

令和 5 年 5 月 30 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：20K10067

研究課題名(和文) 骨小腔-骨細管系ネットワークの制御を基盤とした即時負荷インプラントの開発

研究課題名(英文) Development of immediate loading implants based on regulation of osteocyte network architecture

研究代表者

石橋 実 (Ishibashi, Minoru)

東北大学・歯学研究科・非常勤講師

研究者番号：40231138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨細胞のネットワーク構造は骨の代謝回転と密接に関係しています。細胞の機械感知システムは骨細胞の樹状突起の形成を調節します。したがって、生体材料の表面ナノ表面形態は、骨細胞の骨小腔・骨小管ネットワーク構造に影響を与える可能性があります。本研究では、歯根セメント質表面のマイクロメカニカル特性やナノ表面形態を模倣したセメント質模倣チタンナノ表面が、無数のナノ突起で物理的な接触刺激を加えることにより、骨細胞の樹状突起をインプラント表面に直接付着させ、インプラント周囲組織の骨小腔・骨小管ネットワークの構築を促し、その結果、骨結合を強化することが判明しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨結合型インプラントの臨床的安定性は、骨細胞の三次元的ネットワークによって決定される骨の質に影響されます。骨細胞の三次元的ネットワーク形成を調節する生体材料は現在知られておりません。本研究は、無数のナノ突起を備えた生体模倣チタンナノ表面が、ナノ形態の物理的的刺激を介して、骨細胞に多数の細胞突起を形成させてチタンナノ表面に付着させ、骨細胞の三次元的ネットワーク形成を促進することにより、チタンインプラントの骨結合を強化できることを初めて実証した研究です。ナノテクノロジーによる骨細胞制御の成功は、骨質を制御するための画期的な技術の開発への道を開きます。

研究成果の概要(英文)：Osteocyte network architecture is closely related to bone turnover. The cellular mechanosensing system regulates osteocyte dendrite formation; thus, surface nanotopography of the biomaterial can affect osteocyte network architecture. In this study, the cementum-mimetic titanium nanosurface implant that mimics hemimechanical properties and nanosurface topography of tooth root cementum, promoted osteocyte attachment to the implant surface directly with a lot of dendrites development of lacuna-canalicular network in peri-implant bone tissue by applying physical contact stimulation with numerous nanospikes on osteocytes, leading to the enhancement of osseointegration.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：骨小腔-骨細管ネットワーク 骨結合促効果 チタンナノ表面改質技術

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨細胞は骨組織内に最も多く存在し、機械的刺激に応答して骨芽細胞や破骨細胞の活性化を制御することで骨代謝を調節する。骨細胞の樹状突起は、隣接する骨細胞および骨表面に存在する骨芽細胞や破骨細胞と繋がる骨小腔 骨細管系ネットワークを構築するとともに、骨組織へ加わった機械的刺激を感知し、ネットワーク内の細胞に伝達することで、骨代謝回転の起点となる。インプラント周囲骨組織の骨細胞は、骨 - インプラント界面近傍に多く存在し、樹状突起をインプラント表面に接触させる。骨細胞は機械的刺激に敏感に応答し、環境に適した細胞機能を発揮する細胞の一つである。それゆえ、インプラント周囲骨内の骨細胞の機械的刺激に対する応答性はインプラント周囲骨質向上に関与すると推測される。

### 2. 研究の目的

以上を背景に我々は、チタンインプラントにナノ表面改質を施すことにより、骨細胞の樹状突起形成を刺激し、新生骨の骨小腔 - 骨細管系ネットワークを発達させることで、インプラント周囲骨組織の骨質が高まる可能性を着想した。本研究の目的は、チタン表面改質技術を応用し、インプラント表面に接する骨細胞の樹状突起形成と骨小腔 - 骨細管系ネットワーク構築を活性化させることで、インプラント周囲骨質の向上を介して骨結合強度を増強することである。

### 3. 研究の方法

研究期間内に、以下の項目に関する細胞培養試験および動物実験を行った。

- (1) チタンナノ表面上での骨細胞の樹状突起形成の評価 (単層静置培養試験)  
チタン機械研磨面、酸処理ミクロ粗面、ナノ粗面上でマウス骨細胞株 ML0-Y4 細胞を単層培養し、培養 1, 3 および 7 日後に、骨細胞が骨小腔 骨細管系ネットワークを形成するために必要な、樹状突起形成およびギャップ結合タンパクの発現を、生化学的および細胞生物学的解析により検証した。
- (2) チタンナノ表面上での骨細胞の三次元ネットワーク形成の評価 (三次元細胞培養試験)  
チタン機械研磨面、酸処理ミクロ粗面、ナノ粗面上で、I 型コラーゲンゲルと混和したマウス骨細胞株 ML0-Y4 細胞を三次元培養し、培養 7 日後に、二次元的なチタン表面上と、三次元的なコラーゲンゲル中における、骨細胞ネットワークの発達度とギャップ結合タンパクの発現を、生化学的および細胞生物学的解析により検証した。
- (3) チタンナノ表面インプラントの骨結合能の評価 (動物実験)  
酸処理ミクロ粗面およびナノ粗面チタンインプラントを、ラット上顎骨に埋植し、4 週後にインプラント周囲組織の組織学的解析による骨 インプラント接触率の計測と、生体力学的試験によるインプラント骨結合能を評価した。
- (4) チタンナノ表面インプラント上の骨細胞の樹状突起形成と周囲骨組織中での骨細胞ネットワーク形成の評価 (動物実験)  
酸処理ミクロ粗面およびナノ粗面チタンインプラントを、ラット上顎骨に埋植し、4 週後に、骨 インプラント界面および周囲骨組織の骨細胞形態を、Resin-casting 切片の走査型電子顕微鏡解析により評価した。

