

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17055

研究課題名（和文）歯周組織再生を目指した新規骨補填材の生成

研究課題名（英文）Fabrication of new bone substitutes for periodontal tissue regeneration

研究代表者

乾 志帆子（INUI, Shihoko）

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90807695

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、低温化学合成法により作製されたTNTにアメロジェニンをコーティングすることで材料表面に与える影響ならびにインプラント埋入周囲組織の硬組織および軟組織に与える影響について検討する。酸化チタンの粉末に対し、低温化学合成法を行うことで析出されたTNT粉末をアメロジェニン溶液に一定時間浸漬し、SEMにて観察したところ、TNT粉末周囲にアメロジェニンがコーティングされていることが明らかとなった。また、同試料をラット骨髓細胞に播種し、in vitroの評価を行ったところ、硬組織分化誘導能が向上することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カーボンナノチューブが世にでてからすでに17年間が経過し、いくつかの応用製品が実用化される段階にまで技術革新が進められてきた。カーボンナノチューブの発見以降、非酸化物系層状化合物を中心に無機系ナノチューブの研究開発が行われてきた。また、この粉末を利用し、ドラッグデリバリーシステムとして利用される実験も多く、本申請研究も骨補填材としてTNTを利用することを目的とした新規の実験である。TNTの性質を効果的に利用することで顎骨欠損に悩む患者に対し、早期の硬組織形成および上皮の緊密性の確保を誘導する新規材料の創製が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we will examine the effect of coating amelogenin on TNT prepared by low-temperature chemical synthesis method on the material surface and on the hard and soft tissues around the implant. TNT powder precipitated by the low-temperature chemical synthesis method on titanium oxide powder was immersed in an amelogenin solution for a certain period of time and observed with a SEM, revealing that the TNT powder was coated with amelogenin. In addition, TNT was seeded on rat bone marrow cells and an in vitro evaluation was performed, it became clear that a high ability to induce hard tissue differentiation was induced.

研究分野：生体材料

キーワード：TNT アメロジェニン 骨補填材

1. 研究開始当初の背景

近年、顎骨欠損に対する再建には、患者の自家骨や金属インプラントを用いた再建手術を行うのが一般的である。しかし、自家骨移植には採取できる骨量の限界、採取部位の二次的損傷や術後感染等のリスクが問題視されている。そこで注目されるのは歯科用インプラントであるが、歯科インプラント治療の課題の一つには、治療期間を長引かせる最大の要因であるオッセオインテグレーション期間の短縮がある。インプラント体の表面性状がオッセオインテグレーションに影響を与え、それが期間短縮に関係しているという報告もある。

インプラント周囲組織の歯周組織再生に期待されるものとしてエムドゲイン(EMD)が臨床応用されている。しかし、EMDはヒト由来ではないことより、患者からの拒否感も否めない。そこで、EMD含有の主要なタンパク質の一つであるアメロジェニンに着目し、ヒト歯根膜細胞への応用を検討したところ、該当細胞の増殖・遊走能および各種遺伝子の発現また硬組織誘導能の向上に寄与することを明らかとした。

カーボンナノチューブが世にでてからすでに17年が経過し、いくつかの応用製品が実用化される段階にまで技術革新が進められてきた。カーボンナノチューブの発見以降、非酸化物系層状化合物を中心に無機系ナノチューブの研究開発が行われてきた。こうした状況の中、機能性材料としての展開が期待できる酸化物のナノチューブについても次第に関心が高まり様々な酸化物ナノチューブが合成されるようになった。ナノチューブを形成しうる金属酸化物の中で、酸化チタンは現在、特に注目されている物質の一つで、酸化チタンナノチューブ(TNT)は、内径5nm、外径8nm程度であり原料酸化チタンと比べ多くの水酸基を含有している。

TNTは、低温化学プロセスで合成可能、テンプレートなしで自己組織的に生成、高比表面積を有する、アナターゼ型酸化チタンを基本骨格とするといった特徴がある。これまで、TNTが優れた色素増感型太陽電池材料として働き、高い発電効率を示すことや、カチオンドープにより導電性と耐熱性が同時に改善できるなどが示されており、その可能性はエネルギー創製環境対策材料や新しい高機能デバイス等、さまざまな応用が期待されている。

