水溶液(PBS)に 90 日間浸漬する。各試料は, 15, 30, 60, 90 日間ごとに取り出し, 表面状態を SEM 観察する。

(b)スクラッチ試験

スクラッチ試験機(Micro Scratch Tester, CSM Instrument)を用い, レイヤーの密着性評価を行う。

擬似体液に浸漬し, リン酸カルシウムの沈着に関して比較検討

擬似体液(ハンクス溶液)に浸漬し, 沈着するリン酸カルシウムの質量を比較する。

4. 研究成果

(1) 立体構造の異なる DNA コーティングチタンインプラントの骨形成

AFM 観察の結果, DNA-d/プロタミン Ti および DNA-s/プロタミン Ti の表面には球状構造物が確認された(図 5)。表面粗さ(Sa)は, DNA-d/プロタミン Ti > DNA-s/プロタミン Ti > Ti の順に統計学的に有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。純水に対する接触角は, DNA-d/プロタミン Ti および DNA-s/プロタミン Ti とともに, 無処理 Ti に比べ有意に低い値であった ($p < 0.05$) (図 6)。これにより, 表面が親水化されたことが認められた。DNA-d/プロタミン Ti と DNA-s/プロタミン Ti 間には有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。

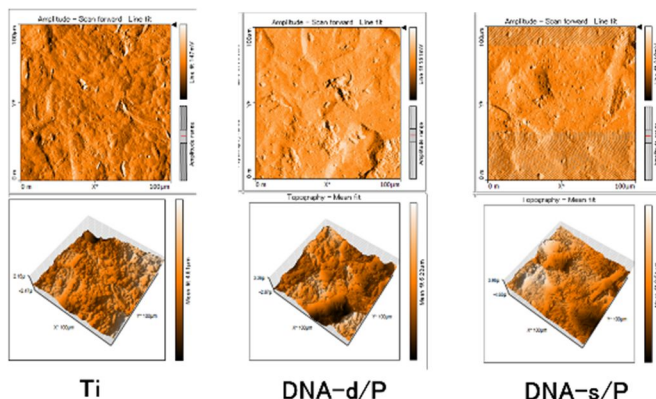


図 5 AFM 観察像

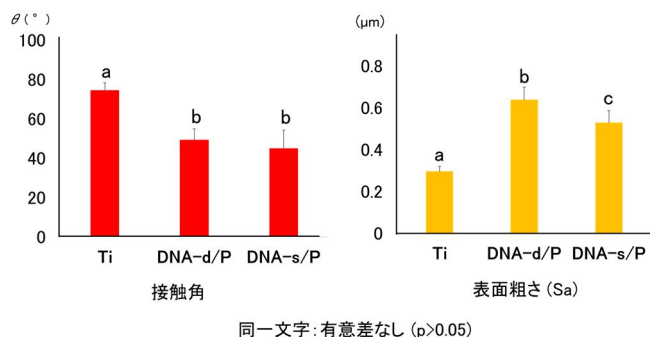
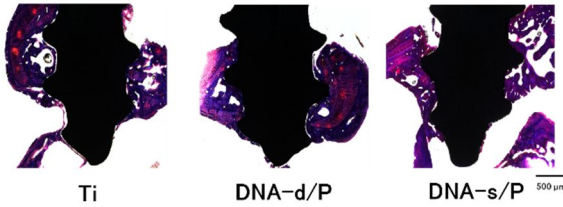


図 6 接触角と表面粗さ

動物埋入実験後, CLSM 観察から算出したカルセインラベリング長は, 埋入 3 週および 6 週後, いずれも無処理 Ti に比べ, DNA-d/プロタミン Ti ならびに DNA-s/プロタミン Ti は有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。DNA-d/プロタミン Ti と DNA-s/プロタミン Ti との間に有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。また, 6 週後ではいずれの試料でも, 3 週後に比べて有意にカルセインラベリング長が低下していた ($p < 0.05$)。BIC 測定においても, 埋入 3 週および 6 週後で DNA-d/プロタミン Ti ならびに DNA-s/プロタミン Ti は無処理 Ti よりも有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。DNA-d/プロタミン Ti と DNA-s/プロタミン Ti との間に有意差は認められなかった ($p > 0.05$) (図 7, 8)。また無処理 Ti では, 6 週後では 3 週後に比べて有意に BIC が増加していたが ($p < 0.05$)。DNA-d/プロタミン Ti, DNA-s/プロタミン Ti では, 3 週後と 6 週後に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$)。これらの結果から, DNA-d/プロタミンレイヤーおよび DNA-s/プロタミンレイヤー固定化は Ti インプラント体と骨との早期の接合を促すことが示唆された。

