

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K21029

研究課題名（和文）カーボンナノホーン修飾チタン上における骨形成とリモデリング機構の解明

研究課題名（英文）Osteogenesis and remodeling mechanisms on carbon nanohorn-modified titanium.

研究代表者

木村 貞仁（Kimura, Sadahito）

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：60910635

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：カーボンナノホーン（CNHs）を表面修飾したTi（CNH/Ti）上でマクロファージを培養し、マイクロアレイによる遺伝子解析、ELISAによるサイトカインの発現分析、レーザー共焦点顕微鏡を用いた免疫細胞学的観察、qRT-PCRによるサイトカインの測定を行い、マイクロアレイ解析を行った。その結果、CNHsがマクロファージの組織再生に關与するM2マクロファージへの分極を誘導する可能性をより強く示唆した。さらに、*in vivo*においてもCNH/Ti周囲のマクロファージのM2の蛍光強度は、Ti周囲と比較して高い傾向を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者らは、高い生体適合性を有すカーボンナノホーン（CNHs）を用いた口腔インプラントの開発を目的としている。既にCNHsを貪食したマクロファージが骨芽細胞の分化を促進し、CNHsを修飾したTi（CNHs/Ti）により骨形成が促進されることを報告した。インプラントの正常な骨結合には埋入後の免疫反応と骨リモデリングが不可欠である。本研究では、CNHs/Tiの骨形成メカニズムへの關与と骨リモデリングに与える影響を調べるために *in vivo* でのCNHsを貪食したマクロファージの分極と、骨芽細胞と骨髄間質細胞の共培養における発現因子を検索する。

研究成果の概要（英文）：Macrophages were cultured on Ti (CNH/Ti) with surface-modified carbon nanohorns (CNHs) and subjected to genetic analysis by microarray, cytokine expression analysis by ELISA, immunocytological observation using laser confocal microscopy, and cytokine measurement by qRT-PCR. Microarray analysis was performed.

The results strongly suggested that CNHs may induce polarization of macrophages to M2 macrophages, which are involved in tissue regeneration.

Furthermore, the fluorescence intensity of M2 in macrophages around CNH/Ti tended to be higher than that around Ti *in vivo*.

研究分野：カーボンナノホーン

キーワード：カーボンナノホーン M1マクロファージ M2マクロファージ 分極化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カーボンナノホーン (CNHs) は、物理的・生物学的特性から、生体材料への応用が期待されている。これまでに我々は、CNHsを固着したGBR膜周囲の骨形成が促進されること、CNHsを貪食したマクロファージが間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進すること、CNHsを修飾したTi (CNH/Ti) が骨芽細胞の増殖および骨形成を促すことを報告した。

これらの結果より、CNH/Ti表面のCNHsがマクロファージを介した骨形成に関与すると考えられた。マクロファージは、炎症性サイトカインを分泌するM1マクロファージと、組織リモデリングに関与するM2マクロファージに分極することが知られている。

2. 研究の目的

本研究では、CNH/Ti上でのマクロファージの分極を検索し、骨欠損部を被覆したCNH/Ti近傍のマクロファージの観察を行った。これにより、CNH/Tiがマクロファージと骨形成に与える影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Ti (厚さ 1mm × 直径 9mm, 純度 99.5%, T&I) 表面に CNHs を泳動電着し、CNH/Ti を製作した。マウス由来単球マクロファージ様細胞 (J774A-1) を CNH / Ti 上に培養し、走査型電子顕微鏡 (SEM) ならびに透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察、ELISA と qRT-PCR によりサイトカイン (TNF α , IL6, IL10) の発現量を測定し、有意差を判定した。さらに、蛍光免疫染色にて CD86 (M1 マーカー) と CD206 (M2 マーカー) の発現を観察し、蛍光強度の規格化により有意差検定を行った。また、BALB/cA マウス (6 週齢) の頭蓋骨に直径 4mm の骨欠損を形成し CNH/Ti で被覆した。7 日後に周囲組織とともに摘出し、脱灰パラフィン標本を作成した。免疫組織化学染色を施し、マクロファージの発現を確認した後に免疫蛍光染色にて観察した。

4. 研究成果

TEM観察においてJ774A-1内にCNHsが観察された。培養3日後のM1表現型に関連するサイトカインであるTNF α (ELISA) とIL6 (qRT-PCR) については、Tiの発現量はCNH/Tiに比較して有意に低く、M2表現型のIL10 (qRT-PCR) については、CNH/Tiの方が有意に高かった。

