

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390453

研究課題名(和文) 骨特異的機能性タンパク質の3次元チタンファイバー焼結体への固定化による顎骨再建

研究課題名(英文) Jaw bone regeneration by bone-related protein immobilization to three-dimensional titanium fiber materials

研究代表者

早川 徹 (Hayakawa, Tohru)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：40172994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず、基礎実験として、水晶発振子マイクロバランス法によるタンパク質とチタンとの吸着挙動の解析およびフィブロネクチン固定化チタン上での骨芽細胞様細胞の付着、増殖について検討した。次に、3次元チタンファイバー焼結体および3次元チタンワイヤー)にトレスシルクロリド法を用いて、コラーゲンまたはフィブロネクチンを固定化し、動物埋入実験により骨形成に与える影響について調べた。その結果、タンパク質固定化3次元チタンファイバー焼結体および3次元チタンワイヤーの顎骨再建材料としての有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, protein adsorption towards titanium was first analyzed by quartz-crystal microbalance method and attachment and proliferation of osteoblast-like cells on fibronectin immobilized titanium was also investigated. Afterwards, collagen or fibronectin was immobilized onto three-dimensional titanium fiber web and titanium wire by using tresyl chloride-activation method, and bone regeneration process towards titanium fiber web or titanium wire was evaluated by animal implantation experiments. As a result, it is suggested that protein immobilized titanium fiber web and titanium wire were useful as regenerative materials for jaw bone.

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：歯科生体材料学 再生医学 チタン チタンファイバー チタンワイヤー タンパク質固定化 コラーゲン フィブロネクチン

1. 研究開始当初の背景

癌や不慮の事故などによって顎骨が欠損した場合、未だに自家骨が最も優れた材料とされているが、自家骨移植は患者への負担が大きく、感染などの危険性も指摘されており、新規な人工材料の開発が待望されている。インクジェット造形法を用いて欠損部への適合性を改良したセラミックス人工骨が臨床応用されている (Igawa K 他, *Clin Calcium*,1812,1737-43,2008)。しかしながら、この人工骨は荷重がかかる部位での使用には不十分であり、骨誘導能がないために骨癒合が起こるまでに時間が長くかかる欠点が指摘されている。

研究代表者らは、チタン繊維の直径が約 50 μm と非常に細く、かつ 200~500 μm の連続空隙を有しているチタンファイバー焼結体からなる 3次元構造体に着目した。

この 3次元チタンファイバー焼結体は、良好な機械的強度と形状保持性、成形性を有している。

研究代表者らは、3次元チタンファイバー焼結体の骨適合性の向上を目指して、新規な溶液コーティング法を開発して 3次元チタンファイバー焼結体にアパタイト薄膜コーティング処理を施し、動物実験によってその有効性を確認している (Hayakawa 他, *J Mater Sci*,19,2087-2096, 2008)。

一方、人工材料にフィブロネクチンなどの細胞接着タンパク質や骨形成因子である BMP を固定化して、骨形成を促進させる試みは数多く報告されているが、チタン表面への有効な固定化の報告は数少ない。Jansen らは、エレクトロスプレー法でチタン表面にアルカリフォスファターゼ (ALP) を固定化して、その効果を調べている (Jansen 他, *Biomaterials*, 30, 6407-6417, 2009)。エレクトロスプレー法はチタン平面への固定化には有効であるが、立体構造を有する 3次元構造体への固定化は現状では不可能である。

研究代表者らは、チタンへの簡便かつ確実なタンパク質固定化法としてトレシルクロリド法を開発した (Hayakawa 他, *J Biomed Mater Res*,67A,684-688,2003)。トレシルクロリド法は、トレシルクロリド ($\text{CF}_3\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Cl}$: 液体) をチタン表面に塗布して反応させる手法である。硝酸酸化やアルカリ処理などの前処理が不要であり、常温で反応が進行する、固定化方法が簡便である、などの利点を有している。

