

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592253

研究課題名（和文） 光誘起超両親媒性チタン表面における生体分子および細胞の接着挙動のリアルタイム分析

研究課題名（英文） REAL-TIME ANALYSIS OF BIOMOLECULAR ADSORPTION AND CELLULAR ADHESION ON LIGHT-INDUCED SUPERAMPHIPHILIC TITANIUM SURFACE

研究代表者

大畑 昇 (OHATA NOBORU)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：60002185

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、水晶マイクロバランス(QCM)を用いて光誘起超両親媒性チタン表面における生体分子および骨形成原性細胞の接着挙動のリアルタイム分析を行うことである。本研究の成果より、組織バイオマテリアル界面における相互作用を分子レベルで解明するのに有用であることが示され、光照射により生体分子および細胞の吸着スピードと総吸着量が共に顕著に増加する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate the real-time adsorption behavior of biological molecules and osteogenic cells on a light-induced superamphiphilic titanium surface using a quartz crystal microbalance(QCM). We showed the potential usefulness of QCM in elucidating the sequential interaction of biological molecules and cells with the tissue-material interface at the molecular level. The results suggest that photofunctionalization of Ti boosts the initial adsorption rate and increases the adsorptive capacity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：歯科補綴学

科研費の分科・細目：バイオマテリアル、補綴系歯学

キーワード：バイオマテリアル、チタン、タンパク吸着、細胞接着

1. 研究開始当初の背景

多方面での臨床応用が期待されている再生医療の根幹をなすティッシュエンジニアリングでは、①細胞、②坦体(バイオマテリアル)、そして③増殖因子あるいはサイトカインの3要素がとととも重要である。このうち、坦体として用いられるバイオマテリアルには組織を再生する細胞がそこで増殖・分化するため

の足場(Scaffold)としての役割が期待される。これらを、チタン周囲で起こるオッセオインテグレーションにあてはめるとチタンインプラント表面そのものがScaffoldとしてはたらくことになる。オッセオインテグレーションが成立する過程において、チタンインプラント表面での骨新生(Contact Osteogenesis)が重要であり、このContact

Osteogenesis は、骨芽細胞に分化しつつある細胞がインプラント表面に移動し、その接触部位で成熟骨芽細胞に分化した後に骨形成を行うことにより起こるとされている (Davies, Int J Prosthodont, 1998)。

われわれはこれまでにラットおよびヒト由来の細胞を用いた *in vitro* 実験系ならびに *in vivo* ラットモデルにおいて超両親媒性 (超親水性かつ超親油性) チタン表面の優れた骨伝導能について報告してきた (Aita et al., Biomaterials, 2008)。 *in vivo* のラットモデルにおいては、バイオメカニカル試験でオッセオインテグレーション強度を評価したところ、埋入後2週間の光誘起超両親媒性酸処理チタン表面の骨結合度は、無処理の酸処理チタン表面の3.1倍を示し、埋入後8週の値とほぼ同じであることが示されたことより、この新規インプラントサーフェイスはオッセオインテグレーションの獲得を4倍加速する可能性が示唆された。

さらにラット骨髄由来間葉系幹細胞を用いた *in vitro* の実験系において、光誘起超両親媒性チタン表面が骨芽細胞への分化を妨げずに間葉系幹細胞のチタン表面への接着とそこでの増殖とを2倍に高めることが示され、前述のバイオメカニカル試験の結果を裏付ける根拠になっていると考えている。これらの *in vitro* の実験系のうち、細胞増殖や分化の程度を調べる手法はすでに確立されていて、我々の共同研究者からもいくつか報告されている (Ogawa et al., Int J Oral Maxillofac Implants, 2003, Takeuchi et al., J Biomed Mater Res, 2005)。しかし、この過程のごく初期に起こる生体分子 (各種タンパクなど) や細胞の付着 (接触) についてはいまだに不明な点が多い。従来の研究方法では、あるタイムポイントで *in vitro* や *in vivo* で得られた試料を固定し、免疫染色により標的タンパクを検出したりするような組織計量学的方法や走査電子顕微鏡によるバイオマテリアル表面の観察に頼るしかなく、生体分子や細胞の吸着の継時的変化をより詳細にリアルタイム定量分析できるものはない。

