

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10007

研究課題名（和文）リン酸カルシウム遺伝子導入剤による機能性抗菌コーティングのインプラント周囲炎応用

研究課題名（英文）An application of the multi-functionalized calcium phosphate nanoparticle on implantitis

研究代表者

天雲 太一（Tnkumo, Taichi）

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：80451425

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）：細菌感染したチタン表面に銀イオンを添加後、UVA照射することでヒドロキシラジカルが発生し、チタン表面の接触角が改善することで細胞親和性が向上することが明らかとなった。また、リン酸カルシウム（CaP）のチタン表面への付着量は電流を流すことによって増加した。さらにCaPに搭載する plasmidDNAの候補を検索したところ、BMP-2、IGF1およびVEGFを組み合わせることで硬組織形成量が増えること、テノモジュリンは硬組織形成抑制作用を示すことが明らかとなった。また、オクタアルギニンを付与したCaPをアミロライド溶液と併用することで遺伝子導入効率が向上することを *invivo* で証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インプラント治療は世界的に普及する歯科治療方法となった半面、インプラント周囲炎に対する有効な治療方法がないことが問題となっている。本研究では、ヒドロキシラジカル療法が感染インプラント表面の細胞親和性を回復させること、骨誘導機能を持つ機能性リン酸カルシウムナノ粒子を適用することで、オステオインテグレーションの再獲得に有利な環境を構築できる可能性を示した。歯科インプラントだけでなく、人工精製物を生体に移植し、失った機能を回復させる治療方法は今後、多くの医療分野で応用されていくものと思われる。このような医療発展の流れの中で、感染インプラントに対する治療方法を提示した本研究結果は社会的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：UVA irradiation with silver ion treatment on infected titanium surface not only disinfected biofilm, but also improved cell affinity of titanium surface by the generated hydroxy radical. The volume of attached CaP nanoparticle on titanium surface after UVA irradiation with silver ion treatment was increased under the electronic stimulation, while it was not significantly depended on UVA irradiation time or intensity. Next, the effective bone formation of combination of growth factors associated bone formation was investigated. As a result, the combination with BMP-2, IGF-1 and VEGF significantly formed new bone formation, while tenomodulin inhibit bone formation. On the other hand, the CaP loading octa-arginine with amiloride solution increased the gene transfection efficiency in vivo.

研究分野：歯周病

キーワード：インプラント周囲炎 リン酸カルシウム 遺伝子導入 ヒドロキシラジカル

1. 研究開始当初の背景

近年歯科用インプラントの生着率の向上と規格化された治療方法の確立により歯科インプラント治療の成功率は格段に飛躍した。一方で、早期オステオインテグレーションの獲得のために発達したインプラント表面の超微細構造は、ひとたび感染した場合には逆に機械的な細菌除去を困難とし、インプラント周囲炎の治療を妨げる要因となっている。インプラント周囲炎療法としては、これまでに超音波洗浄、チタンブラシなどによる機械的除去に加えてレーザー療法、メチレンブルーを併用した光線力学療法などが報告されているが、再建的な治療法を支持するエビデンスはまだ乏しい。この原因としてレーザーなどが届かない部位が生じ殺菌作用が及ばないこと、インプラント表面の再汚染、インプラント体の表面性状の細胞親和性の回復が不十分であることが考えられる。そのため、汚染インプラント表面の除菌だけでなく、表面性状を回復し、骨付着を誘導する治療方法が必要となる。

研究代表者は、これまでに活性酵素の一つであるヒドロキシラジカルに着目し、Ag イオンに UVA 照射を併用する(以下 UVA 照射-Ag イオン併用療法)ことで一過性のヒドロキシラジカルを発生させ、歯周病菌の殺菌に有効であることを報告してきた (Sci Rep. 2020, 10, 8553)。これとは別に、研究代表者は、非ウイルス型リン酸カルシウム遺伝子導入ナノ粒子(以下 CaP)を開発し、様々な plasmid DNA や siRNA を搭載することで、組織再生の場において目的の遺伝子を遺伝子導入できること、これによって骨組織形成や炎症抑制できることを報告してきた (Materials Science & Engineering C. 2018, 92, 172-183., Acta Biomater. 2020,105, 263-279)。リン酸カルシウムは骨の主要成分であり、生体親和性が高い。そこで、UVA 照射-Ag イオン併用療法によって殺菌されたインプラント表面に CaP ナノ粒子を用いて骨誘導できる機能層を形成できればインプラント周囲炎に対して再建的な治療を開発できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、UVA 照射-Ag イオン併用療法後のインプラント表面の表面性状を解析すること、UVA 照射-Ag イオン併用療法後のインプラント表面に CaP を応用し骨誘導できる機能層を形成するための適用条件を検索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) UVA 照射-Ag イオン併用療法による DMP0-OH の発生量と殺菌効果検証

