

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861894

研究課題名(和文)ニコチン刺激下にて各種インプラント表面性状が破骨細胞に与える影響

研究課題名(英文)The effects of several implant surface grooved provide osteoclasts with the presence of nicotine.

研究代表者

油井 知雄(yui, tomoo)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：80548438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 600,000円

研究成果の概要(和文)：ニコチン刺激下のもと破骨前駆細胞(RAW264.7)の分化過程をTRAP染色し、 \sim の基質においてTRAP陽性反応の巨細胞を確認した。また培養7日後に細胞の表面形態を走査形電子顕微鏡(SEM)にて細胞を観察した結果、細胞の配列はgrooveと平行方向に楕円形を呈したものが多く、ニコチンによる影響は顕著に認めなかった。さらに各基質上の細胞でのfocal contactの形成への影響を検索するために培養7日目にproline-rich tyrosine kinase 2(Pyk2) mRNAの発現を定量的RT-PCR法で行ったが、これもニコチンの濃度による影響は顕著に認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Osteoclast precursor cells(RAW264.7) were cultured on the three types of grooved substrata with the presence of nicotine. Observation with a stereoscopic microscope confirmed that the cells were positively stained with Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) on the substrata, indicating that they were osteoclasts. Scanning Electron Microscopy (SEM) observation revealed that the osteoclasts were polygonal or round in shape, arranged in a disorganized pattern on the smooth substratum. These results suggest that presence of nicotine was unaffected. In addition, these findings indicate that the gene expression of Pyk2 was unaffected by the presence of nicotine concentration.

研究分野：口腔インプラント

キーワード：破骨前駆細胞 ニコチン

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療は診断から治療に関する技術、材料の進歩により適応症が拡大されている。しかしながら、その生存率は100%ではなく、確実なエビデンスはいまだ不十分である。これは患者側の生体因子が大きく関与していると考えられる。安全かつ確実なインプラント治療を行うためには慎重な術前診査が必要不可欠であり、対象患者の骨質不良の症例ではインプラント治療の成功率は低いと考えられる。わが国においては、人口の急速な高齢化に伴い、インプラント治療の対象者も高齢化がさらに進み、正常骨髄幹細胞の絶対量の低下からもインプラント治療のリスクも高まる一方である。また、インプラント治療の成否の大きく関与する因子として全身疾患、喫煙、肥満、ストレスや食生活習慣などのリスクファクターがある。これらが適切にコントロールされていない場合は、オッセオインテグレーション獲得の障害となる。特に喫煙は歯周組織における環境面からみて最大のリスクファクターであり、歯周病の発症や進行および治療効果の低下に影響することが懸念される。実際にヒト歯根膜線維芽細胞に対して、ニコチンは一定濃度以上で細胞の成長と付着を抑制する傾向が認められている。また、ニコチンに暴露された線維芽細胞の付着能の障害や形態変化が、接合上皮の修復機能を障害することも明らかになっている。また喫煙者は歯肉溝滲出液中のIL-4が少ないことが報告されている。よって、喫煙はサイトカイン産生を抑制している可能性がある。

喫煙のインプラント治療への影響に関してはインプラントの生存率および成功率とも非喫煙者が喫煙者に対して統計学的に有意に高い結果を示す。さらに、喫煙者と非喫煙者のインプラントを埋入後のインプラントの生存率と合併症についての報告では、喫煙者での失敗率は2倍であった。合併症発生

率に関しては、喫煙者と非喫煙者を比較して喫煙者が有意に高い。これらの報告から、禁煙により骨内インプラント治療の失敗や合併症を減少できることが示唆される。一方、インプラントに求められる要件として生体材料を作製する際には材料に毒性が無く、組織親和性が考慮される必要がある。材料表面の性状や形態も組織反応に影響を及ぼすことから注目されてきている。表面形態が組織細胞に及ぼす影響の概念は基質の形態を変えることによって細胞の配列や運動が人工的に制御される。この概念の生体材料への応用として口腔インプラント体(以下、インプラント体)の表面形態に関するものがある。インプラント体では表面に長軸と垂直方向に溝を付与した groove により、骨芽細胞の走行を誘導し、溝の深部への骨形成の促進があげられる。オッセオインテグレーションインプラント埋入時には初期にインプラント体に接する既存骨の吸収がおこるため、破骨細胞はインプラント体に接して出現すると考えられている。実際に、*in vivo*の実験で破骨細胞がインプラント体表面に出現するとの報告もあるが、インプラント体周囲の骨吸収時に多数出現する破骨細胞は骨表面での働きが主なために、インプラント体表面での動態の検索がなされていないのが現状であった。