そこで、水晶振動子センサ上で起こる分子や細胞の吸着や解離をピコグラム単位の質量変化としてリアルタイムでとらえることができる画期的な解析装置に注目し、チタン表面における生体分子および骨形成原性細胞の接着挙動のリアルタイム分析を行うことを試みた。

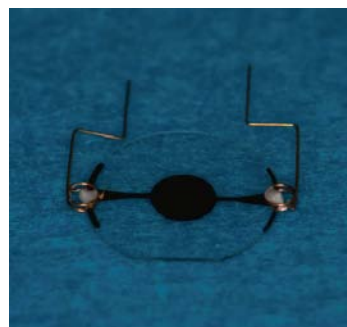
2. 研究の目的

本研究の目的は、生体分子間相互作用定量測定装置を用いて光誘起超両親媒性チタン表面における生体分子および細胞の接着挙動のリアルタイム分析を行うことである。

3. 研究の方法

(1) 試料の準備および表面微細構造解析

生体分子間相互作用定量測定装置の水晶振動子センサは目的に応じて自由にセンサ表面をコーティングや改質ができる。本実験では表面に純チタンをスパッタリングしたチタンコートセンサ (被膜厚さ100 nm、平均粗さ5 nm) を用い、光処理を行わないものを対照群とし、48時間の紫外線照射により光処理機能化したものを実験群とした。QCMセンサ表面の形態および表面粗さはそれぞれ、走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscopy, SEM)、原子間力顕微鏡 (atomic force microscope, AFM) にて評価した。



チタンコート QCM センサ

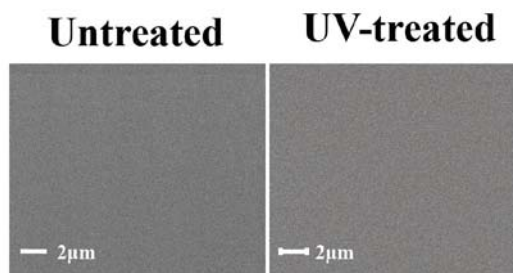
(2) アルブミン吸着挙動ならびに細胞初期接着挙動のリアルタイム解析

チタン表面での細胞ダイナミクスに影響を与えると考えられている生体分子の代表的なものとして、血漿構成タンパク成分のうち最も多くを占めるアルブミンに着目した。アルブミンならびにラット骨髄由来間葉系幹細胞を適度な濃度になるように調整した溶液に QCM コントローラーを浸漬し、連続的に計測した。

4. 研究成果

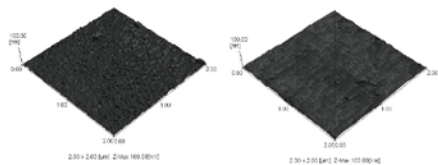
(1) 試料の準備および表面微細構造解析

対照群および実験群のチタンコート QCM センサは表面形態を高倍率にて SEM 観察したところ、表面微細構造に違いは認められなかった。



チタンコート QCM センサの SEM 像

また、AFMでは $2 \times 2 \mu\text{m}$ エリアでの表面粗さを計測したところ、average roughness (Ra) および peak-to-valley roughness (Rp-v) はそれぞれ対照群で $3.40 \pm 0.33 \text{ nm}$ 、 $66.4 \pm 14.7 \text{ nm}$ 、また、実験群で $3.30 \pm 0.81 \text{ nm}$ 、 $61.6 \pm 13.9 \text{ nm}$ を示し、どちらも両群間での有意差は認められなかった。

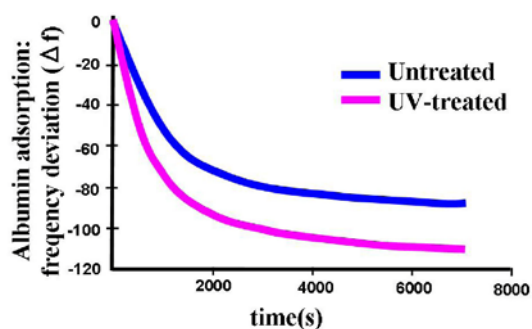


	R _a (nm)	R _{p-v} (nm)	N.S. (N=5)
Untreated	3.40 ± 0.33	66.4 ± 14.7	
UV-treated	3.30 ± 0.81	61.6 ± 13.9	

