

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870583

研究課題名(和文)陽極酸化チタンを用いた骨芽細胞石灰化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of osteoblastic ossification on anodically oxidized titanium plates

研究代表者

鈴木 大 (Suzuki, Dai)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00585797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞を放電陽極酸化処理したチタン板上で培養すると石灰化が亢進される。陽極酸化チタン板上で培養した骨芽細胞は未処理の研磨チタンに比べ、骨石灰化に重要な非コラーゲン性タンパク質の遺伝子発現が上昇することがわかった。また、両チタン板の周囲で培養された骨芽細胞は、それらの遺伝子発現に差は見られなかった。さらに、一度チタン上で培養した骨芽細胞を剥がし、通常の細胞培養プレートに移して培養した結果、陽極酸化チタンで誘導される各遺伝子発現の上昇はキャンセルされることがわかった。以上の結果は、骨芽細胞が陽極酸化チタンに接着し、そのチタン表面性状に対して反応することで直接石灰化が誘導されることを強く示唆する。

研究成果の概要(英文)：Our previous results showed enhanced ossification of osteoblasts cultured on anodically oxidized titanium (Ao-Ti) plates. In the present study, we found that the mRNA expression of non-collagenous protein-related genes, which are involved in ossification, in osteoblasts cultured on those plates was increased as compared with those on untreated polished titanium plates. On the other hand, when osteoblasts were cultured in the presence of titanium plates without direct contact there was no significant difference regarding mRNA expression of those genes between culture with Ao-Ti plates and those with untreated polished titanium plates. Moreover, the enhanced gene expression seen in osteoblasts cultured on Ao-Ti plates was canceled following their detachment and transfer to normal culture plates. Our results indicate that ossification of osteoblasts is induced following their direct adherence to a surface of Ao-Ti plates and in response to its properties.

研究分野：口腔生化学

キーワード：骨芽細胞 陽極酸化チタン 石灰化 歯科インプラント 再生歯学

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯科インプラント

歯科インプラント治療では、早期の骨結合獲得によりインプラント体を速やかに機能させることが望ましい。また骨との直接結合により咬合力を負担する歯科用チタンインプラントでは、界面新生骨のクオリティが極めて重要と考えられる。インプラント材料として広く用いられるチタンおよびチタン合金は、表面微細構造改善や化学構造修飾による骨結合能の改善が試みられてきた。チタン表面の微小構造や化学特性が接着骨芽細胞の増殖・分化シグナルに影響すると生物学的と考えられている。

(2) 陽極酸化チタンと骨芽細胞の石灰化

二酸化チタン(TiO_2)は、表面に吸着した有害物質やバクテリア、ウイルスなどを、紫外線照射により分解することが可能なことから、光触媒として広く実用されている。そこでインプラントチタンの耐腐食性および抗菌性を向上する目的で、チタン表面に厚い酸化膜(TiO_2)を形成する方法が検討されてきた。その一つとして電解質溶液中でチタンを放電陽極酸化処理する方法が開発された。電気化学的条件(化成電圧、電流密度、電解質組成、pHなど)を選択することにより、酸化膜の組織や結晶構造をはじめとする膜質の制御が可能である。放電陽極酸化の電解質溶液にリン酸二水素ナトリウムを用いることで、チタンは表面に非結晶のアモルファスのアナターゼ型チタン酸化膜(TiO_2)が形成される。このチタン酸化膜内には Ti^{4+} と O^{2-} の正孔電子対が残存しており、大気中の酸素や水分と反応することで、ヒドロキシラジカルと親水基が維持される。このヒドロキシラジカルは表面疎水性炭化水素の吸着を防止することで優れた生体適合性を長期間持続する。

申請者は、リン酸二水素ナトリウム溶液中で放電陽極酸化処理されたチタン板上で培養した骨芽細胞は未処理の研磨チタンに比べ、厚い石灰化組織が形成されることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では陽極酸化チタンの骨芽細胞石灰化誘導モデルを用いることで、骨形成メカニズムを解明するとともに、骨再生の臨床応用に向けた治療基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

リン酸二水素ナトリウム溶液中で放電陽極酸化処理されたチタン板が培養骨芽細胞に対する影響を検討するために、マウス初代骨芽細胞を未処理の表面研磨純チタン板と放電陽極酸化処理したチタン板上で培養し比較を行った。