細菌は、歯の表面に biofilm を形成する菌の一つである *Streptococcus mutans* (以下 *S. mutans*) と骨髄炎原因菌とされている *Staphylococcus aureus* (以下 *S. aureus*) を用いた。*S. mutans* について、細菌の懸濁液 75 μ L (最終濃度: 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} CFU/mL) に対し、硝酸銀溶液 75 μ L (最終濃度: 150、750 μ M) 及び 50 μ L の DMP0 を加え、UVA (365nm、1000 mW/cm²) を 1 分間照射した。発生した DMP0-OH を電子スピン共鳴 (ESR) 法 (JES-FA-100) を用いて捕捉し、その波形及び濃度を計算し、細菌数と発生する DMP0-OH の関係を検証した。また、細菌の懸濁液 75 μ L (最終濃度: 10^7 CFU/mL) に対し、硝酸銀溶液 75 μ L (最終濃度: 300 μ M) 及び 50 μ L の DMP0 を加え、UVA (365nm、385nm、および 400nm、1000 mW/cm²) をそれぞれ 1、2、3 分間照射した。発生した DMP0-OH を同様に ESR にて補足し、照射時間と発生する DMP0-OH の関係を検証した。

一方、サンドブラスト及び、リン酸エッチングによってインプラント表面を模倣したチタンディスク表面に *S. aureus* の biofilm を作成した。感染チタンディスクを硝酸銀 (最終濃度: 200、400、600、800、100、1200、1400、1600 μ M) に浸し、波長 400nm の UVA を 1 分間照射した (以下 Ag(+)-L(+))。その後、1 型コラゲナーゼ及び、ディスパーゼの混合溶液を用いて細菌を抽出、培養 48 時間後の細菌増殖をコロニー形成単位 (CFU) を用いて測定することで殺菌効果を検証した。比較対象群として、硝酸銀のみ (Ag(+)-L(-)) 及び無処理群 (Ag(-)-L(-)) を設定し、同様に 1 分間暗室に静止させ、上記と同様に評価した。また、UVA 照射-Ag イオン併用療法の *S. aureus* に対する殺菌作用について、ESR 法を用いて検証した。

(2) UVA 照射-Ag イオン併用療法後のチタン表面性状評価及びリン酸カルシウム層の形成評価

感染チタンは (1) と *S. aureus* を用いて同様の方法で作成した。細胞親和性を調べるため、非感染チタン、感染チタン、非感染チタン UVA 照射-Ag イオン併用療法 (Ag: 1600 μ M、UVA400nm、照射時間: 1 分間、照射強度 1000mW/cm²)、および感染チタン UVA 照射-Ag イオン併用療法 (Ag: 1600 μ M、UVA400nm、照射時間: 1 分間、照射強度 1000mW/cm²) 後のチタンの表面の接触角の測定 (協和界面科学 (株) 接触角計 CA-X) を計測した。続いて感染チタンディスクに硝酸銀 (1.6 mM) を適用し、UVA (400nm、照射時間: 1、2、3 分間照射、照射強度: 500、1000 mW/cm²) 処置を行った。(3) に記載した方法で作成したリン酸カルシウムナノ粒子 (以下 CaP) をチタンディスク表面に播種し、自然乾燥させた。その後に超純水中に浸漬し、1 分間振動を加えた。その後、自然乾燥させ、SEM 観察を行った。また、同様に感染チタンディスクに硝酸銀 (1.6 mM) を適用し、UVA 照射 (400nm、照射時間: 1 分間、照射強度 1000mW/cm²) したのち、チタンディスク

表面に CaP を加え、0.5V の電圧を 10 秒間かけた。その後に超純水中に浸漬し、1 分間振動を加えた後、再び自然乾燥させ、SEM 観察を行った。対象群として、電圧をかけない群を設定し、同様に超純水中に浸漬し、1 分間振動を加えた後、再び自然乾燥させて SEM 観察を行った。

