

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 年度～2010 年度

課題番号：21791959

研究課題名(和文) ナノ材料・人工タンパク質を利用した即時荷重インプラントの最適化

研究課題名(英文) Functionalization of the immediate loading implant by nano-materials and artificial proteins

研究代表者

國分 克寿 (KOKUBUN KATSUTOSHI)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90535808

研究成果の概要(和文)：本研究では、「薬物担持ナノ炭素材料」による早期骨形成能の実現、及び「モチーフ・プログラムド人工タンパク質」を用いた堅牢な細菌感染防御能の実現を通して、即時荷重インプラントに最適なチタン表面改質法を開発することを目的とした。本研究結果より、CNH をキャリアとすることで、チタン表面における固相化薬物送達システムの開発に成功した。また、チタン結合モチーフと細胞接着モチーフを持つ人工タンパク質の作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：

Modification of the surfaces of materials, such as titanium, is important in the medical engineering area. We are employing our “carbon nanomaterials” and “motif-programmed artificial proteins” methodology in order to biologically modify the surface of titanium. We have demonstrated that DEX (Dexamethasone)-CNH on titanium attractive candidates for use in a novel drug delivery system. DEX-CNH exhibited sustained release of biologically active DEX in mammalian cells without significant side effects. Furthermore, we successfully created artificial proteins that contain embedding cell attachment and Ti-binding motifs and endowed Ti with cell attachment activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学／歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯学、インプラント、チタン、ナノ材料、人工タンパク質、表面改質、DDS

## 1. 研究開始当初の背景

オッセオインテグレーションを荷重条件下で獲得する即時荷重インプラントは、機能圧が顎骨に早期に伝達されることにより周囲骨のリモデリングを促進するとともに、抜歯後に発現する周囲組織の退縮・吸収を防止

することから治療期間を短縮し、患者のQOLの向上に貢献することが広く認識されている。この方式が成功するための条件として初期固定の重要性などが指摘されているが、何れも経験的な域にとどまっておりEBMにはほど遠い状況にある。早期荷重や即時荷重に

は、初期固定、良好な骨質、連結が推奨されることは認識されつつあるが、インプラントの表面に対する統一的な評価は定まっていない。僅かに表面形状の重要性が指摘されているのみであり、表面性状の改質法に関しての検討は殆どなされていないのが現状である。このような状況のもと、即時荷重に最適なインプラント表面を創製することは重要かつ緊急な課題となっている。

即時荷重インプラントを成功させる要因は、次の2つにまとめられる。(1)早期の骨結合と骨形成、(2)細菌感染への対策、である。これら2つの問題を解決するために申請者は、最近確立したナノ技術を利用した即時荷重インプラントの開発を進めることにした。

## 2. 研究の目的

「薬物担持ナノ炭素材料」、及び、「モチーフ・プログラムド人工タンパク質」といった最新のナノ技術を利用することで、現行の即時荷重インプラントが必要とする次の2つの課題に挑戦する。

(1) 早期の骨結合・骨形成の実現→ナノ炭素材料を用いた固相化薬物送達システムにより、インプラント周囲の早期の骨結合・骨形成を実現する。

(2) 細菌感染によるインプラント周囲炎の予防→チタン結合・細胞接着を併せ持つ人工タンパク質を作製・利用することで、緊密な上皮性接着を付与し、インプラント周囲炎を予防する。

## 3. 研究の方法



### (1) ナノ炭素材料を用いた固相化薬物送達システム

化学化合物を用いた微小環境での骨形成制御を可能とするため、CNHを薬物キャリア (Chem Phys Lett,309:165-170,1999. Mol Pharmaceutics,2:475-480,2005)として用いた固相化薬物送達システム (DDS) を確立することで問題解決にあたる。これは Simvastatin (Science,286:1946-1949,1999) や Dexamethasone (DEX) (J Bone Surg Arm,85:19-28,2003) といった骨関連薬剤を

CNHに担持させた状態で、チタン表面に固相化し、薬剤の微小環境徐放システムを確立し、ケミカルシグナルとして利用する。DEXは骨芽細胞の分化を促進することが分かっており、CNHへ担持可能で、その徐放も確認されている (Mol Pharmaceutics,1:399-405,2004)。