今までに、トレシルクロリド法を用いて細胞接着タンパク質のチタン平面への固定化条件およびメカニズムについて検討してきた。 (Hayakawa 他, *J Biomed Mater Res*, 73B, 271-276, 2005) また、フィブロネクチンや RGD ペプチドを固定化して細胞応答を調べた結果、固定化によって骨芽細胞様細胞の付着数が増加し、骨形成に関与する遺伝子発現が上昇することを見出した (Hayakawa 他, *Dent Mater J*,26,647-655,2007. *Dent*

Mater J,27, 744-750,2008)。

BMP や ALP, オステオポンチンなど骨形成に関与する骨特異的な機能性タンパク質をチタンに固定化してその効果を調べた研究は非常に数少ない。トレシルクロリド法は、タンパク質の種類に関わらず、チタンに固定化できる手法である。トレシルクロリド法を用いて、骨特異的な機能性タンパク質を 3次元チタンファイバー焼結体に固定化できれば、骨形成が促進され、その結果、顎骨治癒までの時間が短くなり、骨との接合強度が向上する事が期待できる。すなわち、顎骨欠損の治癒促進機能を有するチタンファイバー焼結体からなる 3次元構造体を作製する事が可能になる。

2. 研究の目的

まず、基礎的な実験として機能性タンパク質のチタンへの反応について、水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法を用いて解析を行う。QCM 法はナノスケールでタンパク質の吸着をナノスケールで解析できる手法である。

その後、トレシルクロリド法を用いて機能性タンパク質を固定化したチタン上での骨芽細胞様細胞の培養実験を行い、固定化された機能性タンパク質が骨芽細胞様細胞の増殖や分化に与える影響について検討する。

以上の検討をもとに、機能性タンパク質を固定化した特異的な機能性タンパク質を固定化した 3次元チタンファイバー焼結体の生物学的特性について、動物埋入実験によって検討する。3次元チタン構造体として、3次元チタンワイヤーについても検討を行う。チタンワイヤーは 1本のチタンファイバーを折り曲げて 3次元構造体を作製したものである。焼結操作を行わないため、機械的強度は 3次元チタンファイバー焼結体より劣るが成形性には優れている。ラット頭蓋骨骨膜下およびウサギ脛骨欠損に機能性タンパク質固定化チタンファイバー焼結体およびチタンワイヤーを埋入して、骨形成速度や新生骨形成量などについて評価して、機能性タンパク質が固定化されることによる機能発現への影響について検討する。

3. 研究の方法

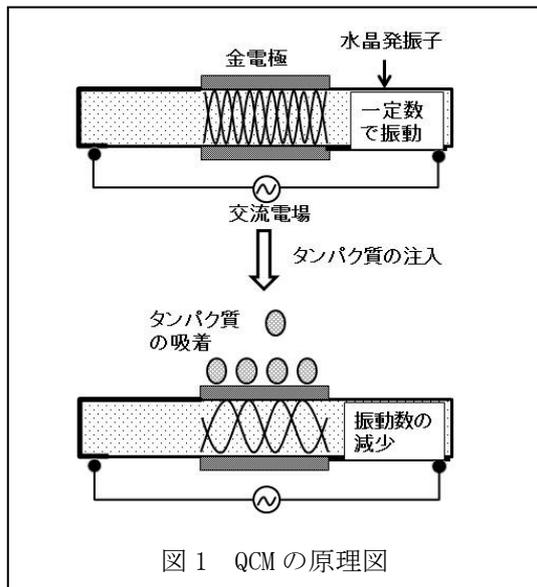
(1) 水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法によるチタンへのタンパク質吸着の解析

水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法は共振している水晶発振子の振動数の減少からタンパク質の生体材料への吸着量を検出できる方法である。本研究では、27MHz QCM を使用して、チタン表面へのタンパク質の吸着挙動を観察した。タンパク質としては、細胞接着タンパク質であるフィブロネクチンとコラーゲン、およびアルブミンについて検討した。QCM の原理を図 1 に示す。

