

平成22年 6月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間： 2008～ 2009
課題番号：20791474
研究課題名 (和文) 細胞動態リアルタイム解析によるティッシュインテグレーション促進インプラントの開発
研究課題名 (英文) The development of implant surface to promote soft tissue integration using real-time cell analysis
研究代表者
正木 千尋 (MASAKI CHIHIRO)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：60397940

研究成果の概要 (和文)：

より早期にオッセオインテグレーションを獲得する方法として、チタンの表面改質は世界中のトピックスであり、研究者がしのぎを削っている。インプラント表面への骨結合のみでなく、粘膜貫通部への軟組織の結合であるティッシュインテグレーションの概念が生まれ、粘膜貫通部にも粗な表面性状をもつインプラント体が使われ始めているものの、改質されたチタン表面が歯肉上皮細胞の運動性に対し、どのような影響を及ぼすかについてはほとんど報告されていない。そこで本研究では、さまざまなチタン表面における細胞動態を評価することで、オッセオインテグレーションだけでなく、ティッシュインテグレーションを可能とするチタンインプラントを開発することを目的とした。

まず、マウス正常歯肉上皮細胞 (GE1細胞) を使用し、3次元培養システムを用いて培養し、メカニカルストレスを加えることにより炎症を誘導させた。チタン表面に接したGE1細胞にメカニカルストレスを加えると、炎症誘導物質として知られるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) のmRNAやタンパクの発現が亢進し、プロスタグランジンE2の産生も増加した。また、その過程でMAPKシグナル経路やNFκBシグナル経路が活性化することが明らかとなった。さらに、2000kDaのヒアルロン酸を作用させることで、MAPKシグナル経路やNF-κBシグナル経路が抑制され、またCOX-2やプロスタグランジンE2の産生も低下することから、メカニカルストレスにより誘導される炎症反応が抑制されることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

The purpose of this study is to examine the inflammatory mediators induced by mechanical stress in mouse gingival epithelial cells. In order to determine the effect of static compressive force, GE1 cells were cultured in a three dimensional collagen gel system (3D-gel). Compressive force was applied using titanium plate placed over the gels, which was adjusted by adding weight. GE1 cells were subjected to 2.5~10.0 g/cm² of compressive force for 3 h, or 7.5 g/cm² for 1~48 h. After the application of compressive force, total RNA was extracted and the expression levels of COX-1 and COX-2 were analyzed by RT-PCR. The amount of PGE₂ released into culture medium was measured by ELISA. Under the compressive force, the expression of COX-2 mRNA in GE1 cells increased in a force dependent manner up to 7.5 g/cm². The time-course experiment showed that COX-2 mRNA increased when the cells were cultured for 6 h, but the expression slightly reduced after 12 h. On the other hand, COX-1 mRNA expression was not changed. The compressive force enhances the release of PGE₂ in the conditioned medium compared with the control group. These results demonstrated that mechanical stress enhanced PGE₂ production from GE1 cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：歯学，再生医学，細胞・組織，表面・界面物性，シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

より早期にオッセオインテグレーションを獲得する方法として、チタンの表面改質は世界中のトピックスであり、研究者がしのぎを削っている。申請者らも現在まで、改質されたチタン表面に対する骨芽細胞の接着様式や骨分化マーカーの発現等、多くの検討を行い、改質されたチタン表面が骨芽細胞の運動性にどのような影響を及ぼしているかについて明らかにしてきた。一方、インプラント表面への骨結合のみでなく、粘膜貫通部への軟組織の結合であるティッシュインテグレーションの概念が生まれ、粘膜貫通部にも粗な表面性状をもつインプラント体が使われ始めているものの、改質されたチタン表面が歯肉上皮細胞の運動性に対し、どのような影響を及ぼすかについてはほとんど報告されていない。申請者らはこの問題に取り組み、予備実験において、培養液中の pH を調整することで長時間にわたる細胞動態をリアルタイムで観察することに成功した。歯肉上皮細胞に最適なチタン表面形状を見つけることが可能となり、将来的に骨形成促進を可能とするだけでなく、チタン表面と歯肉上皮細胞とのティッシュインテグレーションが可能となり、インプラント周囲の感染を予防する上で有益な知見が得られると考える。

2. 研究の目的

これまで早期にオッセオインテグレーションを獲得することを目的としてチタン表面と骨芽細胞との関係についてのみの研究が多く行われており、チタン表面と粘膜貫通部のティッシュインテグレーションに関する研究はほとんど行われていない。また、これまでの研究ではさまざまなインプラント表面の比較は全て細胞を固定した状態で検討されている。この手法は煩雑な上、洗浄処

理による細胞の喪失や固定液による細胞変性などが問題点として挙げられる。細胞の形態変化および移動様式をリアルタイムで詳細に観察することができればこれらの問題が解決するだけでなく、細胞にとって最適な表面形状が一目瞭然で明らかとなることから、この手法を用いた研究が強く望まれている。そこで、細胞動態リアルタイム解析テクノロジーを用いることにより、歯肉上皮細胞の形態変化や細胞移動とチタン表面の関係を明らかにすることができると考えた。また、骨芽細胞が好む表面性状との違いを明らかにすることにより、インプラント周囲の組織再生誘導を選択的に行うことができるインプラント体の開発につながる。そこで、チタン表面性状が歯肉上皮細胞に及ぼす影響を検討し、オッセオインテグレーションだけでなく、ティッシュインテグレーションが可能とするメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) さまざまな表面性状をもつチタンディスク上にマウス正常歯肉上皮細胞 (GE1 細胞) を 1%FBS 含有 SFM-101 培地中で培養し、リアルタイムで細胞の運動性地中で培養し、リアルタイムで細胞の運動性 (長さ、大きさ、移動速度、距離、方向、偽足の数等) を評価した。
- (2) マウス正常歯肉上皮細胞 (GE1 細胞) を 1%FBS 含有 SFM-101 培地中で 3 次元培養システムを用いて培養し、チタンディスクを用いてメカニカルストレスを加えることにより炎症を誘導させた。炎症を誘導させたあと、ヒアルロン酸を添加することにより、炎症抑