### ① DexamethasoneのCNHへの担持、徐放に関する定量試験

→薬剤担持CNHのチタン表面への吸着量を定量するため、RIラベル化薬剤担持CNHをチタン上へ固相化し、その吸着量を測定した。またチタン上へ固相化された薬剤の経時的な徐放量の変化についてRI測定器を用いた計測を行った。

### ② 骨芽細胞培養試験

→徐放された薬剤の生物活性を調べるため、骨芽細胞 cell line を骨関連薬剤担持CNH固定チタン表面上で培養し、骨代謝マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性を経時的に測定した。

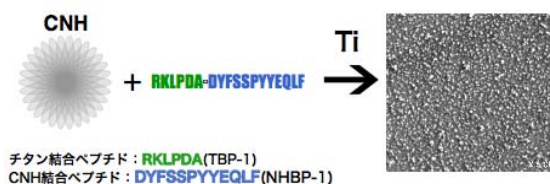
### (2) チタン結合能と細胞接着能をもつ人工タンパク質

すでに作製に成功しているチタン結合モチーフと細胞接着モチーフを埋め込んだ人工タンパク質 (Biomacromolecules, 9:3098-3105,2008) を用いて、チタン表面への上皮細胞の接着・伸展の影響に関し、検討を行った。次に、*in vivo* 実験としてラット大腿骨へのチタン製インプラントの埋入実験を行った。具体的には直径 2mm、長さ 3.3mm のチタン製インプラントを作製し、SLA 処理を施した上で、作製した人工タンパク質を吸着させた。このインプラントをラット大腿骨に埋入し、まずは 1、3、7 日例における初期反応を確認した。次に、7、14 日例の標本を作製し、HE 染色を行い、周囲組織の比較検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ナノ炭素材料を用いた固相化薬物送達システム

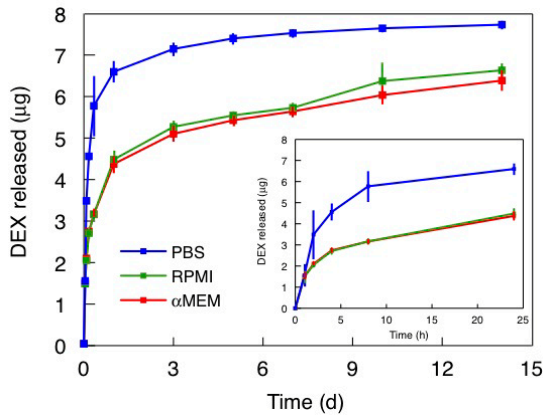
CNHをケミカルシグナルのキャリアとして用いるため、まず次の方法でCNHのチタン表面への固相化法を確立した (下図)。



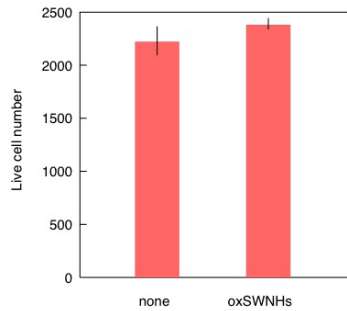
チタン結合ペプチドである TBP-1 と CNH 結

合ペプチドである NHBP-1 を連結させたペプチドを用いることで、分散性の良い CNH をチタン表面へ均一に固相化する方法を確立した (前頁 SEM 像)。

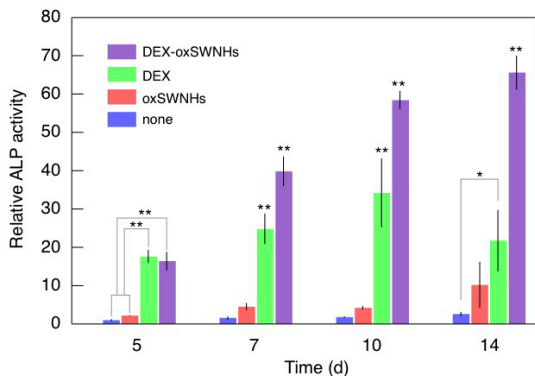
次に、DEX 担持 CNH をチタン表面上に固相化し、薬剤の徐放に関して RI ラベル DEX を用いて確認した。結果より、培地中では 14 日間、薬物が徐放され続けていることが分かった (下グラフ)。