QCM 装置として、500 μL のセルを備えた 27-MHz AFFINIX Q_N (イニシウム) を使用した。

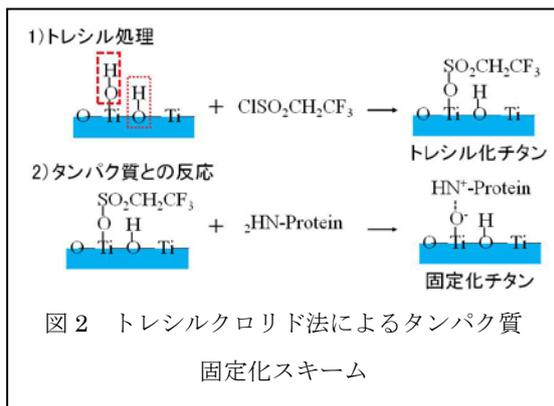
温度は $25 \pm 1^\circ \text{C}$ に設定し、セル中の溶液を攪拌しながら測定した。

チタンセンサーは、金電極上にスパッタコーティングを施して作製した。牛アルブミン、ヒト血漿フィブロネクチンおよびアテロコラーゲンをそれぞれ $50 \mu\text{g/ml}$ の濃度でリン酸緩衝液 (PBS, pH 7.4) に溶解した。それぞれのタンパク質溶液を PBS 溶液を満たした QCM 装置付属のセル中に注入した。振動数の減少を観察し、注入 30 分後のタンパク質吸着量を Sauerbrey の式から算出した。



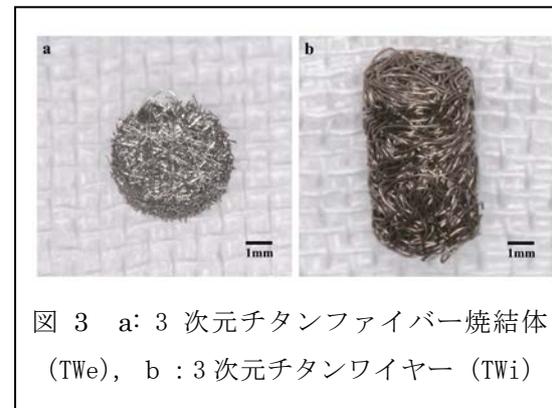
(2) タンパク質固定化チタン上での骨芽細胞様細胞の培養実験

図 2 にトレシルクロリド法によるタンパク質固定化スキームを示す。直径 15mm の鏡面加工した ($R_a: 10\text{nm}$ 以下) Ti ディスク (Tim) およびサンドブラスト処理を行った ($R_a: 10 \mu\text{m}$ 以上) Ti ディスク (Tis) を用いた ($n=4$)。各 Ti ディスクにトレシルクロリド液を過剰塗布し、 37°C で 2 日間恒温槽にて反応させた。アセトン洗浄後、フィブロネクチン溶液にトレシル化 Ti を 37°C 、1 日間浸漬して、フィブロネクチンを固定化した。それぞれ Timf, Tisf と略す。細胞培養は通法に従い、MC3T3-E1 細胞を Tim, Tis, Timf, Tisf 上にて培養した。培養 1, 3, 15, 52 日後の DNA 量の測定および走査電子顕微鏡による形態観察を行った。



(3) 3次元チタンファイバー焼結体 (TWe) および 3次元チタンワイヤー (TWi) へのタンパク質固定化と動物埋入実験

円板状の TWe ($\Phi 4.0 \text{ mm} \times 2.0 \text{ mm}$, ファイバー径 $50 \mu\text{m}$, 気孔率 87%) と、円柱状の TWi ($\Phi 3.5 \text{ mm} \times 7.0 \text{ mm}$, ファイバー径 $85 \mu\text{m}$, 気孔率 75%) を使用した。図 3 に示す。



トレシルクロリドに TWe, TWi を浸漬して、 37°C で 2 日間反応させトレシル化処理を行った。その後、I型コラーゲン (1mg/ml) 溶液またはフィブロネクチン (1mg/ml) 溶液に、トレシル化処理を行った TWe, TWi をそれぞれ、 37°C で 24 時間浸漬して、コラーゲン固定化 TWe (CollTWe), コラーゲン固定化 TWi (CollTWi), およびフィブロネクチン固定化 TWe (FnTWe), フィブロネクチン固定化 TWi (FnTWi) を作製した。

