

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09976

研究課題名（和文）規格化ナノ構造チタンによる接着蛋白質を介した組織形成制御可能な生体材料開発

研究課題名（英文）Development of biomaterials with controlled tissue formation via adhesive proteins using standardized nanostructured titanium

研究代表者

秋葉 陽介（Akiba, Yosuke）

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：70547512

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）：インプラントにおけるオッセオインテグレーション研究においては、一般にさまざまな粗面構造に対して細胞を播種し細胞の反応性を解析する研究が実施されている。しかし、オッセオインテグレーションにおいては、チタンと骨の間にナノレベルおスペースが存在する。またインプラント手術では、チタンへの細胞接着に先立ちチタンへの血液の接着が見られる。本研究では、血液中のタンパク質のチタンへの接着が、オッセオインテグレーションに深く関与すると仮定して、研究を実施している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オッセオインテグレーションはその成立機構が不明のまま臨床応用が進んでいる。インプラントは極めて優れた補綴戦略であるために、現在も日本中で年間120万本以上が埋入されている。治療期間の短縮や、良好な予後の長期維持には、オッセオインテグレーションの機構解明と、これを利用したおっせおインテグレーション促進が必要であるが、現在の研究は試行錯誤的研究の域を出ていない。本研究により、チタン骨結合機構が解明されれば、オッセオインテグレーション促進に必要な分子基盤解明が達成される

研究成果の概要（英文）：In research into osseointegration in implants, cells are generally seeded onto various rough surface structures and the cellular response is analyzed. However, in osseointegration, nano-level spaces exist between titanium and bone. Furthermore, during implant surgery, blood adhesion to titanium is observed prior to cell adhesion to the titanium. In this study, we hypothesize that adhesion of proteins in the blood to titanium is deeply involved in osseointegration.

研究分野：補綴歯学

キーワード：インプラント オッセオインテグレーション 超平滑チタン表面 チタン接着タンパク質

1. 研究開始当初の背景

デンタルインプラントは優れた補綴治療戦略である。90%以上の高い成功率を示す一方で、埋入部位の骨構造によっては治療に長期間を要し、患者、歯科医師の双方から治療期間短縮が求められている。企業や研究者らはインプラントの材質、形状、表面性状の改良によって試行錯誤的に骨結合促進による治療期間短縮を模索してきたが、チタン・骨結合の成立機序の詳細は解明されておらず、試行錯誤的な研究開発は限界に近付いている。オッセオインテグレーションはこれまで、骨とチタンが直接結合している状態と考えられていた。しかし、電子顕微鏡像ではインプラントと形成骨の界面に 20~50nm の無定形構造物の層が観察され、この層にはタンパク質や多糖類などの存在が示唆されている。つまりオッセオインテグレーションとは骨とチタンの直接的結合ではなく、有機質を介した間接的な結合である(図1)。

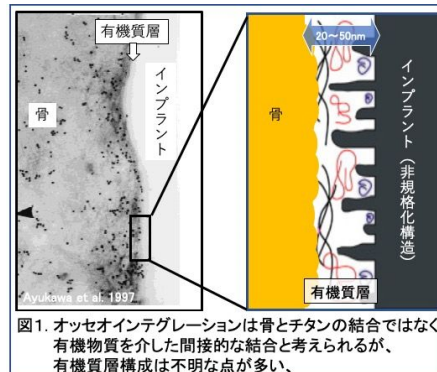


図1. オッセオインテグレーションは骨とチタンの結合ではなく、有機物質を介した間接的な結合と考えられるが、有機質層構成は不明な点が多い。

このチタン表面の有機層が骨形成開始時の骨形成細胞の接着に寄与すると考えられる。埋入直後のインプラントは血液に暴露されるため、血液中のタンパク質がチタン表面に接着し、これを起点に細胞接着と骨形成が開始する(図2)。

このため、初期のチタン・骨結合の界面形成には血液中のタンパク質が重要な役割を果たすと考えられるが、これまでのランダムなチタンの非規格化構造ではチタン・骨界面の結合に関わるタンパク質の単離、解析研究が再現性を持って実施できなかった。

申請者は、早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構との共同研究により、これまで技術的に困難であったチタンの規格化ナノ構造形成に成功した。本技術では、規格化構造サイズは最小単位を 3nm とし、高さ、幅、ピッチの全てを制御可能であり、付与可能な形態は台形、錐形、柱形、円柱形、構造は線構造、格子構造、立体格子状構造など、自由度が高い(図3)。