この CNH 固相化チタン表面に細胞毒性がないかを確認するため、CNH 固相化チタン上で細胞培養を行い、生細胞染色を行った結果、ノンコート  
のチタン上で培養した結果と同じであることが分かり、細胞毒性がないことを確認した (右グラフ)。



前骨芽細胞株である MC3T3-E1 を用いた実験では、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を検討したところ、5、7、10、14 日と徐々に ALP 活性が上昇していることが分かり、DEX 活性がチタン上に担持され、その徐放が細胞へ影響を及ぼしていることが分かった (下グラフ)。

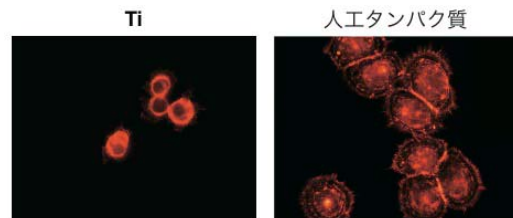


そこで次のステップとして、チタン表面に固相化した CNH の多層化技術に取り組んだ。

具体的には、PEG-NHBP1 (CNH 結合ペプチド) を用いることでシリカのミネラライゼーション能を利用し、CNH 層の上にシリカ層を積層することができた。この積層技術により薬物の徐放時間の延長が可能となった。

## (2) チタン結合能と細胞接着能をもつ人工タンパク質

チタンに結合するペプチドモチーフである minTBP-1 と、細胞背着モチーフである RGD を持つ人工タンパク質を利用した。この人工タンパク質は、骨芽細胞の接着、分化に影響ことは報告している (Biomacromolecules, 9:3098-3105,2008)。まずヒト上皮細胞株である HaCaT を用いた実験では、1、3、5、7 日例で比較したところ、いずれの期間でもノンコートのチタンと比較し細胞増殖能の上昇が認められた。また初期伸展に関しても細胞播種後 2 時間後において、細胞伸展が発達していることが分かった (下写真)。



次に、*in vivo* 実験としてラット大腿骨へのチタン製インプラントの埋入実験を行った。まずは 1、3、7 日例における初期反応を確認したところ、人工タンパク質吸着インプラントにおいて、コントロール群 (タンパク無し) と比較し、いずれの日例においても炎症反応等は見られなかったため、人工タンパク質による生体為害性は無いものと考えた。次に、7、14 日例において周囲骨組織の形成を比較したところ 7 日例においてタンパク無しの SLA インプラント周囲では、骨組織の形成が見られなかったのに対し、人工タンパク質吸着インプラント周囲ではインプラント周囲において骨組織形成像が観察された。これにより、人工タンパク質を用いることで、早期の骨形成が可能であることが示唆された。

## 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 2 件)

① 鏡 明展、松坂賢一、國分克寿、井上 孝、口蓋粘膜除去後初期におけるケラチノサイト、ランゲルハンス細胞、メルケル細胞およびメラニン産生細胞の再生、日本口腔粘膜学会雑誌、査読有、16巻、2010、1-9

② 飯塚智彦、松坂賢一、國分克寿、櫻井薫、井上孝、ラット上顎におけるインプラント周

困軟組織の免疫組織化学的特徴、日本口腔インプラント学会誌、査読有、22巻、2009、292-300

〔学会発表〕（計2件）

- ① 吉成正雄、國分克寿、早川 徹、芝 清隆、軟組織接着金属表面、第32回日本バイオマテリアル学会、2010年11月29日、グランドプリンスホテル広島（広島県）
- ② 國分克寿、インプラント・上皮界面の生物学的改良-最先端の研究から-チタン結合ペプチドによるインプラントの生物学的封鎖をめざして、第39回(社)日本口腔インプラント学会・学術大会、2009年9月27日、大阪国際会議場（大阪市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

國分 克寿 (KOKUBUN KATSUTOSHI)  
東京歯科大学・臨床検査病理学講座・助教  
研究者番号：93535808

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：