

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10290

研究課題名(和文) ハイドロキシアパタイトの優れた骨伝導能とバイオインテグレーションの本質を解明する

研究課題名(英文) We elucidate the excellent osteoconductivity of hydroxyapatite

研究代表者

山村 佳子 (YAMAMURA, Yoshiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教

研究者番号：00581406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：オッセオインテグレーション獲得におけるmiRNAの関与を明らかにするために、チタン、金、ステンレス、ハイドロキシアパタイトのコーティングガラス上で培養されたMC3T3-E1のmiRNA発現を比較検討した。マイクロアレイ解析により、miR155-5p、miR7023-3pの発現が、ガラス、金およびステンレスと比較して、チタン上で培養されたMC3T3-E1細胞で有意に増加した。また、miR155-5pはMC3T3-E1細胞の骨形成分化過程で発現増強を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miR155-5pは、オッセオインテグレーションの獲得に関与している可能性が示唆された。今後、miR155-5pを利用したインプラント治療を行ったり、歯科のみならず、整形外科領域においても新規の骨補填材料の開発に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the involvement of microRNA (miRNA) in the acquisition of osseointegration on titanium, here we compared the miRNA expression profiles of mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) cultured on titanium-, gold-, and stainless steel-, HA-coating glass dishes by microarray analysis. The microarray analysis revealed that the expression of miR-155-5p and miR-7023-3p were significantly increased in MC3T3-E1 cells cultured on titanium-coating glass dishes, compared to non-coating, gold-, and stainless steel-coating glass dishes. Interestingly, miR155-5p was upregulated during osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells.

研究分野：口腔外科学分野

キーワード：スパッタ法 マイクロアレイ解析 MC3T3-E1細胞 マイクロRNA

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

## 1. 研究開始当初の背景

ハイドロキシアパタイトは、優れた骨伝導能を有し、骨と化学的に結合する(バイオインテグレーション)にもかかわらず、細胞が何を認識して骨伝導能を発揮するかは全く未解明である。ハイドロキシアパタイトの高い骨伝導能に対する研究は、材料学的な立場からの研究が報告されているだけで、細胞が何を認識してハイドロキシアパタイトの骨伝導能が発揮されるかについての情報は明らかになっていない。これまで、ハイドロキシアパタイトやチタン上で骨芽細胞を培養し、骨分化マーカーを比較する研究は多数ある。しかし、表面形状を描いていないため、その差が何に起因するかを解明できていない。すなわち、ハイドロキシアパタイトと他の物質を比較する場合に、表面粗さや表面形状を変えずに、材質だけが異なる試料を用いることを発案する。

## 2. 研究の目的

本研究では、表面粗さや表面形状は同じで、材質だけが異なる試料を用いて、骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1細胞)の遺伝子とmicro(mi)RNAの発現変化をマイクロアレイにて網羅的に解析し、ハイドロキシアパタイトの骨伝導能の機序を細胞サイドから分子レベルで解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)チタン、金、ステンレス、ハイドロキシアパタイトをコーティングしたディッシュの作製  
スパッタ法を用いて、ガラスディッシュ(径105mmフラットシャーレ、アズワン製、大阪府、日本)を、チタン、金、ステンレス、ハイドロキシアパタイトでコーティングし、表面粗さや表面形状がほぼ同一のディッシュを作製した((株)協同インターナショナル、神奈川県、日本)。

(2)細胞培養とマイクロアレイ解析

MC3T3-E1細胞(RIKEN, 埼玉県, 日本)を5種類のディッシュ上で6時間培養し、3D Gene Mouse miRNA Oligo chip((株)東レ、東京都、日本)を用いて、microRNAの発現を比較検討した。

(3)候補microRNAのreal-time PCR法を用いた発現定量

マイクロアレイ解析で候補となったmicroRNAの発現を、RT-PCR ABI PRISM 7000(Applied Biosystems Japan Ltd, 神奈川県, 日本)とTaqMan®microRNA Assaysを用いて定量した[アッセイID: miR-155-5p (Assay ID: 002571), RNU6B (Assay ID: 001093)]。

(4)MC3T3-E1細胞の骨への分化

MC3T3-E1細胞を骨分化培地で分化培養し、アリザリンレッド染色と候補microRNAであるmiR-155-5pの発現定量をreal-time PCR法を用いて行った。さらに、骨分化におけるガラス、金、チタン、ステンレスの発現定量を行った。