2. 研究の目的

喫煙によって抜歯後の創傷治癒の遅延や歯槽骨の吸収が惹起され、さらに歯周病を悪化させる可能性も報告されている。将来的にインプラント治療の普及により喫煙者へのインプラント治療の頻度は年々増加していくと考えられ、代表的なタバコの有害物質であるニコチンの影響を把握しておくことは临床上、重要である。本研究ではニコチンがインプラントのオッセオインテグレーションに抑的に作用し、骨形成の代謝バランスを不均衡に傾けるのではないかと考えた。よっ

て、ニコチン刺激下において *in vitro* にて破骨細胞を用いて、インプラントの表面形態との相関性について検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 試料の作製

培養基質として4種類の異なる表面構造を対象とした。不規則で粗い溝が一定方向に付与された 深さ 0.2-0.4 μm の

micro-achieved(micro), 1 μm の溝, 2 μm の ridge が付与された深さ 1.5 μm (narrow),

2 μm の溝, 4 μm の ridge が付与された深さ 1.5 μm (wide) の3種類の groove 基質とコントロールには滑沢 (smooth) な基質を用いた (いずれも University of British

Colombia, Dr. Brunette より供与された)。これらに細胞動態に有意な差を与えるために2種類の基質を プラストエッチング処理 (SLA) Micro-Gap を有する Box 型

(micro-box) を研究計画に追加した。ブリティッシュコロンビア大学の Dr. Brunette らの方法に従い、オリジナルテンプレートをシリコーン印象材で印象採得し、

EPO-TEK (Epo-Tek 302-3, Epoxy Technology Inc.) にてレプリカを作製した。

(2) 細胞培養と培養条件

細胞の培養条件はマウス由来の破骨前駆細胞 (RAW264.7) を 10% FBS, 1% ペニシリンとストレプトマイシン添加の D-MEM 培地で 100mm のディッシュに 4×10^5 個を播種した。細胞観察の際は 4×10^4 個を 6 ウェルプレートに播種し、50ng/ml の rmRANKL, 50ng/ml の M-CSF の存在下で7日間培養し、破骨細胞に分化、促進させた。なおニコチン (NIC) は培養上清に添加、刺激した。

(3) Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色

培養された細胞が破骨細胞であることを確認

するために、培養7日後にPBSで静かに数回洗浄し、4% paraformaldehydeで固定。その後、TRAP染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

(4) 走査型電子顕微鏡的観察

細胞の表面形態およびその微細構造を観察するために、培養7日後にカコジル酸緩衝 2.5% glutaraldehyde 溶液にて固定。PBS による洗浄、蒸留水による洗浄の後、アルコールで脱水し、金蒸着を施して走査形電子顕微鏡 (SEM) にて観察、撮影した。

(5) 定量的 RT-PCR 法

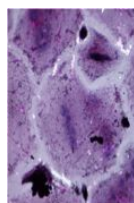
細胞を 4×10^5 個/cm² の濃度で培養し、NIC 刺激後の7日後に total RNA を抽出し、Smooth 基質と groove 基質上の破骨細胞の形成に重要な役割を果たしている proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法で調べた。

なお④～⑤の基質の検討は研究期間の都合により今後の課題とした。

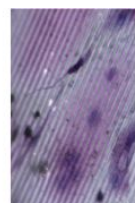
4. 研究成果

(1) TRAP染色

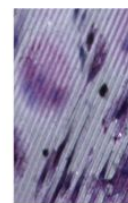
培養した細胞が破骨細胞であることを確認するために、smooth と groove のチタン基質上で7日間培養した細胞に TRAP 染色を行った。NIC 刺激後も①～③の基質において紫色の多核を有する TRAP 陽性反応の巨細胞を確認した。この染色により核の形態や数も確認することができた。Groove 基質上と smooth 基質上を比較すると、groove 基質上の細胞の外周と核が groove の方向に配列する傾向が認められた (下図)。