従来TNTは酸化チタン粉末を用いてこのようなメカニズムで反応が起こっていた。高温、高濃度の水酸化ナトリウムを作用させることによって、アモルファス状を経て、このようなシート状になる。このシートが洗浄される過程において、めくれ剥がれ落ちてナノチューブ構造が生成すると推測できる。

本申請者および共同研究者は純チタン金属表面に濃アルカリ処理を施すことでナノシート構造を形成することでSD系ラットの骨髄間葉系細胞の硬組織誘導能を向上させる可能性を示唆した。また、同構造はラットの下大動脈より抽出した血管内皮細胞の初期接着および遺伝子発現、および管腔形成能を向上させ、インプラント埋入周囲組織の微小血管構築にも有用であることを報告した。本構造はインプラントの初期固定時に優れた構造であることが推察される。

本報告と同様にTNTも新規骨補填材として有用であるという期待があるが、TNTをドラッグデリバリーシステムとして臨床応用するためには、TNTに対してどのような処理を行うべきか検討する必要がある。

2. 研究の目的

TNTを用いるメリットとしては、ミクロ・ナノ構造の細胞の足場が形成される、超親水性を有する、酸化物を構成する、高比表面積に起因した高イオン吸着能を有する、といったことがあげられ、インプラント埋入周囲組織の硬組織の形成に必要とされる骨髄細胞の接着、増殖、分化に有効であると考えられる。申請者はこの性質を利用し、早期の骨形成および強固な連結に必要なハイドロキシアパタイトをドープすることを想起した。ハイドロキシアパタイトにTNTを媒介することで、顎骨欠損部の早期硬組織形成が期待される。そこで、本研究の目的は、TNT粉末へのハイドロキシアパタイトドープが顎骨欠損部位の硬組織形成にどのような影響を与えるのか検討することで、新規骨補填材の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TNTの合成方法および適正濃度の抽出

TNTは低温化学合成法により作製する。10Mの水酸化ナトリウム水溶液800mlを作製し、そこにTiO₂粉末を2g加える。そのボトルをオイルバスに入れ115°Cに維持したまま、24時間攪拌還流し、得られたスラリーに超純水を加え、粉末を洗浄、塩酸を加えることで、TNT粉末を作製する。次に、生後7週齢のSD系雄性ラットの両側大腿骨から骨髄間葉細胞を採取し3代目を実験に供した。細胞を1穴あたり4×10⁴個ずつ各試料上に播種し、培地に10mMβ-グリセロン酸ナトリウムと82μg/mlアスコルビン酸、10Mデキサメタゾン含有の分化誘導培地を用い、先ほどのTNT粉末を所定濃度(0, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2ppm)で共培養した。培養後14, 21日後のALP活性および21, 28日後のカルシウムの析出量を測定した。培養開始7, 21日後の培養細胞より逆転写後得られたmRNAよりRunx2 mRNA, OCN mRNAの遺伝子発現について比較・検討した。統計学的解析には、各測定値に一元配置分散分析を行った後、Tukeyの多重比較検定を行った。

有意水準は 5% とした。

(2) TNT へのアメロジェニンコーティング

TNT 粉末を各種濃度のアメロジェニン水溶液に浸漬させたもの、TNT 粉末、酸化チタン粉末を実験試料として用意する。表面解析は各種材料を SEM, XPS, TEM にて行い、アメロジェニンコーティングができているかどうかを評価する。

