

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17020

研究課題名（和文）チタン表面改質によるマクロファージ活性化制御に基づいた新たな骨再生法の開発

研究課題名（英文）Development of a new bone regeneration method based on regulation of macrophage polarization by Titanium Surface Modification

研究代表者

外山 直人 (Toyama, Naoto)

名古屋大学・医学部附属病院・客員研究者

研究者番号：30877098

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、顎骨再建において頻用される材料であるチタンに着目し表面処理により付着したマクロファージの活性化が血管網の構築に及ぼす影響を調べた。チタン表面の処理として簡便に実施可能な機械研磨と酸処理との比較を行った。酸処理後のチタンではマクロファージの極性マーカーがM2に近いものへ変化し、一般に骨髄間葉系幹細胞の骨形成能については向上を示す酸処理群において血管新生因子の発現は低下する傾向が見られた。ヒト臍帯静脈内皮細胞の管腔形成への影響においても酸処理群では遺伝子発現と同様に血管新生は有意に低下した。チタン処理条件の検討、骨形成との関連についての解析が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎口腔領域における骨再生法は確立されつつあるが大規模骨欠損の組織再生には課題が多く、効率的な組織再生には血流の確保が重要となる。生体材料は欠くことのできない要素であり、自己の再生力を最大限引き出すためには初期に応答するマクロファージの挙動をコントロールすることが有効であると考え、本研究では顎口腔領域の骨再生や再建で用いられる頻度の高いチタンの表面性状を改変しマクロファージの挙動の変化を観察し新たな視点を示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, the effect of activation of macrophages adhering to surface-treated titanium on the construction of blood vessels was investigated.

Mechanical polishing and acid treatment, both of which can be easily performed as titanium surface treatments, were compared. Angiogenesis was significantly decreased in the acid-treated group as well as gene expression in the effect on tube formation of human umbilical vein endothelial cells. Further studies on the conditions of titanium treatment and analysis of the relationship with bone formation are needed.

研究分野：骨再生

キーワード：骨再生 骨区域欠損 血管新生 マクロファージ 間葉系幹細胞

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域の治療により生じる骨の欠損は顎口腔機能を障害し患者の QOL を低下させる。区域欠損など大規模骨欠損に対し、従来行われている再建方法である血管柄付き自家骨移植や仮骨延長術では採取部の侵襲や長期の治療期間を有するなど課題は多く、より低侵襲で効率的な組織再建、再生方法の開発が望まれている。骨再生の研究は諸家において広くおこなわれておりチタンメッシュと自家海綿骨や骨補填剤 (HA、 β -TCP など)、培養細胞移植を組み合わせた方法など組織工学的な試みがなされている。歯周組織再生やインプラントを目的とした小規模の骨欠損における骨再生、骨造成では一定の成果が報告されているが広範な骨欠損の再生はいまだ大きな課題である。

一方で、マクロファージは表現型により炎症型の M1 と抗炎症型・組織修復型の M2 に分類され M2 はさらに細かいサブタイプに分類される。近年、さらに疾患特異的なものや埋植された生体材料による活性化によってもさまざまなサブタイプが存在することが示唆され治療アプローチとして注目されている。またマクロファージは組織修復・再生において炎症反応だけでなくその極性によって、間葉系幹細胞などの直接的に組織修復を担う細胞の動員や分化に大きな影響を持つ細胞であることがわかっている。修復過程でその極性を適切にコントロールすることは効率的な組織再生につながると考えられる。

大規模骨欠損の再生において最大の課題は欠損部への血流の確保である。生体組織において、一部の無血管組織を除き、血管からの酸素・栄養の供給は必須であり、損傷組織や欠損部での組織修復、再生ではその需要はより高まる。しかし、欠損が大規模化するほど中心部への血流の確保は困難となる。現在それを可能にする方法は血管系をそのまま移植する血管柄付き自家骨移植、骨端から徐々に欠損の中心へと組織再生を進める仮骨延長術のみである。大規模欠損の再生を可能にするような血管系の効果的な新生、構築を可能にする新たなアプローチが必要であり、培養細胞移植や成長因子投与に頼らず、チタン材料に初期に付着する細胞であるマクロファージの活性化制御により骨欠損部へのパラクライン効果を利用し、培養細胞移植や成長因子投与に比類する細胞動員促進や血管新生、骨形成促進効果を得ることを目指すことを着想した。

2. 研究の目的

本研究ではチタン表面の性質によるマクロファージの極性の変化が欠損部の血管新生に及ぼす影響、意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

①チタン表面の改変、解析

チタンディスク表面を機械研磨したもの(以下 N-Ti)および機械研磨後に硝酸処理したもの(以下 MS-Ti)を作製し実験に用いた。SEM による表面解析を行なった。