(3) in vivo における CaP 遺伝子導入剤を用いた骨形成の検証

硝酸カルシウム (18mM、pH9.0) 及びリン酸二アンモニウム (10.8mM、pH9.0) を等量混和し、リン酸カルシウムナノ粒子のコアを作成。その後、作成したコアに対して BMP-2 をコードした plasmid DNA (pUC-57 (BMP-2)) を添加後、再び、硝酸カルシウム溶液及びリン酸二アンモニウム溶液を加え、最後にオクタアルギニンを加えた。その後 120000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄みを捨てたのち、最終的に超純水 (MQ) もしくはアミロライド溶液を加え再度懸濁液とした。その後、直径 5 mm 高さ 1.5 mm に調整されたコラーゲン scaffold (Atelocollagen Sponge、MIGHTY、KOKEN) に注入し、それぞれの群を CaP/BMP2/R8+MQ 群、CaP/BMP2/R8+アミロライド群と命名した。コントロール群として、コラーゲン scaffold のみ (scaffold alone 群、JetPEI (liner polyethylenimine : 以下 JetPEI 群) を設定した。動物実験は国立大学法人東北大学実験動物の管理と使用に関する指針に従い、動物実験専門委員会の許可を得て行った。全身麻酔下で Wister 系ラット (雄、7 週齢) の頭蓋骨に直径 5 mm の骨欠損モデルを作成し、あらかじめ準備したコラーゲン scaffold を移植し、縫合した。28 日後、 μ CT を撮影し、骨形成量を計測した。

(4) 骨形成関連成長因子の組み合わせが骨形成に及ぼす影響

Atelocollagen (直径 5 mm、高さ 1.5 mm) に BMP-2 もしくは、BMP-2 と IGF-1 もしくは、BMP-2、IGF-1 と VEGF を含浸させ、さらに、コラーゲン中性溶液 (RPMI1640) でコーティングした。それぞれ、BMP-2 群、BI 群、BIV 群とした。何も含浸させていない群を scaffold alone 群とした。すべての動物実験は国立大学法人東北大学実験動物の管理と使用に関する指針に従い、動物実験専門委員会の許可を得て行った。全身麻酔下で C57BL/6Jcl マウス (オス、7 週齢) の頭蓋骨骨膜を除去し、骨組織を一層削合後に上記試料を設置して緊密に縫合した。処置後 28 日目の硬組織形成について μ CT 解析および組織学的観察を行った。

(5) テノモジュリンが骨形成に及ぼす影響

テノモジュリンをコードした Plasmid DNA を使用し、(3) と同様の方法で CaP (以下 CaP (Tnmd)) を作成した。比較対象群として、テノモジュリンをコードした plasmid DNA を搭載した JetPEI (Tnmd) 群、骨形成に影響を及ぼすことがないことが知られている緑色蛍光色素遺伝子 (EGFP) をコードした plasmid DNA を搭載した CaP (EGFP)、コラーゲン scaffold のみである scaffold alone 群を作成した。動物実験は国立大学法人東北大学実験動物の管理と使用に関する指針に従い、動物実験専門委員会の許可を得て行った。全身麻酔下で Wister 系ラット (雄、8 週齢) の頭蓋骨に直径 5 mm の骨欠損モデルを作成し、あらかじめ準備したコラーゲン scaffold を移植し、縫合した。28 日後、 μ CT を撮影し、骨形成量を計測した。

4. 研究成果

(1) UVA 照射-Ag イオン併用療法による biofilm への殺菌効果と表面性状の検証

図 1 に細菌濃度別 DMPO-OH の発生量を示す。硝酸銀濃度 150 μ M の場合、DMPO-OH の補足量は細菌数が 1×10^8 の場合が最も高い値を示したのに対し、硝酸銀濃度が 750 μ M の場合は細菌数が 1×10^{10} であった。このことから、細菌数によって至適硝酸銀濃度が異なり、硝酸銀濃度が小さい場合は至適細菌数が小さくなる傾向が認められた。一方、UVA の照射時間を延ばすと補足される DMPO-OH 量は増加した。このことから、照射時間を延ばすことでより高い殺菌効果が得られる可能性を示した。