(5)miR155-5pを強制発現させた細胞の作製と骨分化マーカーの発現定量

MC3T3-E1細胞にmiR155-5pを強制発現させた細胞を作製し、骨分化マーカーの発現を定量した。

(6)統計的解析法

得られたデータはStudent's *t*-test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. 研究の結果

(1)チタン、金、ステンレスでコーティングされたディッシュの表面形態と粗さ

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、東京都、日本)で観察し、表面粗さは3Dレーザーマイクロ스코ープ「VK-9700」(KEYENCE社、大阪府、日本)で測定した。

### 表面形態

チタン、ガラス、金、ステンレス、いずれも表面の形態は、ほぼ同一であった(図1)。

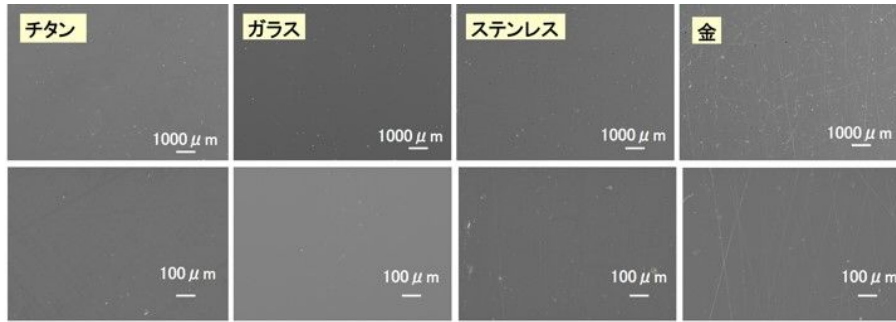


図1 表面形態

### 表面粗さ

コーティングしたディッシュを1cm×1cmに切断し、それを9領域に分割して、表面粗さを計測した。チタン、金、ステンレスの表面粗さに有意差はなかった(図2)。

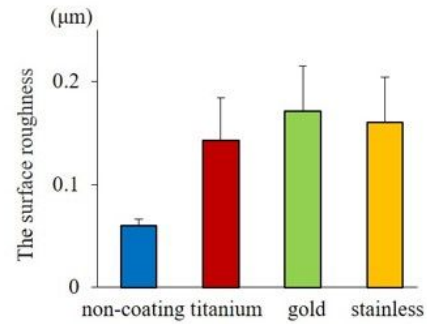


図2 表面粗さ

### (2)ガラス、金、チタン、ステンレス上のMC3T3-E1細胞における骨形成マーカーの発現

MC3T3-E1細胞をガラス、金、チタン、ステンレスのディッシュ上で骨形成分化培地を用いて21日間培養した後、骨形成分化マーカーであるRunx2, Col1a1, Alp, Bglapの発現をリアルタイムPCRで検索した。チタンのみがMC3T3-E1細胞のすべての分化マーカーの発現を増強した(図3)。

n = 3. \*P<0.01.

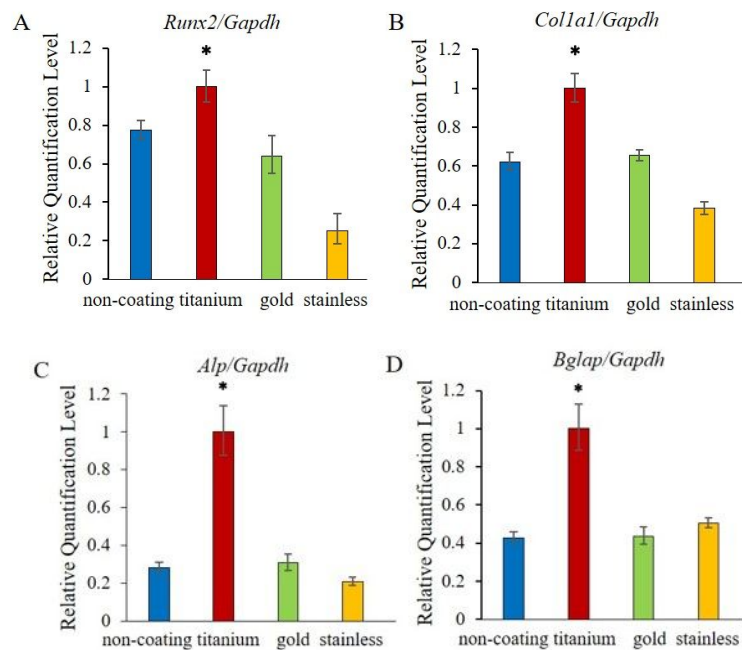


図3 リアルタイムPCR

### (3)チタン上で培養されたMC3T3-E1細胞におけるmiRNA発現のマイクロアレイ解析

MC3T3-E1細胞をガラス、チタン、金、ステンレスのディッシュ上で6時間培養した後、マイクロアレイ分析にてmiRNAの発現を検索した。チタンと比較して、他の金属コーティングガラスで1.5倍以上の発現上昇した2miRNAおよび発現低下した14miRNAが同定された。