4. 研究成果

(1) 平成 26 年度

まず初めに、チタン板上で培養後の骨芽細胞から mRNA を採取し DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、陽極酸化チタン板上で培養した骨芽細胞は未処理の研磨チタンに比べ、209 個の遺伝子が上昇し、195 個の遺伝子が低下していることがわかった。また、Gene ontology 解析によりこれらの遺伝子は石灰化や細胞分化に関わる遺伝子群であることが明らかとなった。特に骨石灰化に重要な非コラーゲン性タンパク質である Osteocalcin、Bone sialoprotein、Dentin matrix protein をコードする遺伝子の発現が顕著に上昇することがわかった。

さらに DNA マイクロアレイ解析で変化の見られた遺伝子について、リアルタイム PCR を用いて発現量を比較した結果、DNA マイクロアレイ解析と同様の傾向を示すことが確認された。

そして、DNA マイクロアレイ解析の結果を基に石灰化に関わる各種因子を阻害した実験では、陽極酸化チタンで上昇した非コラーゲン性タンパク質の遺伝子発現が一部抑制されることを明らかにした。

(2) 平成 27 年度

平成 26 年度に行った遺伝子発現解析の結果から見出した陽極酸化チタン板上で培養した骨芽細胞で上昇する遺伝子群を指標として、石灰化亢進の誘因を探った。まず、陽極酸化チタン板と未処理の研磨チタン板の周囲で培養された骨芽細胞(チタン板上に乗っていないが、チタン板を含む同じ培地中で培養された細胞)を比較したところ、各非コラーゲン性タンパク質の遺伝子発現に変化は見られなかったことから、陽極酸化チタン板上で培養した骨芽細胞の石灰化亢進は、その骨芽細胞が分泌する液性因子によるものではない可能性が強く示唆された。

次に、一度チタン上で培養した骨芽細胞を Trypsin-EDTA で剥がし、通常の細胞培養プレートに移して培養した結果、陽極酸化チタンで誘導される各非コラーゲン性タンパク質の遺伝子発現上昇はキャンセルされることがわかった。この結果は、陽極酸化チタンで誘導される石灰化の亢進は骨芽細胞が陽極酸化チタン上に接している必要があること示す。

以上の結果は、骨芽細胞が陽極酸化チタンに接着し、そのチタン表面性状に対して反応することで直接石灰化が誘導されることを示す新たな知見である。

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6件)

Nagahama R, Yamada A, Tanaka J, Aizawa R, Suzuki D, Kassai H, Yamamoto M, Mishima

K, Aiba A, Maki K, Kamijo R. Rho GTPase protein Cdc42 is critical for postnatal cartilage development. *Biochem Biophys Res Commun*, 470: 813-817, 2016. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.111.

Ono M, Suzawa T, Takami M, Yamamoto G, Hosono T, Yamada A, Suzuki D, Yoshimura K, Watahiki J, Hayashi R, Arata S, Mishima K, Nishida K, Osumi N, Maki K, Kamijo R. Localization and osteoblastic differentiation potential of neural crest-derived cells in oral tissues of adult mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 464: 1209-1214, 2015. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.106.

Saito Y, Yamada A, Suzuki D, Tanaka J, Nagahama R, Kurosawa T, Maki K, Mishima K, Shirota T, Kamijo R. Association of aging with gene expression profiling in mouse submandibular glands. *Genomics Data*, 5: 115-119, 2015. 査読有
DOI: 10.1016/j.gdata.2015.05.012.

Wurihan, Yamada A, Suzuki D, Shibata Y, Kamijo R, Miyazaki T. Enhanced in vitro biological activity generated by surface characteristics of anodically oxidized titanium: the contribution of the oxidation effect. *European Cells & Materials*, 29: 290-302, 2015. 査読有
<http://www.ecmjournal.org/journal/paper/s/vol029/vol029a22.php>

Suzuki W, Yamada A, Aizawa R, Suzuki D, Kassai H, Harada T, Nakayama M, Nagahama R, Maki K, Takeda S, Yamamoto M, Aiba A, Baba K, Kamijo R: Cdc42 is critical for cartilage development during endochondral ossification. *Endocrinol*. 156 : 314-322, 2015. 査読有
DOI: 10.1210/en.2014-1032.