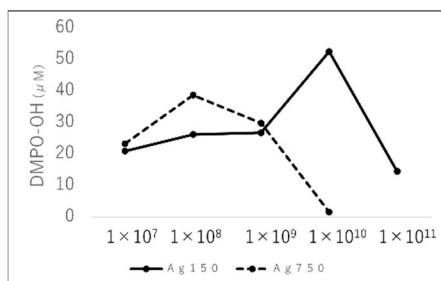


図1：細菌濃度別DMPO-OH発生量

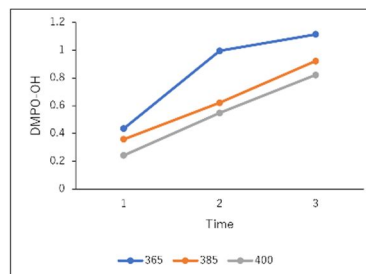


図2：照射時間別DMPO-OH発生量

続いて S. aureus の biofilm に対する殺菌効果を検証した。その結果、Ag(-)L(-)と比較して、Ag(+)L(+)、Ag(+)L(-)群は硝酸銀濃度：200 μ M 以上において有意に高い殺菌作用を示した (図 3)。一方、Ag(+)L(-)と比較すると、硝酸銀濃度：1400 μ M 以上において Ag(+)L(+)群は有意に高い殺菌効果を示した。また、ESR 法から細菌 (-)Ag(+)L(+)群において DMPO-OH の発生が認められたことからチタンディスク上で Ag イオンが助触媒として機能した可能性がある (図 4)。一方、細菌-銀-UVA の組み合わせの場合、細菌 (-)Ag(+)L(+)群よりも有意に高い DMPO-OH の発生量が認められ、その波形からヒドロキシラジカルであることが明らかとなった。細菌と銀が複合体

を形成することで、助触媒としての作用が強くなった可能性が示唆された。

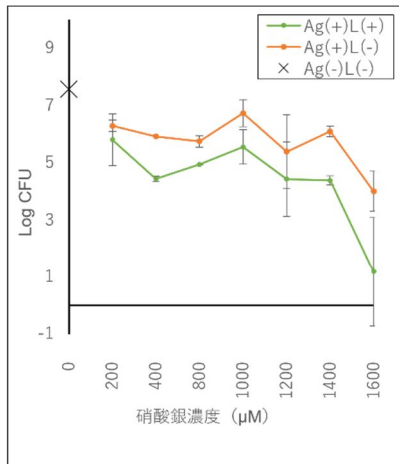


図3：硝酸銀濃度別殺菌効果

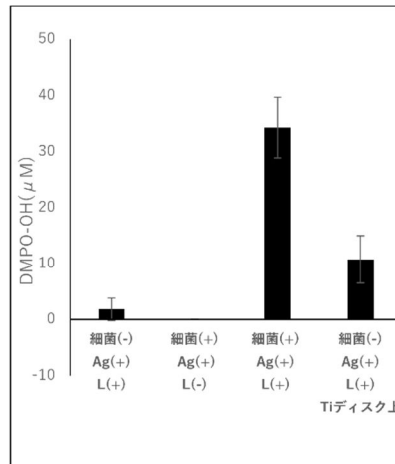


図4：DMPO-OH濃度

(2) UVA 照射-Ag イオン併用療法後のチタン表面性状評価

図5に各処理後のチタン表面の接触角を示す。チタンディスクの接触角は、感染チタンディスクでは接触角が小さくなったが、UVA 照射-Ag イオン併用療法によって感染前と同等レベルまで回復した。これは、UVA 照射-Ag イオン併用療法によってヒドロキシラジカルが発生することによって、感染チタン表面の親水性が改善したのではないかとと思われる。これらの結果、UVA 照射-Ag イオン併用処置は殺菌作用と感染チタン表面の細胞親和性を回復する新しいインプラント周囲炎治療法となる可能性があることが示唆された。

続いて、UVA 照射-Ag イオン併用療法後に CaP ナノ粒子を適用後のチタン表面の SEM 像を図6に示す。チタン表面への CaP の付着量は UVA 照射時間や照射強度から受ける影響は少なかった(図6A)。CaP 適用後に微電流を流すことによって、チタン表面に多くの CaP が付着していることが観察された(図6B)。