チタン上で培養した細胞では、miR155-5p と miR7023-3p が発現上昇していた (図 4)。骨形成における miR155-5p の関与が示された報告があったため、骨芽細胞分化における miR155-5p の機能についてさらに検索をすすめた。

リアルタイム PCR での発現定量においても、miR155-5p の発現レベルは、他の金属と比較して 2.5 倍発現が上昇していた (図 5)、n = 5. \*P<0.01.

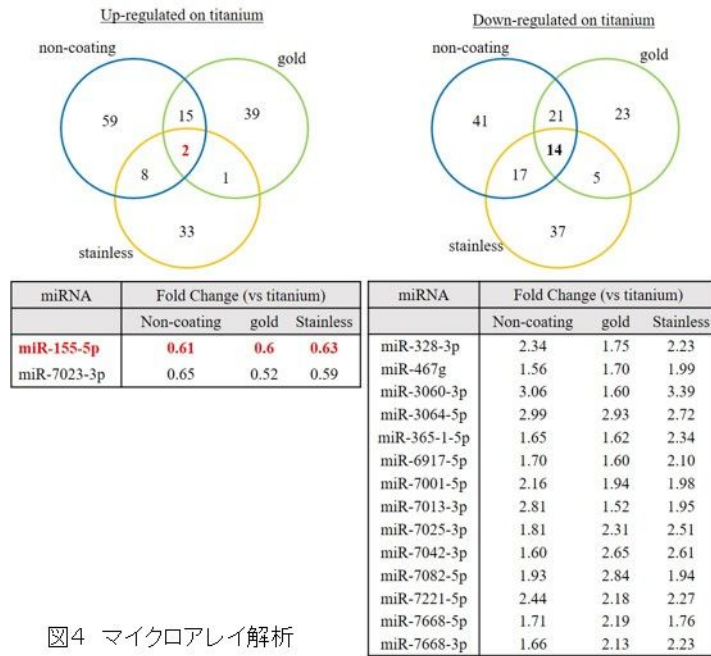


図4 マイクロアレイ解析

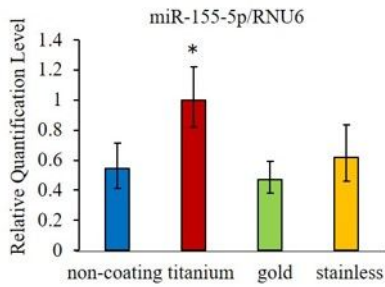


図5 miR155-5p発現定量

#### (4) MC3T3-E1 細胞の骨への分化における miR155-5p の発現

##### A. アリザリンレッド染色による MC3T3-E1 細胞の石灰化

14 日目と 21 日目のディッシュで石灰化が確認された (図 6)。

##### B. 骨分化中における miR-155-5p の発現

miR155-5p の発現レベルは、骨形成分化中の 7 日目と 21 日目にそれぞれ 4 倍、8 倍に上昇していた (図 7)。n=3. \*P<0.01.