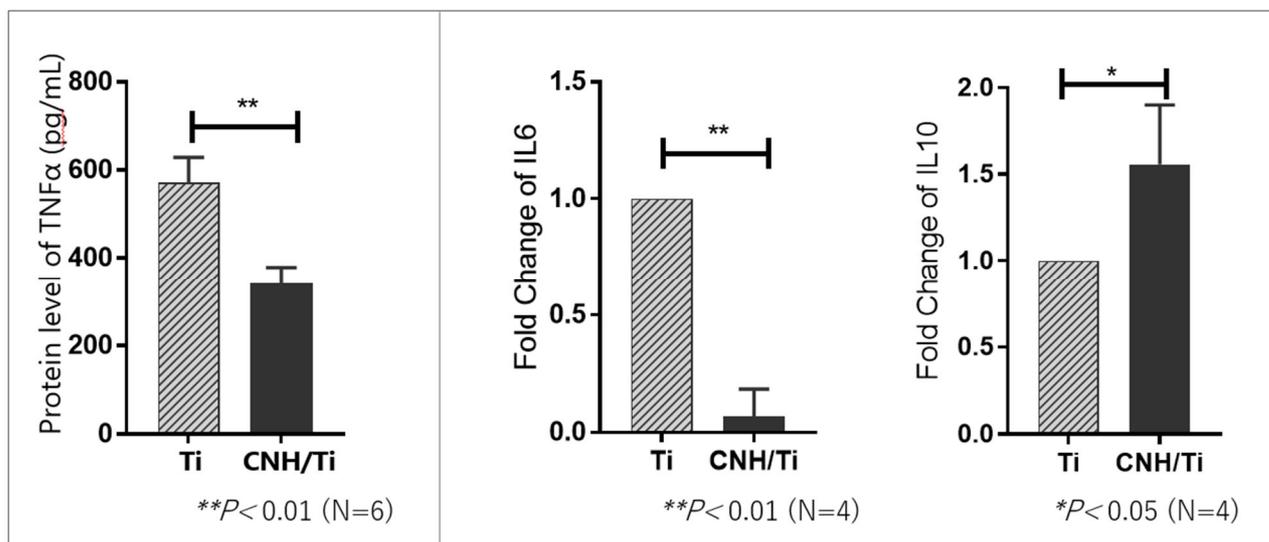


図1. 培養3日後のサイトカイン量比較

M1マーカーであるCD86の蛍光強度については、TiがCNH/Tiに比較して有意に高く、M2マーカーであるCD206の蛍光強度については、CNH/TiがTiに比較して有意に高かった。

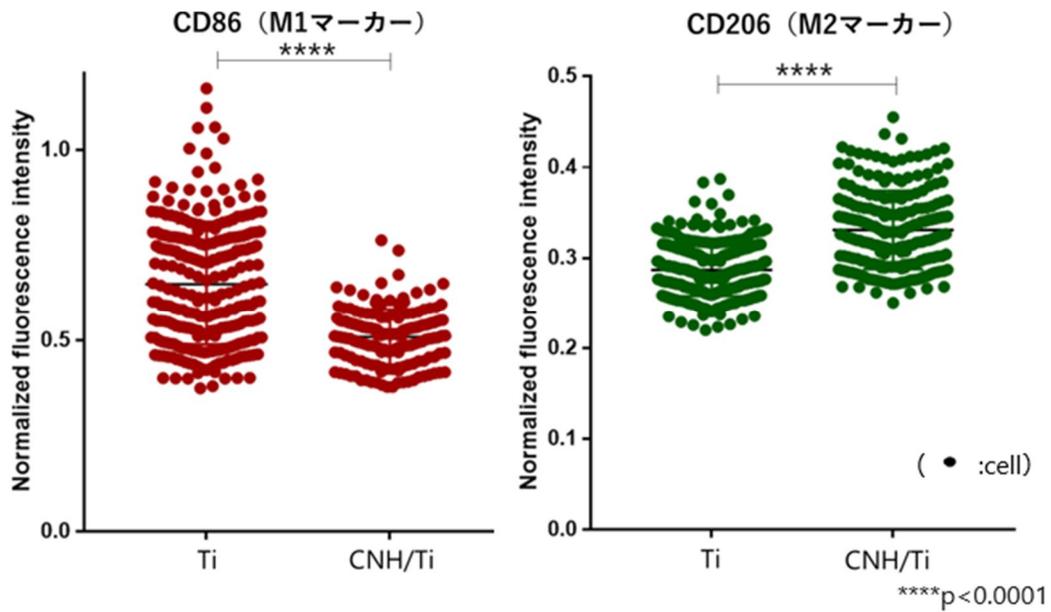


図2 . マクロファージの蛍光強度比較

動物実験について免疫組織化学染色ならびに蛍光染色を行い観察した結果、CNH/Ti周囲のマクロファージのM2の蛍光強度は、Ti周囲と比較して高い傾向を示した。

TNF α とIL6は、M1マクロファージが分泌する炎症性サイトカインであり、骨形成の阻害因子である。一方で、IL10はM2マクロファージから分泌され、組織リモデリングに関与すると報告されている。以上より、CNH/Ti表面のCNHsは、M1マクロファージへの分極を抑制し、組織再生に関与するM2マクロファージへの分極を誘導することにより骨形成に影響する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村貞仁, 平田恵理, 高野勇太, 前田由佳利, 坂入正敏, 湯田坂雅子, 横山敦郎
2. 発表標題 カーボンナノホーン修飾チタンにおけるマクロファージの極性変化
3. 学会等名 第12回ナノカーボンバイオシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村貞仁, 平田恵理, 前田由佳利, 横山敦郎
2. 発表標題 カーボンナノホーン修飾チタン上のマクロファージの挙動と分極
3. 学会等名 第131回日本補綴歯科学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sadahito Kimura, Eri Hirata, Yuta Takano, Yukari Maeda, Masatoshi Sakairi, Masako Yudasaka, Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Exploration of macrophage polarization on titanium coated with carbon nanohorns.
3. 学会等名 第11回ナノカーボンバイオシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村貞仁, 平田恵理, 前田由佳利, 横山敦郎
2. 発表標題 カーボンナノホーン修飾チタン上のM1-M2マクロファージの分極
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
---------	---------