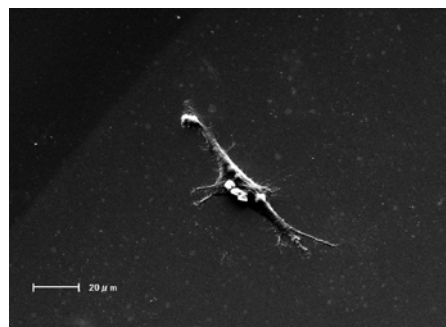
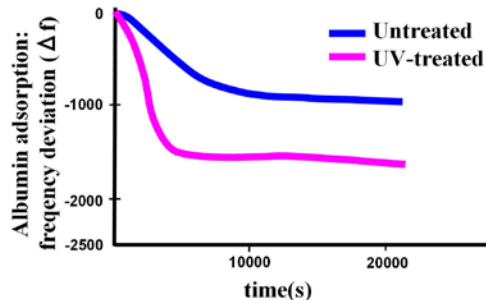
チタンコート QCM センサの AFM 像

(2) アルブミン吸着挙動ならびに細胞初期接着挙動のリアルタイム解析

紫外線処理をしていないチタンコートセンサ表面と比べて、紫外線処理をしたセンサ表面へのアルブミンの吸着スピードは、浸漬開始 40 分以内の初期では 1.4 倍であった。また、アルブミン総吸着量は 1.5 倍に増加していた。



紫外線処理をしていないチタンコートセンサ表面と比べて、紫外線処理をしたセンサ表面では播種後初期の細胞接着スピードと総接着細胞数がそれぞれ 3.8 倍、1.7 倍と増加する傾向が示された。



センサ上の間葉系幹細胞

本研究の結果より、組織 - 材料界面における分子レベルの解析において QCM 装置による計測は有用な手段であることが示された。また、この結果は、チタンの光処理機能化がアルブミンの初期吸着の増加および吸着速度を加速させることを示唆している。今後さらにセンサ周囲の溶液の pH や成分イオンを変えた際の吸着挙動の変化を調べることを目指していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Hori N, Ueno T, Suzuki T, Yamada M, Att W, Okada S, Ohno A, Aita H, Kimoto K, Ogawa T, Ultraviolet light treatment for the restoration of age-related degradation of titanium bioactivity, Int J Oral Maxillofac Implants, 査読有、25 巻、2010、49-62
- ② Aita H, Att W, Ueno T, Yamada M, Hori N, Iwasa F, Tsukimura N, Ogawa T, Ultraviolet light-mediated photofunctionalization of titanium to promote human mesenchymal stem cell migration, attachment, proliferation and differentiation, Acta Biomater, 査読有、5 巻、2009、3247-57
- ③ Aita H, Hori N, Takeuchi K, Yamada M, Suzuki T, Anpo M, Ogawa T, The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone, Biomaterials, 査読有、30 巻、2008、1015-1025

[学会発表] (計 25 件)

- ① 坂田美幸、光処理機能化チタン表面におけるタンパク質吸着および初期細胞接着のリアルタイム計測、第40回日本口腔

インプラント学会学術大会、平成22年9月18日、産業振興センター(札幌)

- ② Sakata M、Real-time analysis of albumin adsorption on UV-photofunctionalized titanium surface、IADR 88th General Session、平成22年7月15日、バルセロナ(スペイン)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大畑 昇 (OHATA NOBORU)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：60002185

(2) 研究分担者

會田 英紀 (AITA HIDEKI)
北海道医療大学・歯学部・講師
研究者番号：10301011
上田 康夫 (UEDA YASUO)
北海道大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：30241342

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

小川 隆広 (OGAWA TAKAHIRO)
カリフォルニア大学・歯学部・教授
坂田 美幸 (SAKATA MIYUKI)
北海道大学・大学院歯学研究科・大学院生