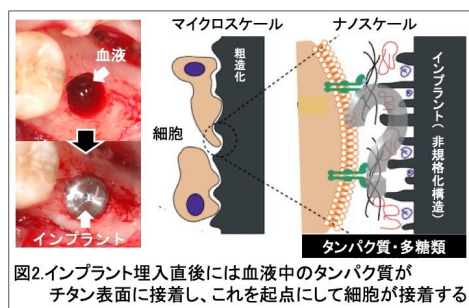


図2.インプラント埋入直後には血液中のタンパク質がチタン表面に接着し、これを起点にして細胞が接着する

成膜粒度も制御可能で表面粗さ 0.6nm の超平滑なチタン表面も形成できる。この技術は世界的にも類を見ない高レベルの技術であり、走査型電子顕微鏡、走査イオン顕微鏡、原子間力顕微鏡等、観察精度の高い分析装置で評価し、構造の精度を担保している。更に、早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構では JAXA でも使用される超高感度大気圧イオン化質量分析装置を使用した解析も可能であり、チタン表面の付着物質を、PPB レベルで検出、解析できる。本研究では、これらの最先端工学技術を用いて、チタン・骨結合界面の有機物層に存在する細胞接着誘導タンパク質を同定し、同定した物質のチタン表面への細胞接着と骨形成誘導能を解析することで、チタン・骨結合獲得機構を解明する。この機構解明により、骨結合の誘導に最適な構造を持ったチタン材料を開発し、チタン・骨結合誘導タンパク質の制御による初めてのチタン・骨結合形成促進法の提唱が可能になると考え、本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

本研究は規格化ナノ構造チタン形成技術を応用して骨結合に関わるチタン表面の構造因子と、それらに接着する血中タンパク質を同定し、チタン・骨結合機構を解明することを目的とする。さらにチタン接着タンパク質を介して骨結合を促進させることによって、治療期間を短縮可能な機能性生体材料の開発を目的とする。

3. 研究の方法

課題1 チタンに結合する血中タンパク質、多糖類の同定

1-1 超平滑基板によるチタン結合タンパク質、多糖類の探索

- ・超平滑チタン基板、規格化ナノ構造チタン基板上に血液、骨髓採取液を播種し、チタン基板表面の付着タンパク質を単離し、質量分析等で同定する。タンパク洗浄後の基板から付着微量物質の検出を行う。

1-2 チタン結合タンパク質の機能解析、構造探索

- ・同定したタンパク質の血液中、骨髓中の局在、単離抽出したタンパク質とチタンの結合親和性、同定したタンパク質をチタン面に塗布しての骨形成促進能(骨形成、分化促進、細胞誘導など)、立体構造を解析する

課題2 タンパク接着を介して骨結合を促進させる規格化ナノ構造の決定

2-1 規格化ナノ構造チタン基板によるタンパク質接着促進構造検索

- ・規格化ナノ構造の形態、サイズ、ピッチ、成膜粒度による親水性、疎水性などの条件によって、単離物質(タンパク質、多糖類)接着促進可能な規格化ナノ構造を検索する。

- ・規格化ナノ構造チタン基板に血液、骨髓液を播種し、標的タンパク質、多糖類の接着促進を確

認する。

2-2 タンパク質接着促進ナノ構造による細胞接着・石灰化促進確認

・単離したタンパク質、多糖類を接着促進可能な規格化ナノ構造チタン基板上に塗布、その後骨髄由来細胞を播種し、細胞接着促進機能を確認する。さらにチタン基板上での細胞増殖をライブイメージングで確認し、石灰化能も確認する。

2-3 接着タンパク質機能抑制による細胞接着、石灰化抑制の確認

・抗体、SiRNA を用いた接着タンパクの機能抑制による細胞接着、石灰化抑制の確認

課題3 規格化ナノ構造インプラントによるチタン・骨結合促進の確認

3-1 規格化ナノ構造インプラントによる骨結合促進確認

・カスタムインプラント表面に規格化ナノ構造を形成したものをラット上顎骨に埋入し、組織学的解析、μCT による骨インプラント接触率解析を実施する。

3-2 規格化ナノ構造インプラントによる骨結合成立期間短縮確認

・ラット上顎骨に埋入した規格化ナノ構造インプラントのリバーストルクを埋入後から経時的に測定し骨結合成立期間を解析する

3-3 規格化ナノ構造インプラントに同定タンパク質を付与した時の骨結合能の比較

およびタンパク質機能抑制による確認

4. 研究成果

申請者は、はじめに血液中に、凹凸構造を持たない無構造ナノレベル超平滑基板に接着可能なタンパク質が存在するか否かを確認した。無構造ナノレベル超平滑チタン基板上にラットより採取した血液を播種、洗浄し、ラット骨髄由来細胞を播種した。対照群として血液を播種しない超平滑チタン基板上へ細胞を播種した(図3)。