TWe を用いて骨膜下への埋入実験を行い、外向性骨造成について検討した (承認番号: 第 11073)。9 週齢の雄性 Sprague-Dawley 系性ラットを使用した。吸入麻酔下にて、頭頂部を剃毛し術野を消毒後、骨膜を剥離、挙上し骨膜と頭蓋骨の間に空隙を形成した。その空隙に各試料をそれぞれ 1 個挿入した。埋入 4 週後、および 8 週後に、骨膜を含めて頭蓋骨ごと試料を摘出した。試料数はそれぞれの条件で $n=4$ とした。

また、TWi を用いた骨欠損内への埋入実験を行い、内向性骨造成について検討した (承認番号: 第 25P041)。20 週齢の雌性日本白色ウサギを用いた。吸入麻酔下にて両側大腿部を剃毛し、切開を加え大腿骨関節顆を明示した。注水で直径 3.5mm の骨欠損を形成し、左右の骨欠損内部に各試料をそれぞれ 1 個ずつ、1 匹に計 2 個を埋入した。埋入 12 週後に試料を摘出した。試料数はそれぞれの条件で $n=3$ とした。

ラット埋入試料, ウサギ埋入試料, とともに試料摘出後、通法に従いホルマリン固定, アルコール系列による脱水を行い, その後, メタクリル酸メチル樹脂で包埋し, 約 $50 \mu\text{m}$ の非脱灰薄切研磨標本を作製した。メチレンブルー・塩基性フクシンで重染色して, 新生骨の形成状態を光学顕微鏡にて病理組織学的

に観察した。さらに、画像解析ソフトを用いて TWe 内部に形成された新生骨量、垂直的に造成された新生骨の高さを測定した。TWi については内部に形成された新生骨量を定量的に評価した。新生骨量を骨形成率、新生骨の高さを垂直的骨造成率とした。

4. 研究成果

(1) QCM 法による解析結果

測定結果を図 4 に示す。アルブミンを注入した時は振動数のわずかな減少が見られ、フィブロネクチン吸着時の振動数減少の方が、アルブミン吸着時よりも大きかった。コラーゲンが統計学的に有意に最も大きな振動数の減少を示した ($p < 0.05$)。3 種類のタンパク質の吸着量はそれぞれ統計学的に有意差があり、コラーゲンが統計学的に最も大きな吸着量であり、アルブミンが統計学的に最も少ない吸着量を示した ($p < 0.05$)。

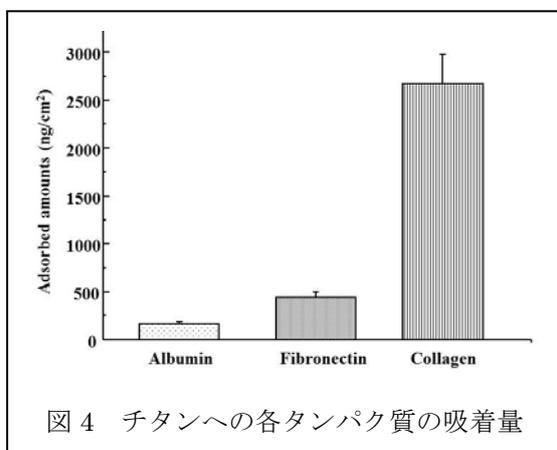


図 4 チタンへの各タンパク質の吸着量

タンパク質のチタンへの吸着は静電的な相互作用が主要因であると推察される。アルブミンおよびフィブロネクチンは等電点の違いから、チタンとの間に静電的な反発力が働いている事が予想される。一方、コラーゲンとチタンの間には、コラーゲンが正に荷電しているために吸引力が増加したと思われる。

(2) 細胞培養実験

図 5 に 1, 3, 15, 52 日後の DNA 量の測定結果を示す。培養 1 日後では、サンドブラスト群が鏡面加工群より高い値を示した。フィブロネクチンを固定化した試料は鏡面加工群では高い傾向を示し、サンドブラスト群では影響が見られなかった。3 日後も 1 日後と同様にサンドブラスト群の DNA 量の方が高かった。フィブロネクチン固定化試料の比較では、鏡面加工群は差は見られなかったが、サンドブラスト群では Tisf の方が統計学的に有意に高かった ($p < 0.05$)。