②細胞実験

ヒト単球系細胞株であり THP-1 に PMA を添加し 24 時間培養しマクロファージへ分化させた細胞を回収し実験に用いた。N-Ti および MS-Ti 上で培養し細胞活性の評価を WST-8、極性マーカーとして CD80、CD206 および血管新生関連因子として VEGF、 β FGF、TGF β の遺伝子発現解析を qRT-PCR で解析した。

チタン上で培養したマクロファージの培養上清を回収しヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)の培養液に添加し血管新生能を評価した。

4. 研究成果

①チタン表面の改変、解析

機械研磨、硝酸処理それぞれの材料表面の SEM により形態の変化、硝酸処理によりより微細な形態が付与されることを確認した(図 1)。

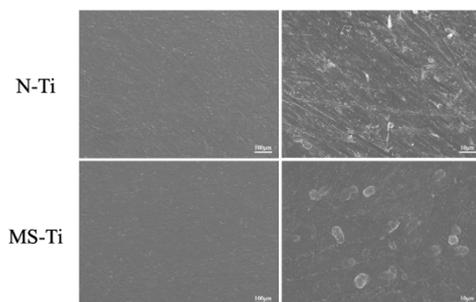


図1 チタン表面の SEM 画像

②細胞実験

・ N-Ti と比較し MS-Ti では培養後 3 日でマクロファージの有意な増殖がみられた(図 2)。

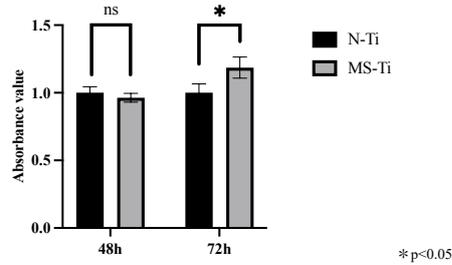


図 2 WST-8 による増殖能の比較

・ マクロファージの極性マーカーの比較では MS-Ti 上で培養した場合は M1 マーカーである CD80 の発現が抑制され、M2 マーカーである CD206 が有意に上昇した。培養初期に顕著であった(図 3)。

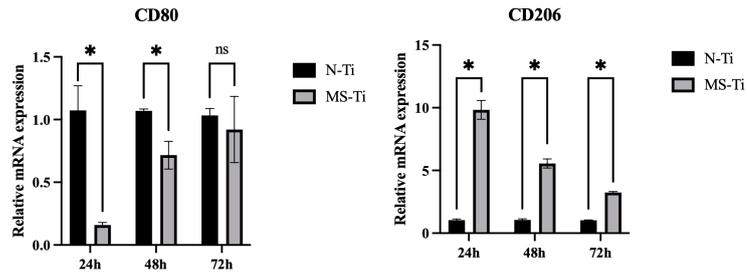


図 3 マクロファージ極性マーカーの遺伝子発現解析

・ 血管新生関連因子の遺伝子発現解析では N-Ti と比較し MS-Ti は培養初期には血管新生因子の発現は低下したが、経時的に発現は逆転する傾向がみられた(図 4)。