血液播種洗浄を行なった基板では、対照群と比較して優位に多い細胞の接着が確認され、血液中に超平滑チタン表面に接着可能で細胞接着促進可能なタンパク質の存在が示唆された(図4)。

さらに、超平滑チタン基板上に血液を播種、洗浄し、ここから、タンパク質を回収し、質量分析によってタンパク質を同定、プロテオーム解析を実施しさらに Gene Ontology 解析によりスクリーニングを行なった。さらに、抗体、リコンビナントタンパク質による絞り込みを行い、3種類の候補タンパク質を選出した(図5)。候補タンパク質のうちタンパク質 X (Protein X)(論文投稿中)は超平滑チタン基板上に播種することで、BS A や Fibronectin よりも優位に細胞接着を促進することが示された(図6)。現在、このタンパク質 X の構造解析を足がかりに、チタン接着構造、細胞接着促進構造について解析を進めている。

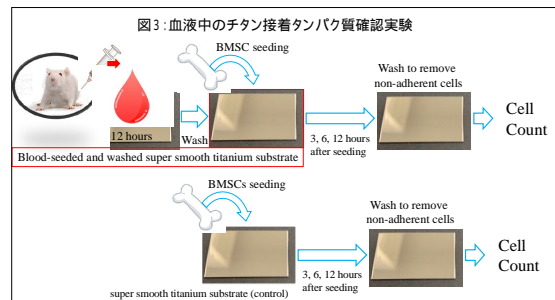


図4：血液中のチタン接着タンパク質による細胞接着促進

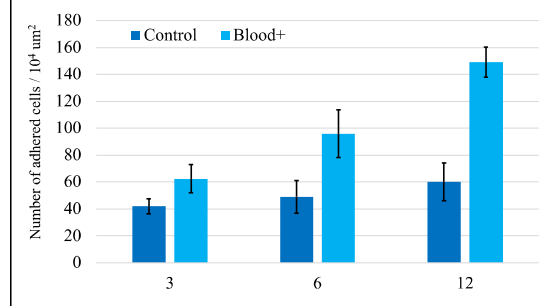


図5：Detection of cell-titanium adhesion proteins in the blood

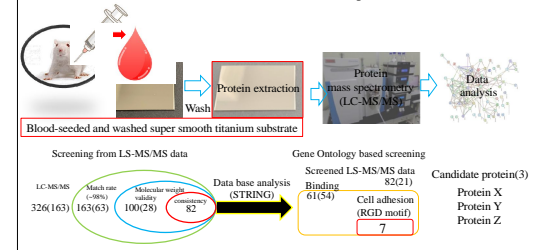
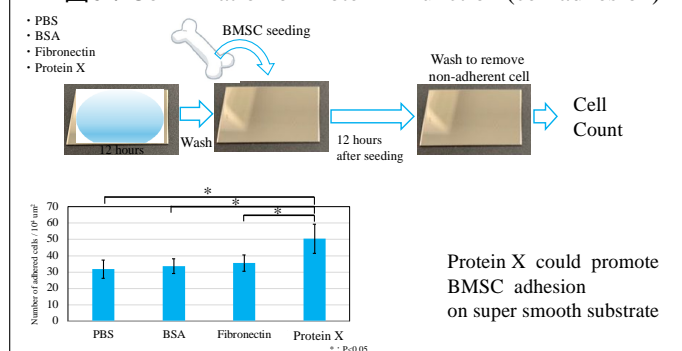


図6：Confirmation of Protein X function (cell adhesion)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	魚島 勝美 (Uoshima Katsumi) (50213400)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	照沼 美穂 (Terunuma Miho) (50615739)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	水野 潤 (Mizuno Jun) (60386737)	早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・客員上級研究員 (研究院客員教授) (32689)	
研究分担者	泉 健次 (Izumi Kenji) (80242436)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

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