培養 15 日後、52 日後では DNA 量はいずれの試料でも増加した。培養 52 日後では、フィブロネクチンを固定化した Timf, Tisf が固定化しない場合に比べて有意に高い DNA 量を示した ($p < 0.05$)。

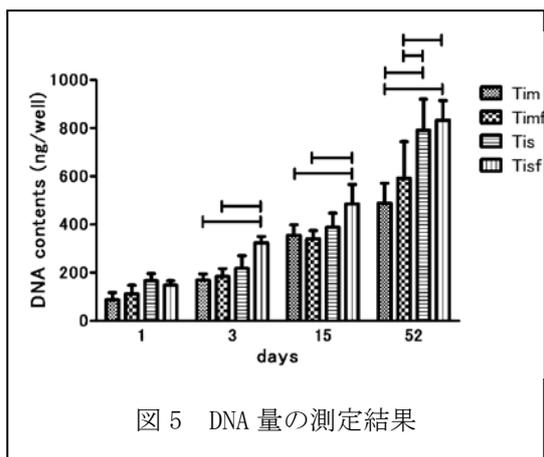


図 5 DNA 量の測定結果

図 6 に培養 1 日後の Tim および Timf の SEM 観察結果を示す。フィブロネクチンを固定化した Timf の方が Tim より多くの細胞が観察され、細胞定着が良好なことが分かる。

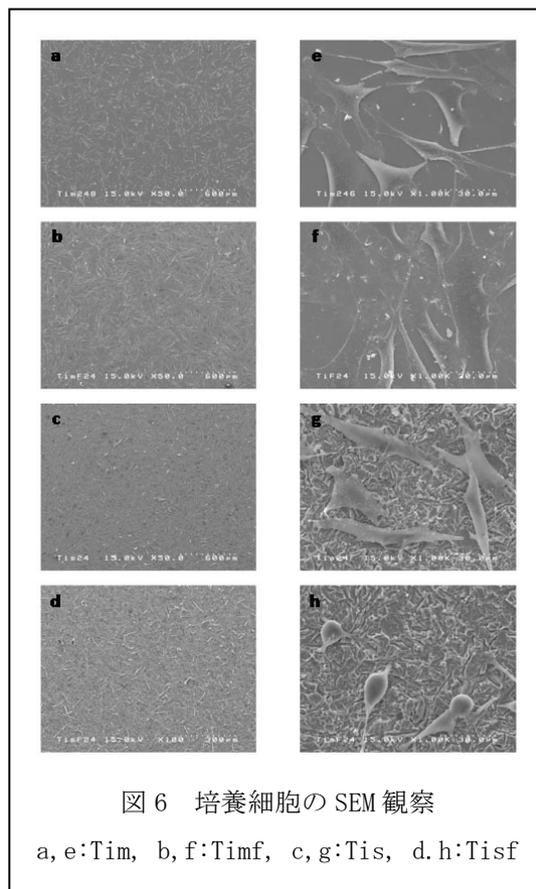


図 6 培養細胞の SEM 観察

a, e:Tim, b, f:Timf, c, g:Tis, d, h:Tisf

また、フィブロネクチン固定化試料の方が細胞の配列が規則正しく並んでいることが分かる。本研究の結果より、フィブロネクチン固定化が細胞接着に与える影響が確認された。

(3) 動物埋入実験

機能性タンパク質固定化の TWe および TWi の構造を SEM にて観察した結果、機能性タン

パク質固定化後も, TWe および TWi の形状は維持されており, 気孔の閉塞などは認められなかった (図 7).