(3) アメロジェニンコーティング TNT の生体適合性評価

生後 7 週齢の SD 系雄性ラットの両側大腿骨から、骨髄間葉細胞を採取した。本研究は、大阪歯科大学動物実験委員会の承認を得て行った。骨髄間葉細胞の初代培養を確立、継代し 3 代目を実験に共試した。プレートに 1 穴あたり 4 万個の細胞を播種後、培地を分化誘導培地に交換し、分化誘導を開始した。細胞を 37 °C, 5 %CO₂ を含む加湿条件下で培養した。細胞はコンフレントに達するまで、各試料上で培養した。培地に 10 %FBS および骨分化誘導剤 (10 mMβ-グリセロリン酸ナトリウム (和光純薬, 東京, 日本), 80 μg/ml アスコルビン酸 (ナカライテスク, 京都, 日本), 10M デキサメタゾン含有の分化誘導培地を用い分化誘導を開始した。培養開始 7 および 14 日後における各々の培養細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、0.2 %トライトン (Sigma, St. Louis, MO, USA) にて抽出・溶解した。ALP 活性の測定には、Alkali Phosphatase Luminometric ELISA Kit® (Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いメーカー指示に従い ALP 活性の測定を行った。DNA の定量を、the Pico green Double standard DNA Assay Kit (DS ファーマバイオメディカル, 大阪, 日本) を用いメーカー指示に従い行った。DNA の定量後、DNA の定量あたりの ALP 活性を算出した。培養 21 および 28 日後における細胞外マトリックスに析出したカルシウム量を 10 %ギ酸にて抽出した。カルシウム析出量は、Calcium E-test Kit (和光純薬, 東京, 日本) を用いて定量した。実験群および対照群の各種培養後の培養細胞より逆転写後、mRNA を抽出し、アプライドバイオシステム社製 StepOne Plus™ Real-Time PCR System を用いて実験群と対照群における骨形成に関する遺伝子のマーカーについて比較検討した。

4. 研究成果

(1) TNT の適正濃度の検証

細胞培養実験の結果より、骨芽細胞への分化を決定づける因子である Runx2 mRNA の遺伝子発現は TNT 含有群で未含有群と比較して高い値を示した。後期の石灰化および石灰化調節因子に関係する遺伝子である OCN mRNA の遺伝子発現は TNT 含有群で未含有群と比較して有意に高い値を示した。培養後 14, 21 日後の ALP 活性および 21, 28 日後のカルシウムの析出量は TNT 含有群で未含有群と比較して有意に高い値を示した。また、すべての評価で TNT の濃度依存的に硬組織分化誘導に関するマーカーは増加したが、一定濃度を境に減少した。TNT (1ppm) 刺激時に最も高い誘導能を示した。

(2) アメロジェニンコーティング TNT の生体適合性の検証

SEM および TEM による観察結果では、実験群ではアメロジェニンと推察される構造が示された。XPS では、実験群で TNT 構造にタンパク質のコーティングを認めアメロジェニンがコーティングされていることが明らかとなった。各種細胞を使用した in vitro 評価における解析結果では、全ての検討項目において実験群で対照群と比較して有意に高い値を示した。

以上の結果により、濃アルカリ処理を施した純チタン金属表面へのアメロジェニンのコーティングが in vitro レベルでインプラント埋入周囲組織の硬組織分化誘導に大きな影響を与えることを明らかにした。

また、この硬組織はセメント質である可能性が遺伝子解析から明らかでこの新規材料は硬組織および軟組織を同時再生できる材料として期待できる。しかし、in vivo レベルを想定した場合、顎骨欠損部に TNT を均一に分散させるのは困難であり、TNT を骨補填材として応用するため、コラーゲンゲルを使用することを考え、次年度の新規科研費が採択され、検証を開始している。

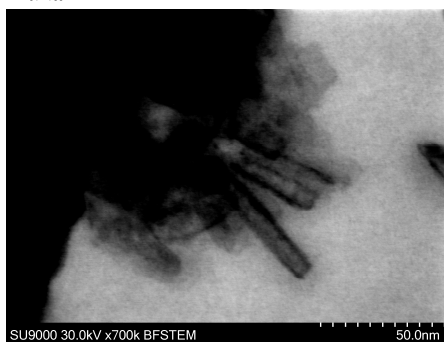


図 1 アメロジェニンコーティング TNT の TEM 像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 乾志帆子, 小正 聡, 田代悠一郎, 馬 琳, 王 欣, Yan Sifan, 李 敏, 岡崎定司
2. 発表標題 純チタン金属板表面における表面粗さが上皮細胞の初期接着に与える影響について
3. 学会等名 第51回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2021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
---------	---------