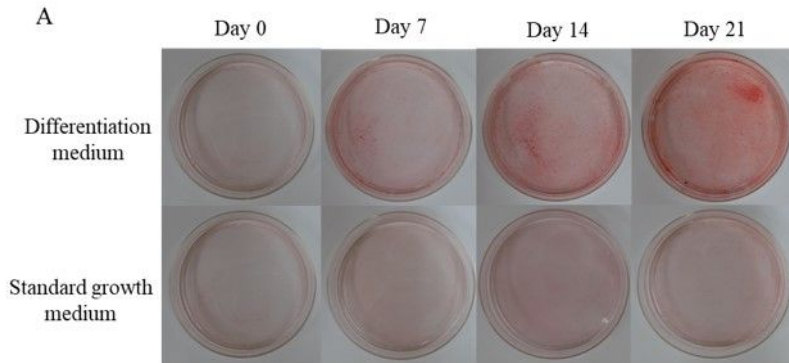


図6 アリザリンレッド染色

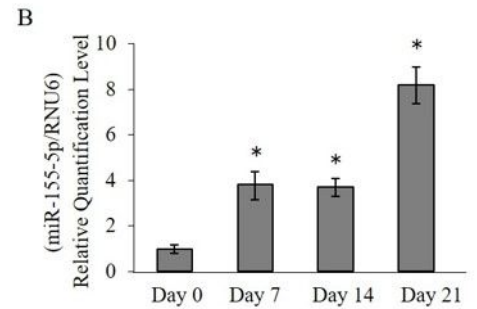
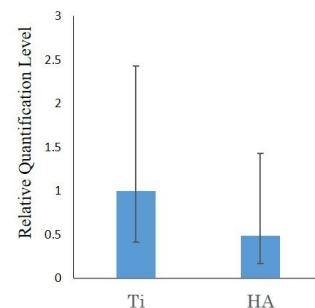


図7 miR155-5p発現定量

#### (5) チタンとハイドロキシアパタイト上での miR-155-5p および骨分化マーカーの発現

MC3T3-E1 細胞をハイドロキシアパタイト、チタンのディッシュ上で骨形成分化培地を用いて 6 時間間培養した後、骨形成分化マーカーである Runx2, Col1a1, Alp, Bglap および miR-155-5p の発現をリアルタイム PCR で検索した。miR-155-5p では有意差はみられなかったが、ハイドロキシアパタイトですべての分化マーカーの発現を増強した (図 8)。

n = 3



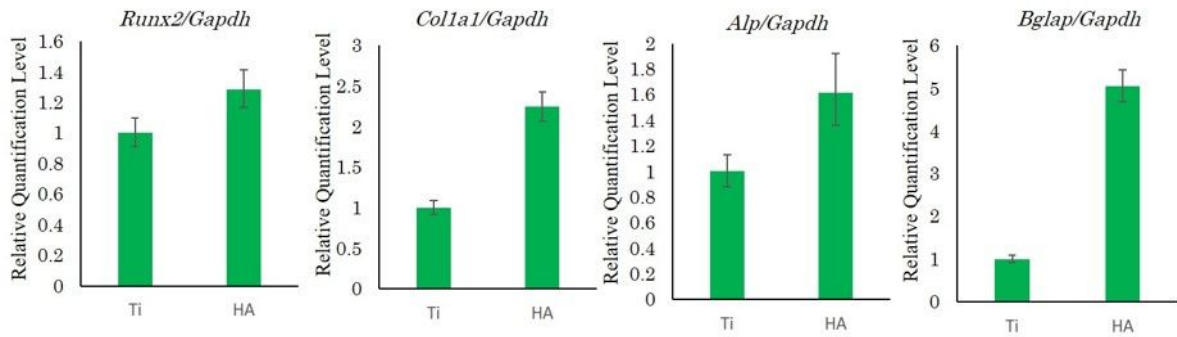


図8 ハイドロキシアパタイトの骨分化マーカーにおける発現定量

### (6)miR-155-5p 過剰発現による骨分化マーカーの発現

MC3T3-E1 細胞は、トランスフェクションによって **miR-155-5p** を過剰発現させ、**real-time PCR** で発現量を検索した。すなわち、**miR155-5p** の発現ベクターを **MC3T3-E1** 細胞にトランスフェクトして、**miR155-5p** を過剰発現させた。**miR-155-5p** の発現レベルは、親細胞の **1.5** 倍の発現がみられた。骨分化の初期マーカーである **Col1a1** および **Runx2** の発現は、親細胞と比較して、**miR-155-5p** 過剰発現細胞で **6** 倍高かった。しかし、中期マーカーである **Alp** の発現レベルに変化はなかった。後期マーカーである **Bglap** の発現は、親細胞と比較して、**miR-155-5p** 過剰発現細胞で **2.5** 倍低かった。n = 4、\* P < 0.01