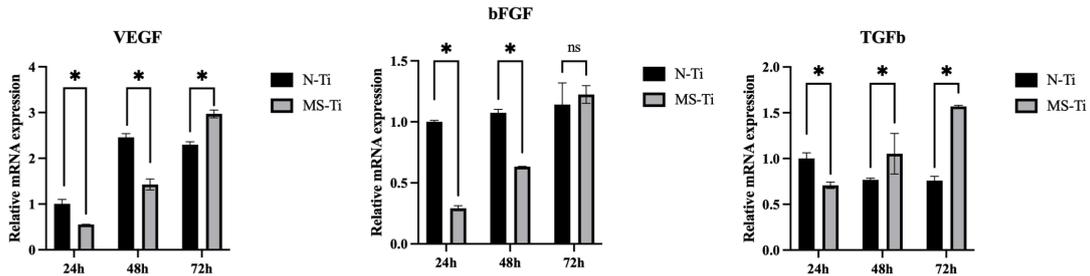


図 4 マクロファージの血管新生関連遺伝子発現解析

・ HUVEC を用いた管腔形成能の評価では管腔の長さ、数を計測し MS-Ti 上のマクロファージ培養上清を添加した群では長さ、数ともに有意に低下した。

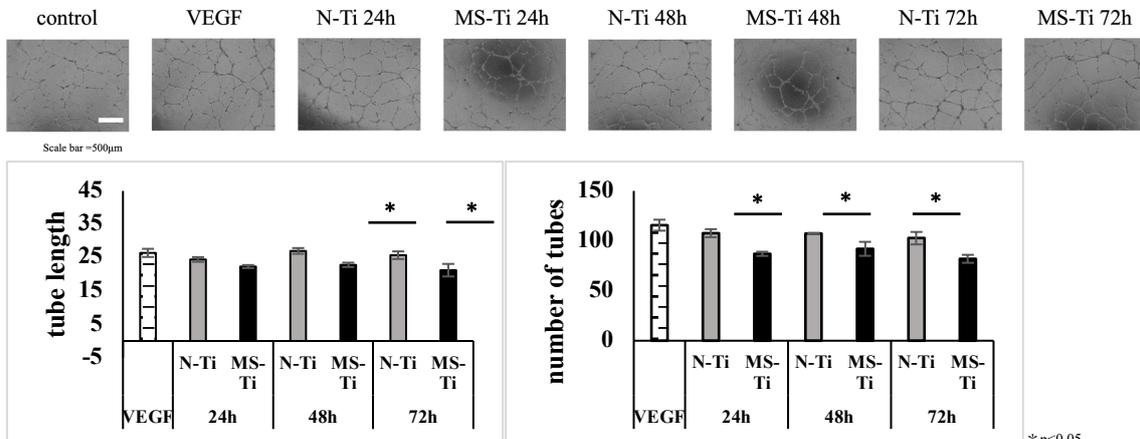


図 5 マクロファージによる血管新生への影響の評価

一般にチタン表面に微細構造を付与することで骨形成は向上するが、本実験では血管新生に負の効果をもたらす結果が見られた。チタン処理条件のさらなる検討、骨形成との関連についての解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Song Xinman, Okabe Kazuto, Ohta Yuya, Ohara Go, Toyama Naoto, Chang Qi, Wang Yilin, Hibi Hideharu	4. 巻 161
2. 論文標題 Family with sequence similarity 20 member B regulates osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells on titanium surfaces	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 298 ~ 308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2023.02.035	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 -
1. 著者名 Yamaguchi Satoshi, Kaminogo Kento, Tokura Tatsuya, Kimura Hiroyuki, Kishi Shinichi, Yamamoto Noriyuki, Ichimura Norihisa, Toyama Naoto, Koma Yoshiro, Kouyama Naoka, Ozaki Norio, Hibi Hideharu	4. 巻 3-4
2. 論文標題 Psychological impact on patients with oral cancer before undergoing resection and free flap reconstruction surgery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oral Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 100004 ~ 100004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oor.2022.100004	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 -
1. 著者名 Ohara Go, Okabe Kazuto, Toyama Naoto, Ohta Yuya, Song Xinman, Tsuboi Makoto, Kouyama Naoka, Sato Kotaro, Hibi Hideharu	4. 巻 36
2. 論文標題 Stem cell therapy based on human periodontal ligament stem cells preactivated with TNF- α for human head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 217 ~ 226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2023.08.006	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 -
1. 著者名 Ohara Go, Okabe Kazuto, Toyama Naoto, Ohta Yuya, Xinman Song, Ichimura Norihisa, Sato Kotaro, Urata Yusuke, Hibi Hideharu	4. 巻 52
2. 論文標題 Hyperthermia maintains death receptor expression and promotes TRAIL induced apoptosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral Pathology & Medicine	6. 最初と最後の頁 718 ~ 726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jop.13457	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 外山直人, 山口聡, 岡部一登, 小間義朗, 甲山尚香, 上之郷健人, 日比英晴
2. 発表標題 Controlling Nutritional Statusを用いた口腔癌患者の栄養評価
3. 学会等名 第41回日本口腔腫瘍学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小原豪, 岡部一登, 太田優也, 外山直人, 日比英晴
2. 発表標題 TRAIL 耐性頭頸部扁平上皮癌に温熱療法が与える効果
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井陽, 丸山裕, 外山直人, 坂口晃平, 山口聡, 岡部一登, 藤尾正人, 日比英晴
2. 発表標題 植込型左室補助人工心臓装着患者における口腔管理の検討
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木秀祐, 藤本雄大, 井出貴洋, 外山直人, 南部和也, 小間義朗, 石川 純
2. 発表標題 TNF阻害薬が有効であったSAPHO症候群の1例
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上之郷健人, 山口聡, 山本憲幸, 小間義朗, 外山直人, 浦田悠輔, 甲山尚香, 日比英晴
2. 発表標題 再建をともなう手術を受ける口腔癌患者のコーピングに関する検討
3. 学会等名 第47回日本口腔外科学会中部支部学術集会
4. 発表年 2022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

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