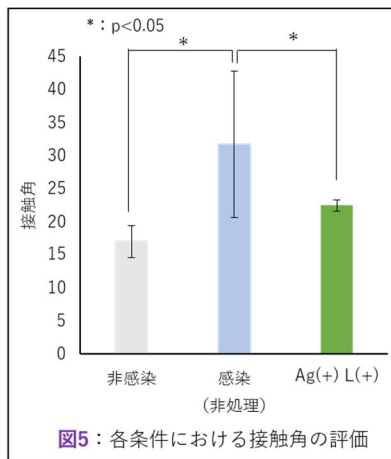


図5：各条件における接触角の評価

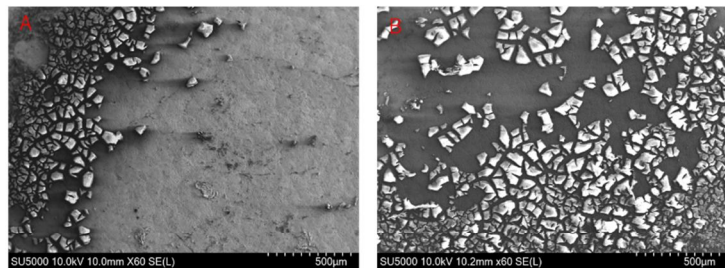


図6 CaP適用後のチタン表面

(3) in vivo における Cap 遺伝子導入剤を用いた骨形成の検証

殺菌処理後のインプラント表面に硬組織を誘導する機能層を形成することによって失った骨付着を再度獲得試できるのではないかと仮説を立てた。そこで、研究代表者がこれまで開発してきたリン酸カルシウムナノ粒子を基材とした遺伝子導入技術に着目した。遺伝子導入とは、外来遺伝子を細胞に導入し、特定の遺伝子を発現させる技術であり、この技術を応用することで、骨形成関連細胞成長因子を徐放させ、骨付着が起こりやすい環境を構築することを検討した。まず初めに、in vivo で高い遺伝子導入効率を発揮する遺伝子導入剤の開発を試みた。骨形成量はオクタアルギンを付与した CaP を含浸したアミロライド群 (CaP/BMP2/R8+アミロライド) が、市販の polyethylenimine 系遺伝子導入剤 (JetPEI) 群や (CaP/BMP2/R8+MQ) と比較して有意に高い値を示した(図7)。CaP/BMP2/R8+アミロライドについて、in vitro では、骨系細胞に対して高い遺伝子導入効率を示すことを示しており (Vanegas Sáenz JR, Tenkumo T, et al PLoS One. 2017 N;12:e0188347.) 本研究の結果、この作用は骨組織造成療法においても有効であることが確認できた。これらの研究結果については現在論文にまとめ、投稿中である。

(4) 骨形成関連成長因子の組み合わせが骨形成に及ぼす影響

骨組織再生の場には様々な細胞成長因子が発現しており、お互いに相互作用している。そこで、上記遺伝子導入剤 (CaP) に搭載する遺伝子を決定するため、前段階として骨組織内で観察され

る成長因子である BMP-2, IGF-1 及び血管形成促進因子である VEGF を組み合わせ、適用 28 日後の骨形成量を比較評価した(図 8)。BMP-2 単独よりも、BI 群及び BIV 群で、有意に高い骨形成量を示した。さらに BIV 群は他群と比較して有意に高い値を示した。血管は、組織に必要な細胞や栄養素、酸素や二酸化炭素などのガス交換などの役割を担っている。本研究結果から、骨形成関連成長因子である BMP-2 と IGF-1 を組み合わせることが、効果的に骨組織が形成できること、さらに VEGF を加えて再生の場に血管を導入することで、より骨形成に効果的な環境を構築したため、骨組織形成量が増加したのではないかと考えられる。これらの研究結果についても現在、論文としてまとめ国際学術雑誌に投稿中である。