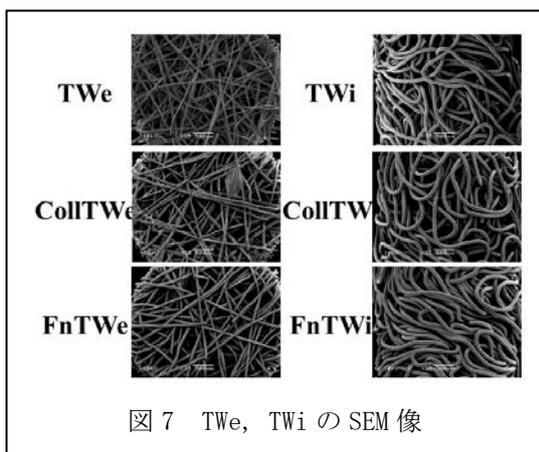


図 7 TWe, TWi の SEM 像

TWe を用いたラット骨膜下への埋入実験では, 埋入 4 週後, 8 週後とも, 全ての試料において骨形成は頭蓋骨側にしか認められなかった. 8 週後の病理組織像を図 8 に示す. CollTWe, FnTWe は, 血管増生と結合組織の伸展が多く認められた.

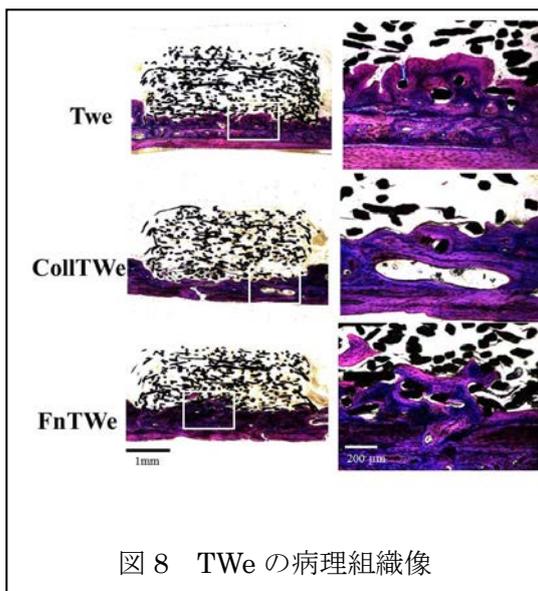


図 8 TWe の病理組織像

骨形成率を測定した結果を表 1 に示す. 埋入後 4 週, 8 週ともに, 各試料間で統計学的に有意差は認めなかった ($p > 0.05$). 垂直的骨造成率については, 表 2 に示すように埋入後 8 週で, CollTWe と FnTWe が TWe に比較して統計学的に有意に高い値を示した ($p < 0.05$).

表 1 TWe 内部での骨形成率 (%)

	4 週	8 週
TWe	4.2 (2.4)	6.6 (2.7)
CollTWe	5.1 (2.7)	7.0 (0.9)
FnTWe	6.0 (3.7)	7.9 (1.4)

表 2 TWe 内部での垂直的骨造成率 (%)

	4 週	8 週
TWe	10.5 (2.7)	9.0 (0.6)
CollTWe	9.1 (1.5)	14.2 (1.4)*
FnTWe	10.8 (2.6)	11.6 (1.2)*

* : $p < 0.05$

TWi を用いたウサギ骨欠損内への埋入実験の結果を図 9 に示す. CollTWi と FnTWi については皮質骨側に顕著に骨形成が認められた. 骨形成率の結果を表 3 に示す. CollTWi, FnTWi が TWi に比べて統計学的に有意に高い値であった ($p < 0.05$).

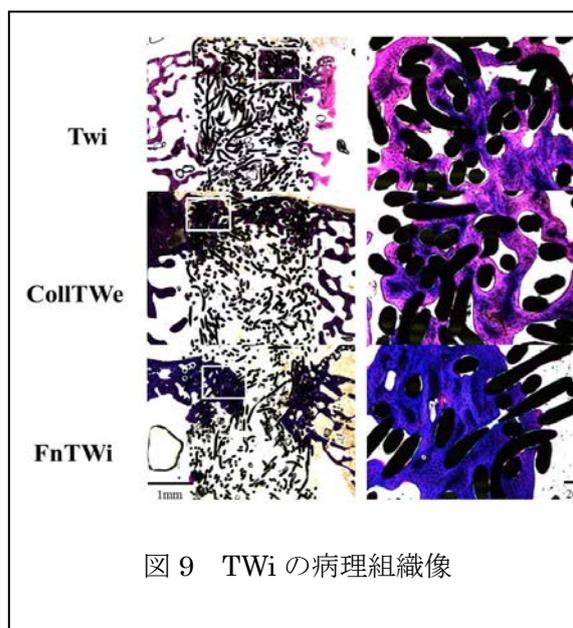


図 9 TWi の病理組織像

表 3 TWi 内部での骨形成率 (%)

	12 週
TWe	21.4 (2.4)
CollTWi	35.1 (4.7)*
FnTWi	34.1 (3.6)*

* : $p < 0.05$

以上, 3 次元チタンファイバー焼結体および 3 次元チタンワイヤーに固定化されたコラーゲンやフィブロネクチンが骨芽細胞の増殖, 分化に影響を与え, 骨形成を促進させることが分かった.