Funato S, Matsunaga A, Oh K, Miyamoto Y, Yoshimura K, Tanaka J, Suzuki D, Uyama R, Suzuki H, Mishima K, Nakamura M, Namiki O, Baba K, Inagaki K, Kamijo R: Effects of antibody to receptor activator of nuclear factor κ -B ligand on inflammation and cartilage degradation in collagen antibody-induced arthritis in mice. *J Neg Results Biomed*, 13:18, 2014. 査読有
DOI: 10.1186/s12952-014-0018-0.

〔学会発表〕(計 1 1 件)

Nagahama R, Yamada A, Suzuki D, Maki K, Kamijo R. Cdc42 is critical for cartilage development during endochondral ossification at postnatal stage. 2015 cell

biology ascb annual meeting, San Diego, CA, USA, December 12-16, 2015

Hiranuma K, Yamada A, Suzuki D, Iijima T, Kamijo R. Regulation of nephronectin gene expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. 2015 Cell biology ascb annual meeting, San Diego CA, USA, December 12-16, 2015

長濱諒、山田篤、鈴木大、上條竜太郎、榎宏太郎、Cdc42は生後成長期の軟骨形成に重要である、第52回日本口腔組織培養学会学術大会、徳島、2015年11月21日

平沼克洋、山田篤、鈴木大、飯島毅彦、上條竜太郎、Nephronectinに対する活性型ビタミンD₃の発現制御機構の解析、第52回日本口腔組織培養学会学術大会、徳島、2015年11月21日

Oshima M, Yamada A, Suzuki D, Maki K, Kamijo R. Cdc42 in neural crest derived cells is essential for palatal development. ANZBMS 25th Annual Scientific Meeting, Tasmania, Australia, November 1-4, 2015

大島睦子、山田篤、鈴木大、榎宏太郎、上條竜太郎、神経堤由来細胞に発現するRhoファミリー低分子量Gタンパク質Cdc42は口蓋形成に必須である、第57回歯科基礎医学会学術大会・総会、新潟、2015年9月11-13日

大島睦子、山田篤、鈴木大、榎宏太郎、上條竜太郎、低分子量Gタンパク質Cdc42は口蓋形成において重要な遺伝子である、第33回日本骨代謝学会学術集会、東京、2015年7月23-25日

鈴木大、Jason Bush、上條竜太郎、Frank Beier、軟骨形成における恒常活性型Rac1の機能解析、第1回日本骨免疫学会、沖縄、2015年6月30日-7月2日

山田篤、鈴木大、上條竜太郎、Rhoファミリー低分子量Gタンパク質Rac1およびCdc42の骨・軟骨形成における機能解析、第1回日本骨免疫学会、沖縄、2015年6月30日-7月2日

黒澤珠希、山田篤、高見正道、鈴木大、守村直子、板部洋之、上條竜太郎、Oncostatin Mによるネフロネクチン発現制御機構の解明、日本薬学会第135年会、兵庫、2015年3月27日

Suzuki W, Yamada a, Aizawa R, Suzuki D, Takeda S, Yamamoto M, Baba K, Kamijo R. Cdc42 is essential for cartilage development during endochondral ossification. ANZBMS 24th Annual Scientific Meeting, Queenstown, New

Zealand, September 7-10, 2014

鈴木航、山田篤、相澤怜、鈴木大、竹田秀、山本松男、馬場一美、上條竜太郎、Cdc42 は軟骨分化とそれに続く軟骨内骨化に必須である、第 32 回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2014 年 7 月 24-26 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 大 (SUZUKI, Dai)
昭和大学 歯学部 口腔生化学講座・助教
研究者番号 : 00585797

(2)研究協力者

柴田 陽 (SHIBATA, Yo)
昭和大学 歯学部 歯科保存学講座
歯科理工学部門・講師
研究者番号 : 30327936

山田 篤 (YAMADA, Atsushi)
昭和大学 歯学部 口腔生化学講座・講師
研究者番号 : 50407558

高見 正道 (TAKAMI, Masamichi)
昭和大学 歯学部 歯科薬理学講座・教授
研究者番号 : 80307058