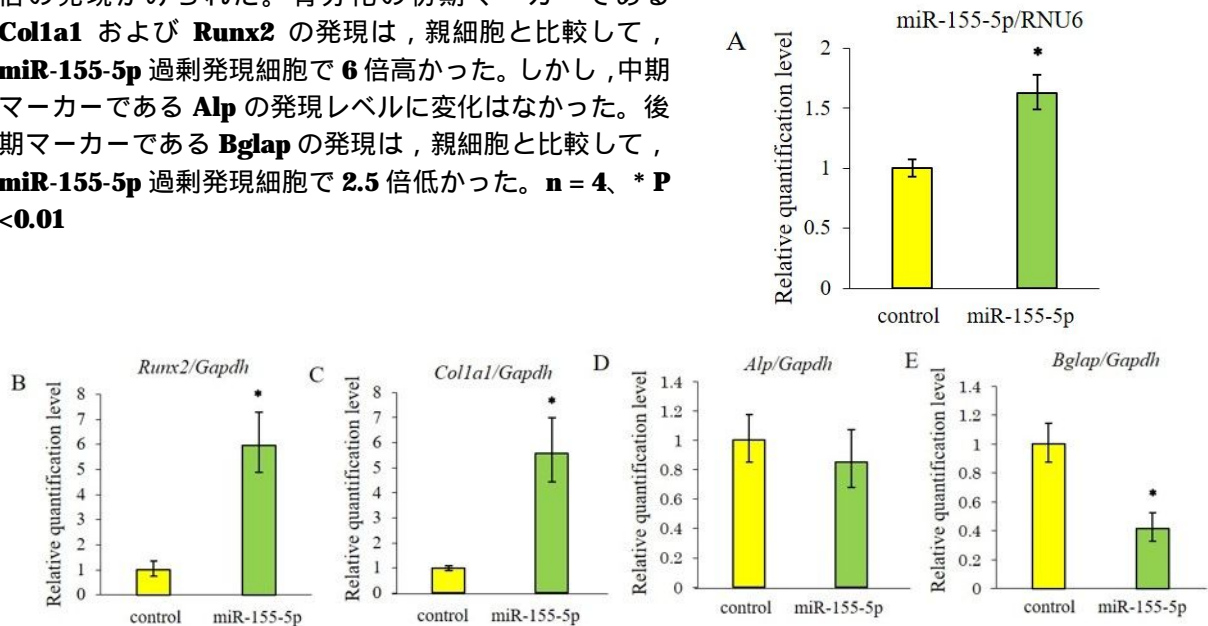


図9 miR-155-5p過剰発現による骨分化マーカーの発現

以上のことより、**miR155-5p** は、ガラス、金およびステンレスと比較して、チタン上の **MC3T3-E1** 細胞における骨芽細胞分化の促進因子として同定されました。