本研究の結果から, 機能性タンパク質を固定化した 3 次元チタンファイバー焼結体および 3 次元チタンワイヤーの顎骨再建材料としての臨床応用の可能性が示された.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Tsuyoshi Amemiya, Yugo Fukayo, Kazutoshi Nakaoka, Yoshiki Hamada,

- Tohru Hayakawa. Tissue response of three-dimensional titanium fiber structure. *Journal of Hard Tissue Biology*. 査読有, 23(2), 137-148, 2014.
- ② Yuki Raita, Koichiro Komatsu, Tohru Hayakawa: Bone response of collagen- or laminin-immobilized screw-type titanium implants using tresyl chloride-activated technique. *Journal of Oral Tissue Engineering*. 査読有, 11(2), 113-122, 2013.
- ③ Eiji Yoshida, Tohru Hayakawa: Monitoring of adsorption of pellicle proteins to gold, silica and titanium by using quartz-crystal microbalance method. *Dental Materials Journal*. 査読有, 323(6), 883-8887, 2013.
- ④ Eiji Yoshida, Susumu Imai, Nobuhiro Hanada, Tohru Hayakawa. Biofilm formation on titanium and apatite surface by using artificial mouth system. *Journal of Hard Tissue Biology*. 査読有, 22(4), 417-422, 2013.
- ⑤ Tohru Hayakawa, Hiroki Hara, Tsuyoshi Amemiya, Satoshi Hirayama, Fei Yang, Hong Shen, Shenguo Wang, Yoshiki Hamada, Mitsunobu Sato: Cortical bone response towards porous composite of PLGA and apatite prepared from calcium complexes. *Journal of Hard Tissue Biology*. 査読有, 21(4), 343-350, 2012.
- ⑥ Furuya Nobuaki, Wada Takeshi, Ozawa Daisaku, Yamanishi Yasufumi, Hayakawa Tohru. Quartz-crystal microbalance monitoring for the adsorption of cell adhesive proteins onto a titanium surface. *日本口腔インプラント学会誌*. 査読有, 25(3), 17-23, 2012.
- ⑦ Tohru Hayakawa, Tadao Fukushima. Fibronectin adsorption by using 27MHz quartz-crystal microbalance technique. *Journal of Tissue Engineering*. 査読有, 10(1), 28-33, 2012.
- ⑧ 早川 徹. 27MHz 水晶発振子マイクロバランス法を用いたタンパク質の吸着解析. *歯科産業学会誌*, 査読有, 26(1), 15-20, 2012.
- ⑨ Tohru Hayakawa, Eiji Yoshida, Yoshitaka Yoshimira, Motohiro Uo, Masao Yoshinari. MC3T3-E1 cells on titanium surfaces with nanometer smoothness and fibronectin immobilization. *International Journal of Biomaterials*. Article ID 743465, 査読有, 6 pages, doi:10.1155/2012/743465, 2012.
- ⑩ Eiji Yoshida, Yoshitaka Yoshimura,

Motohiro Uo, Masao Yoshinari, Tohru Hayakawa: Influence of nanometer smoothness and fibronectin immobilization of titanium surface on MC3T3-E1 cell behavior. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*. 査読有, 100A(6), 1556-1564, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 徹 (Hayakawa, Tohru)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号: 40172994

(2) 研究分担者

福島 忠男 (Fukushima, Tadao)

福岡歯科大学・再生医学研究センター・教授

研究者番号: 80084250

(3) 連携研究者

廣田 誠 (Hirota, Makoto)

横浜市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 20347305