(5)テノモジュリンが骨形成に及ぼす影響

骨は成長とともに代謝を繰り返し、3 次的にその形態を変えていく。天然歯は歯根膜組織の介在によって顎骨の成長とともに 3 次的に適切な位置に移動していくが、インプラントは直接骨と付着しているため、常にその場所に存在し続ける。そのため、例えば、成長期にインプラント治療を受けた場合、その後の成長で取り残され、成長期が終了したときには、歯茎のラインや咬み合わせが合わないなど機能性のないインプラントが出来上がる。そのため、インプラント治療は成長期の患者には原則適用できない。この課題を解決するため、インプラントに歯根膜のような靱帯祖域を組み込むシステムの構築について広く研究されている。テノモジュリンは靱帯に観察される膜貫通型タンパクであり、靱帯細胞の増殖やコラーゲンの成熟にかかわっているとされる。そこで、本研究では、遺伝子導入剤である CaP や JetPEI にテノモジュリンを搭載し、テノモジュリンの骨形成に及ぼす効果を検証した。骨欠損部に plasmid-DNA (テノモジュリン) 含有コラーゲンを移植し、28 日後の骨形成量を比較検証した結果を図 9 に示す。テノモジュリンを骨再生の場に遺伝子導入することによって、骨形成が抑制されることが観察された。しかし、その効果は遺伝子導入剤に影響され、周囲環境のカルシウム濃度がテノモジュリンの効果に影響を与える可能性が示唆された。この研究結果については、すでに論文にまとめ、(Wang H, Tenkumo T, et al. Regen Ther. 2023;22:99-108.) に掲載された。

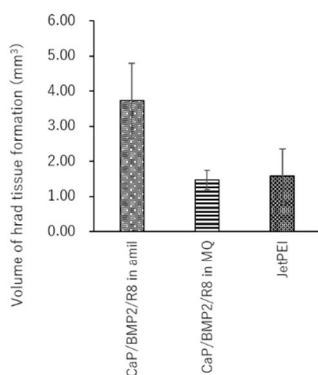


図7 移植28日後の骨形成量

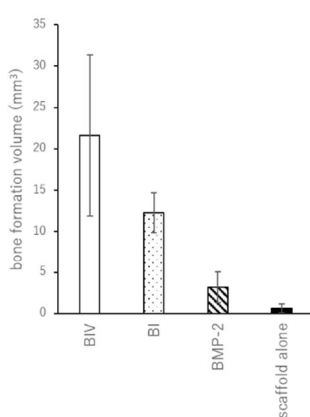


図8 移植28日後の骨形成量

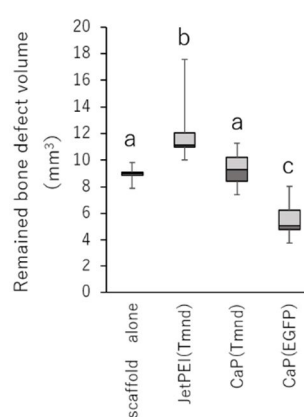


図9 移植28日後の骨形成量

(まとめ)

本研究ではUVA 照射-Ag イオン併用処置をすることで、ヒドロキシラジカルが発生し、インプラント表面の殺菌と感染チタン表面性状を細胞親和性の高い表面に回復できることを明らかにした。次いで、インプラント周囲炎への殺菌療法後の骨再生を念頭に、骨付着を誘導しやすい環境の構築について検証した。その結果、インプラント表面に適用する機能性リン酸カルシウムとしては、オクタアルギニンを搭載した CaP とアミロライド溶液を併用することで、ほかの非ウイルス性遺伝子導入剤と比較して高い遺伝子導入効率を有することを示すことができた。また、細胞賦活因子は BMP-2、IGF-1、および VEGF を組み合わせることで硬組織形成量が増えるが、テノモジュリンを遺伝子導入すると、硬組織再生を抑制することが明らかとなった。今後は本研究で得られた結果を取り込んだ包括的なインプラント周囲炎療法を構築していく。

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 Wang H, Tenkumo T, Nemoto E, Kanda Y, Ogawa T, Sasaki K.	4. 巻 22
2. 論文標題 ntroduction of tenomodulin by gene transfection vectors for rat bone tissue regeneration.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Regen Ther.	6. 最初と最後の頁 99-108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2022.12.008. eCollection 2023 Mar.	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 天雲 太一、小出理絵、山口洋史、宮下牧子、小川徹、佐々木啓一
2. 発表標題 骨造成におけるIGF-1、BMP-2及びVEGFの併用適用の効果について
3. 学会等名 第 44 回 東北骨代謝・骨粗鬆症研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩淵 太人、天雲 太一、小川 徹、佐々木 啓一
2. 発表標題 銀イオンと青色LEDを用いた感染チタンの殺菌と 表面性状回復効果に関する基礎的検討
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第132回学術大会
4. 発表年 2023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
研究分担者	石山 希里香 (Ishiyama kirika) (20712904)	東北大学・歯学研究科・助教 (11301)	

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	中村 圭祐 (Nakamura Keisuke) (30431589)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	白土 翠 (Shirato Midori) (60708501)	東北大学・歯学研究科・助教 (11301)	

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