### 4. 研究成果

- (1) チタンナノ表面による骨細胞の樹状突起形成の促進  
培養 7 日目の骨細胞株における樹状突起マーカーの遺伝子発現は、チタンナノ粗面上で最も高くなった。チタンナノ粗面上の骨細胞株におけるギャップ結合遺伝子の発現は、3 日目まで低かったが、7 日目には他の表面より高くなった。培養 7 日目の共焦点レーザー顕微鏡観察により、他の表面上の多角形細胞形態とは対照的に、チタンナノ粗面上の骨細胞株は、樹状突起マーカーの強発現を伴う顕著に伸長した細胞突起を有するニューロン様細胞形態を示した。培養 7 日目のチタンナノ粗面上の骨細胞株はギャップ結合マーカーを広範囲に発現した。単位細胞あたりの樹状突起マーカーまたはギャップ結合マーカーの発現は、チタンナノ粗面上で他の基材よりも 3 倍以上高かった。
- (2) チタンナノ表面による骨細胞の三次元ネットワーク形成の促進  
3D コラーゲンゲル中で 7 日間培養後、チタンナノ粗面上に付着した骨細胞株は、単層培養と同様に、樹状突起マーカーとギャップ結合マーカーの強発現を伴う顕著に伸

長した細胞突起を有するニューロン様細胞形態を示した。対照的に、他のチタン表面上の細胞は多角形のままであり、ギャップ結合マーカの発現は低かった。他のチタン表面上の コラーゲンゲル中で観察されたギャップ結合マーカ発現の低い細胞の凝集とは対照的に、チタンナノ粗面上の 3D コラーゲンゲル中の骨細胞株は、広範なギャップ結合マーカ発現を伴う三次元的な細胞間連結を形成した。ウエスタンブロットティング分析により、チタンナノ粗面上の骨細胞株は、他のチタン表面上の骨細胞株と比較して、ギャップ結合マーカ発現を顕著に増加させた。

- ( 3 ) チタンナノ表面インプラントによる周囲骨量増加を伴わない骨結合強度の向上  
第一大臼歯領域の上顎骨に埋入されたマイクロ粗面または ナノ粗面チタン スクリューインプラントの、術後 4 週間の骨結合強度を、骨結合喪失時の逆トルク値を測定する生体力学的試験で評価した。ナノ粗面チタンインプラントの骨結合強度は、マイクロ粗面チタンインプラントよりも 1.5 倍高かった。対照的に、樹脂包埋非脱灰組織切片による組織学的解析により、マイクロ粗面と ナノ粗面チタンインプラントの骨 - インプラントの接触率はほぼ同等であり、約 50%となることが示された。
- ( 4 ) チタンナノ表面インプラントによる骨細胞の樹状突起形成および周囲支持骨中三次元ネットワーク形成の促進  
術後 4 週間の Resin-casting 切片上の走査型電子顕微鏡解析により、マイクロ粗面チタンインプラント周囲支持骨では、骨細胞は楕円形であり、その樹状突起形成はわずかでした。対照的に、ナノ粗面チタンインプラント周囲の支持骨領域の骨細胞は、アスペクト比が低く、細胞体の円形度が高い、多数の樹状突起を有する円形の細胞形態をもち、よく発達した複雑な細胞間ネットワークを形成していた。加えて、ナノ粗面チタン インプラント周囲支持骨中の骨細胞は、マイクロ粗面チタンインプラント周囲の骨細胞よりも、樹状突起の数が多かった。骨 - インプラント界面領域の骨細胞は、限られた数の樹状突起で、マイクロ粗面チタンインプラント表面に付着していた。対照的にナノ粗面チタンインプラントでは、骨細胞が多くの樹状突起でインプラント表面に付着していた。インプラント表面に付着した樹状突起の単位細胞あたりの数は、マイクロ粗面チタンインプラントよりもナノ粗面チタンインプラントで、はるかに多かった。

以上の研究成果により、チタンナノ表面はナノ表面形態により、骨細胞の骨小腔 骨細管系ネットワークの形成を促進し、骨結合を強化することが判明しました。このナノテクノロジーを介した骨細胞の制御を示した本研究成果は、骨質を制御する先駆的なバイオマテリアルの開発に重要な情報を提供し、生体材料科学と骨生物学の分野の進歩に貢献することが期待できます。

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 0件）

1. 著者名 He Xindie, Yamada Masahiro, Watanabe Jun, Tiskratok Watcharaphol, Ishibashi Minoru, Kitaura Hideki, Mizoguchi Itaru, Egusa Hiroshi	4. 巻 151
2. 論文標題 Titanium nanotopography induces osteocyte lacunar-canalicular networks to strengthen osseointegration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 613 ~ 627
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2022.08.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	山田 将博 (Yamada Masahiro) (90549982)	東北大学・歯学研究科・准教授  (11301)	
研究分担者	江草 宏 (Egusa Hiroshi) (30379078)	東北大学・歯学研究科・教授  (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
---------	---------