制効果の検討を行った。ストレス負荷後に total RNA を抽出するだけでなく、タンパクを抽出し、それぞれ RT-PCR 解析およびウエスタンブロッティング解析を行った。さらにメディアウム中に放出された PGE2 を ELISA により解析した。

- (3) マウス由来正常歯肉上皮細胞 (GE1 cell) を 2.0×10^5 cell/ml で播種し、超音波ゲルを介して6穴の培養用プラスチック下面より SFM-101 培地中で培養した。GE1 細胞を 24 時間培養後、周波数 3MHz、出力 240mW の低出力パルス超音波

(LIPUS) を 15 分間照射した。LIPUS 照射 12 時間後に細胞を回収し、LIPUS を照射しない群をコントロール群とした。回収した細胞から total RNA を抽出し、マイクロアレイ (NimbleGen System) を用いて 42586 種類の遺伝子発現の網羅的解析を行った後、発現量の増加が認められたいくつかの遺伝子に関してリアルタイム PCR により検討を行った。また、LIPUS 照射 30 分後、1 時間後、3 時間後、6 時間後、9 時間後に細胞を回収し、ウエスタンブロッティング法を用いてタンパク量の検討を行った。

4. 研究成果

- (1) 細胞の運動性を評価する 2 次元パラメータ (長さ、大きさ、移動速度、距離、方向、偽足の数など) を分析したが、大きな差は認められなかった。
- (2) チタン表面に接した GE1 細胞にメカニカルストレスを加えると、炎症誘導物質として知られるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の mRNA やタンパクの発現が亢進し、プロスタグランジン E2 の産生も増加した。また、その過程で MAPK シグナル経路や NFκB シグナル経路が活性化することが明らかとなった。さらに、2000kDa のヒアルロン酸を作用させることで、MAPK シグナル経路や NF-κB シグナル経路が抑制され、また COX-2 やプロスタグランジン E2 の産生も低下することから、メカニカルストレスにより誘導される炎症反応が抑制されることが明らかとなった。GE1 細胞にメカニカルストレスを負荷すると、COX-2 の発現が亢進し、PGE2 の産生も増加した。この炎症メカニズムは細胞内シグナル伝達の MAPK や NF-κB 経路の活性化により引き起こされることが示唆された。また、細胞にヒアルロン酸を作用させると、COX-2 の発現が減少し、PGE2 の産生も抑制された。さらに細胞内シグナル伝達である MAPK や NF-κB の活性化も抑制されることが示唆された。

- (3) マイクロアレイ法を用いた遺伝子解析により 2.5 倍以上 up-regulate された遺伝子数は 18 で 2 倍以上認められた遺伝子数は 213 であった。一方、2.5 倍以上 down regulate された遺伝子数は 1127 で 2 倍以上は 1945 であった。FGF12, FGF14 に関しては 2 倍以上の up regulate が認められ、また FGF receptors に関しては FGFR3 において 3 倍以上の down regulate が認められた。細胞接着タンパクである Cadherin7, 8, 12 において 2 倍以上の up regulate が認められた。その他の Cadherin に関しては大きな変化は見られなかったものの、2 倍以上 down regulate される Cadherin は認められなかった。また、Contactin や Claudin などの細胞接着関連遺伝子の発現上昇が認められた。発現上昇の認められた 4 つの遺伝子に関してリアルタイム PCR 法を用いて検討したところ、Cldn-16 以外の FGF-12 や細胞接着に関連する Cadherin-8, -10 において発現量の増加が認められたものの、発現量は非常に少なく、大きな差は認められなかった。

一方、組織修復や細胞増殖、血管新生に関わる重要なサイトカインとして注目されている CCN2/CTGF をウエスタンブロッティング法を用いて検討したところ、照射 1 時間後にタンパク発現量の増加が認められた。以上より、LIPUS 照射によりいくつかの遺伝子発現が up regulate されることが明らかとなり、粘膜治癒促進に関与している可能性が示唆された。

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 1 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Toshinaga A., Masaki C., Hosokawa R. and Nishikawa T., Mechanical stress enhances the production of inflammatory mediators from gingival epithelial cells. 第 9 回国際炎症学会, 2009. 7. 6-10. 東京
- ② 白石龍太郎, 正木千尋, 壽永旭博, 牧野路子, 原哲三, 中本哲自, 細川隆司, マウス由来歯肉上皮細胞に及ぼす低出力超音波パルスの影響について, 第 39 回日本口腔インプラント学会学術大会, 2009. 9. 25-27. 大阪

- ③壽永旭博, 正木千尋, 白石龍太郎, 嶋田潔,
中本哲自, 細川隆司, 歯肉上皮細胞におけ
るヒアルロン酸の炎症抑制効果について,
第 39 回日本口腔インプラント学会学術大
会, 2009. 9. 25-27. 大阪
- ④白石龍太郎, 正木千尋, 中本哲自, 細川隆
司, 低出力超音波パルスが歯肉上皮細胞に
及ぼす影響について, 平成 21 年度日本補
綴歯科学会九州支部学術大会, 2009. 10. 11,
福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

正木 千尋 (MASAKI CHIHIRO)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：60397940