**miR155-5p** は、オッセオインテグレーション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 Yoshiko Yamamura, Yasusei Kudo, Keiko Kudoh, Youji Miyamoto	4. 巻 18
2. 論文標題 Actinomycotic osteomyelitis of the mandible with bone destruction: Two case reports with a review of the Japanese literatures	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral science international	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/osi2.1088	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16件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山村 佳子, 眞野 隆充, 栗尾 奈愛, 工藤 隆治, 工藤 景子, 福田 直志, 宮本 洋二
2. 発表標題 ピロカルピン塩酸塩を用いた口腔リンス法の有用性と安全性の検討
3. 学会等名 第17回日本口腔ケア学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 浩喜, 岩本 勉, 齋藤 早紀, 上田(山口) 公子, 高石 和美, 山村 佳子, 日浅 雅博, 堀内 信也, 田中 栄二
2. 発表標題 本院における口唇口蓋裂児への治療の取り組み,
3. 学会等名 徳島県歯科医学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗尾 奈愛, 鎌田 久美子, 横田 美保, 山村 佳子, 牛尾 綾, 工藤 保誠, 石丸 直澄, 宮本 洋二
2. 発表標題 上顎歯肉に発生した微小嚢胞性付属器癌の1例
3. 学会等名 第38回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山村 佳子, 大江 剛, 工藤 保誠, 栗尾 奈愛, 鎌田 久美子, 福田 直志, 工藤 景子, 眞野 隆充, 石丸 直澄, 宮本 洋二
2. 発表標題 口腔扁平苔癬からの癌化が疑われた口腔扁平上皮癌の4例
3. 学会等名 第38回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山村 佳子, 高石 和美, 中川 弘, 尼寺 理恵, 岩本 勉
2. 発表標題 当科におけるスペシャルニーズ患者の全身麻酔下歯科治療の臨床的検討
3. 学会等名 第36回日本障害者歯科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鎌田 久美子, 栗尾 奈愛, 大江 剛, 工藤 景子, 山村 佳子, 福田 直志, 眞野 隆充, 工藤 保誠, 石丸 直澄, 宮本 洋二
2. 発表標題 上顎歯肉に発生したMicrocystic adnexal carcinoma(MAC)の1例
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗尾 奈愛, 鎌田 久美子, 大江 剛, 横田 美保, 山村 佳子, 工藤 保誠, 石丸 直澄, 宮本 洋二
2. 発表標題 上顎歯肉に発生したMicrocystic adnexal carcinoma(MAC)の1例
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋田 和也, 福田 直志, 鎌田 久美子, 山村 佳子, 工藤 景子, 工藤 隆治, 栗尾 奈愛, 大江 剛, 眞野 隆充, 宮本 洋二
2. 発表標題 ナイロンファイバーをポロゲンとして用いた炭酸アパタイト多孔体の開発と骨再建
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山村 佳子, 玉谷 哲也, 工藤 景子, 栗尾 奈愛, 鎌田 久美子, 大江 剛, 眞野 隆充, 宮本 洋二
2. 発表標題 チタン上で培養したマウス骨芽細胞様細胞のmirVana miRNA-155-5p発現解析
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤 景子, 福田 直志, 秋田 和也, 工藤 隆治, 大江 剛, 栗尾 奈愛, 山村 佳子, 鎌田 久美子, 眞野 隆充, 宮本 洋二
2. 発表標題 ハニカム構造を有する炭酸アパタイト多孔体の開発と下顎骨再建への応用
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗尾 奈愛, 鎌田 久美子, 大江 剛, 横田 美保, 山村 佳子, 工藤 景子, 工藤 保誠, 眞野 隆充, 石丸 直澄, 宮本 洋二
2. 発表標題 歯肉腫瘍により白血病化が明らかとなった骨髄異形成症候群の1例
3. 学会等名 第67回 日本口腔科学会中国・四国地方部会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 工藤 隆治, 工藤 景子, 鎌田 久美子, 福田 直志, 山村 佳子, 栗尾 奈愛, 眞野 隆充, 宮本 洋二
2. 発表標題 Radiomicsを用いた舌癌の頸部リンパ節転移の予測
3. 学会等名 第67回 日本口腔科学会中国・四国地方部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鎌田 久美子, 栗尾 奈愛, 大江 剛, 山村 佳子, 工藤 景子, 工藤 保誠, 石丸 直澄, 宮本 洋二
2. 発表標題 口底に発生した類基底扁平上皮癌の1例
3. 学会等名 第18回中四国口腔癌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鎌田 久美子, 栗尾 奈愛, 工藤 景子, 山村 佳子, 福田 直志, 中川 貴之, 大江 剛, 眞野 隆充, 宮本 洋二
2. 発表標題 開口障害を主訴に来院した破傷風の1症例
3. 学会等名 第48回(公社)日本口腔外科学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤 景子, 鎌田 久美子, 山村 佳子, 大江 剛, 栗尾 奈愛, 秋田 和也, 工藤 隆治, 高橋 章, 眞野 隆充, 宮本 洋二
2. 発表標題 上顎洞内異物迷入8症例の臨床的検討
3. 学会等名 第48回(公社)日本口腔外科学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗尾 奈愛, 鎌田 久美子, 山村 佳子, 工藤 景子, 宮本 洋二
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎の合併症と考えられた難治性口腔潰瘍の一例
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山村佳子、宮本洋二	4. 発行年 2020年
2. 出版社 クインテッセンス出版 株式会社	5. 総ページ数 128
3. 書名 周術期口腔機能管理に実際がよくわかる本, --- 第2章 4. 臓器移植手術と口腔管理 ---	

〔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
研究分担者	福田 直志  (FUKUTA Naoyuki)  (10804156)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教   (16101)	
研究分担者	宮本 洋二  (MIYAMOTO Youji)  (20200214)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授   (16101)	
研究分担者	玉谷 哲也  (TAMATANI Tetsuya)  (30274236)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・非常勤講師   (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	中川 貴之  (NAKAGAWA Takayuki)  (30456230)	広島大学・病院(歯)・助教    (15401)	
研究分担者	工藤 景子  (KUDOH Keiko)  (70380029)	徳島大学・病院・講師    (16101)	
研究分担者	栗尾 奈愛  (KURIO Naito)  (80622141)	徳島大学・病院・講師    (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関