smooth



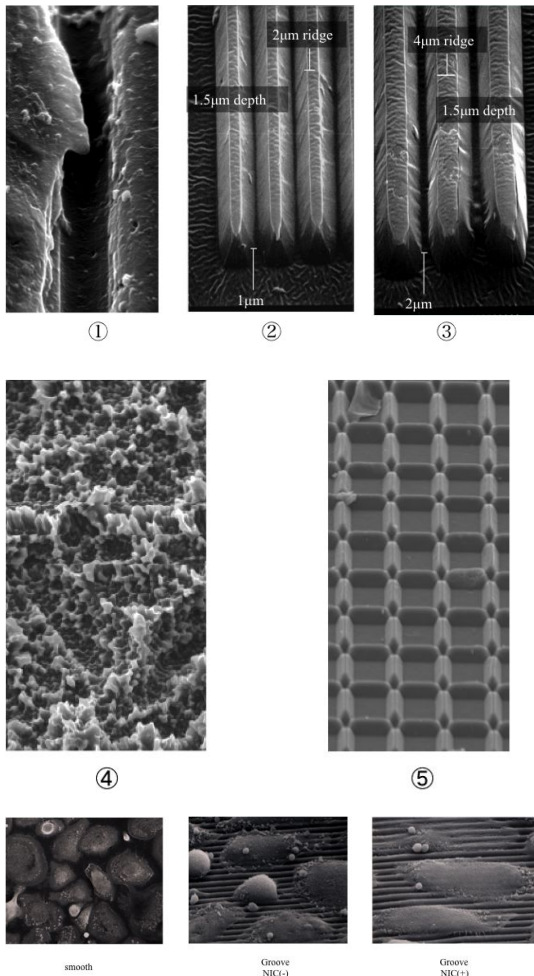
Groove
NIC(-)



Groove
NIC(+)

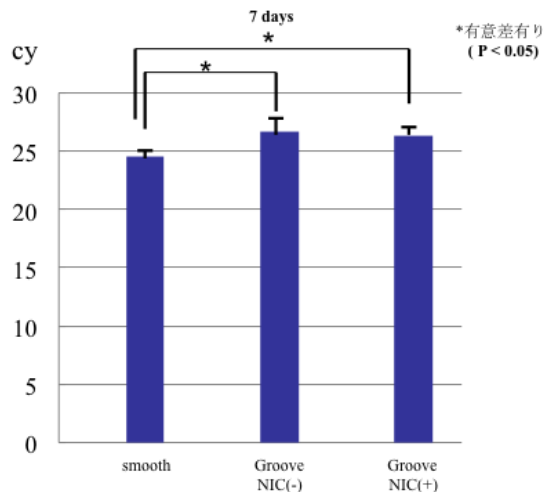
(2) SEM像

まず各基質の形態をSEMで観察した(図2)。その後細胞の表面形態およびその微細構造を観察するために培養から7日後にSEMで各基質上の細胞を観察、撮影した。NIC刺激における①~③のGroove基質上では細胞の配列はgrooveと平行方向に楕円形を呈したものが多く、NIC刺激後による影響は顕著ではなかった。なお細胞周辺部のfilopodiaはsmooth基質上の細胞に比べて多い傾向にあった。またsmooth基質上での細胞は強拡大で観察すると細胞の配列に規則性は認められなかった(下図)。



(3) 定量的RT-PCR法

mRNAの発現を定量的RT-PCR法を培養7日目に行ったが、これもNIC刺激後による影響は顕著に認めなかった(右図)。



以上の結果からNIC刺激下で*in vitro*にて破骨細胞を用いて、インプラントの表面形態の違いによる影響はTRAP染色とSEMの結果からは明らかな違いは得られなかった。またfocal contact構成成分の一部で細胞の遊走と制御に影響するPyk2の遺伝子発現もNIC刺激の有無に関わらず、影響は明らかではなかった。本研究の結果からインプラントの表面形態の違いは破骨細胞の動態および遊走に影響を与えたことが示唆されたが、NIC刺激下では細胞動態に影響を与えるかは不明であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

新井田淳, 安彦善裕, 油井知雄, 廣瀬由紀人, 越智守生

破骨細胞の動態に与える表面性状の影響

日本口腔インプラント学会誌、査読有り 第26巻、第4号、2013、651-659、

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsoi/26/4/26_651/_pdf

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

油井 知雄 (YUI, Tomoo)
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号：80548438

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：