3週



6週

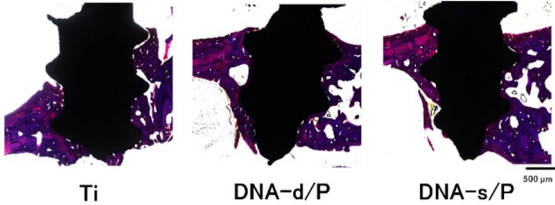


図7 病理組織像

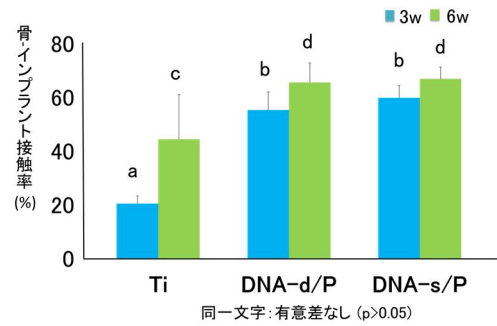


図8 骨インプラント接触率

QCM 測定の結果, DNA-d/プロタミン Ti, DNA-s/プロタミン Ti のいずれもアパタイトの析出開始までの時間は Ti の約 1/2 であり, 有意に速い値であった ($p<0.05$) (表 1). これは, DNA のリン酸基の効果によるものと思われる. しかしながら, DNA-d/プロタミン Ti, DNA-s/プロタミン Ti 間に有意差は認められず ($p>0.05$), 10 時間後のアパタイト析出量においても, 3 種類の試料間に有意差は認められなかった ($p>0.05$). アパタイトの析出開始時間は, コントロール群に比べ約 1/2 であった. QCM 測定による早期のアパタイト形成は, 動物埋入実験における早期の骨形成を支持する結果であると推察される.

表 1 アパタイトの析出時間および析出量

	析出開始時間 (s)	析出量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	
Ti	1139.0 (174.2) ^a	22.0 (5.3) ^c	() : SD 同一文字 : 有意差なし ($p>0.05$)
DNA-d/P	424.0 (42.2) ^b	20.8 (8.8) ^c	
DNA-s/P	314.7 (97.6) ^b	23.3 (4.6) ^c	

(2) コート前の前処置による影響

DNA/プロタミンレイヤー固定化した. 固定化した各種ディスクの走査型電子顕微鏡(SEM)による表面観察を行ったが. 固定化による SEM 像の違いは観察されなかった. リン酸緩衝水溶液への浸漬 15 日間後に取り出し, 表面状態を SEM 観察したが, 固定化の SEM 像での変化も判定することはできなかった. スクラッチ試験でのレイヤーの密着性に関しても固定化した DNA/プロタミンレイヤーの剥離を判断する事が難しかった. 擬似体液に浸漬し, リン酸カルシウムの沈着に関して比較検討に関しても, コートした DNA/プロタミンの溶解の影響が大きな違いは認められなかった.

(3) まとめ

DNA-d/プロタミンおよび DNA-s/プロタミンレイヤー固定化が骨形成に与える有効性が明らかとなった. しかしながら, DNA の立体構造による差は認められず, DNA のリン酸基が骨形成に関与している可能性が示唆された. 今後は, DNA/プロタミンレイヤーとタンパク質との相互作用などを詳細に検討する必要がある.

コート前の前処置による影響の結果から固定化された DNA/プロタミンレイヤーの吸収性は, レイヤー固定化に対する被着面が, 滑面, サンドブラスト処理された面, UV 処理された面に関して, 大きな違いが無いことが推察された. しかし, 検討が不十分である可能性が高く, 今後より多角的な検討が必要である. また, 骨形成に関しては, コートした DNA/プロタミンが吸収した後こそ, 被着面の影響が出る可能性が高く, 今後 in vivo の検討が求められる.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagahiro Miyamoto , Rina Yamachika , Toshitsugu Sakurai , Tohru Hayakawa , Noriyasu Hosoya	4. 巻 -
2. 論文標題 Bone Response to Titanium Implants Coated With Double- Or Single-Stranded DNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/9204391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮本永浩, 山近梨奈, 櫻井敏継, 庵原啓司, 細矢哲康, 早川 徹
2. 発表標題 立体構造の異なるDNAコーティングチタンインプラントの骨形成
3. 学会等名 第70回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本永浩, 山近梨奈, 櫻井敏継, 細矢哲康, 早川 徹
2. 発表標題 DNA/プロタミンコーティングチタンインプラントにおける骨形成への影響
3. 学会等名 鶴見歯学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----