

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	論文提出者 青柳敦士
論文題目 ナノ構造を有する陽極酸化・水熱処理チタン表面上に おける歯髄幹細胞の分化能に関する検討	

I. 緒言

補綴歯科治療は、歯質欠損症例、欠損歯列症例、無歯顎症例、顎顔面欠損症例などの様々な症例に対して適用される。中でも多数歯にわたる欠損歯列部位に対しては、第一に部分床義歯による治療法が挙げられる。特に近年では、部分床義歯による補綴歯科治療においては、口腔インプラント（以下、インプラント）を遊離端欠損部の後方に埋入し、義歯の支持作用として機能させる“インプラント支持による部分床義歯補綴治療”の有用性が報告されている。

義歯の支持としての役割を担うインプラントが長期にわたりその機能を恒常的に維持・安定させるためには、オッセオインテグレーション獲得は重要な因子である。特に、インプラント体－骨界面での骨形成の促進に関する基礎的な研究が進められており、臨床応用されている。顎骨内へ埋入後のインプラント体と、その周囲骨が接する領域の反応は、インプラント治療の予後に影響を与える。インプラント体－骨界面の反応は創傷治癒の中で起こり、骨創面側からの要因として線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージ、未分化間葉系幹細胞の機能や走化性、成長因子、骨質が関与する。これらの反応には、インプラント体表面の表面形状（surface topography）と表面性状（surface physicochemical property）が重要な役割を担っている。インプラント体の表面形状は、細胞の接着、伸展、増殖、分化、表現形質に重要な役割を与えている。さらに、インプラント体の表面性状は、生体反応に重要な材料表面へのタンパク質の吸着や細胞接着に影響を与えている。そして、この現象には、ぬれ性、親水性に関わる表面エネルギーや表面電位などの物理化学的特性が関与している。

一般的な純チタン（commercially pure titanium:c.p.Ti）は、歯科臨床に適用されるインプラント体表面として十分に評価されている。インプラント体の表面処理法は、サンドブラストや酸エッチング、陽極酸化処理、ハイドロキシアパタイト（Hydroxyapatite:HA）コーティングなどが挙げられる。c.p.Tiインプラント体表面構造は、インプラント体と骨の界面での骨形成を促進させるためにナノ構造に改質することが可能である。インプラント体表面のマイクロ構造は骨組織埋入後の初期安定性に重要な役割を果たしており、ナノ構造は細胞接着や細胞分化など表面特有の生物学的反応に影響を与えることが報告されている。

岩手医科大学歯学部において、c.p.Ti表面に陽極酸化・水熱処理（spark-discharged anodic oxidation treatment:SA処理）を施し、ナノ構造を有する陽極酸化被膜上に六方晶系のハイドロキシアパタイトを析出させたSA処理c.p.Tiを開発し、インプラント表面処理法としての有効性を報告している。SA処理c.p.Tiは、c.p.Tiと比較した場合に、良好な骨伝導能であること、初期の骨基質石灰化の促進および細胞接着強度を促進させる表面処理であることが確認されている。さらに、SA処理法により形成されたHA結晶を含む陽極酸化被膜の構造は、微細なナノ構造を形成し、擬似体液および組織学的評価において石灰化物の形成を促進させることが確認されている。これは、SA処理c.p.Ti表面の物理化学的特性が、インプラント体－骨界面の骨創傷治癒過程の初期における細胞外基質の石灰化促進へ関与していることを強く示唆するものである。

脂肪細胞、骨芽細胞、象牙芽細胞などに分化可能な間葉系幹細胞の一種である歯髄幹細胞（dental pulp stem cells:DPSCs）は、第三大臼歯または矯正歯科治療中における便宜抜歯された小臼歯より採取可能であり、長期間凍結保存後も多分化能を維持することが報告されている。さらに、DPSCsは骨髄間葉系幹細胞（bone marrow-derived mesenchymal stem cells:BMSCs）と比較した場合、高い骨分化能を示すことが報告されている。

DPSCsを用いたインプラント体表面上での *in vitro* 研究によると、サンドブラストおよび酸エッチング処理を施してc. p. Ti表面に微細構造を形成させることにより、DPSCsの骨芽細胞への分化誘導に有効であったとの報告がある。また、DPSCsをサンドブラストおよび酸エッチングにより表面処理されたc. p. Tiインプラント体と同時に埋入することで、新生骨の形成が促進されたとの報告がある。これらの報告より、補綴歯科・インプラント治療へDPSCsおよびSA処理c. p. Tiインプラント体を併用することにより、インプラント体表面上に早期の骨形成を促進することが可能となり、新たな治療戦略として期待できると考えられる。即ち、患者からの抜去歯を入手後に、DPSCsの分離・培養を行い、凍結保存をしておき、将来的に患者が歯を欠損した場合を想定して、インプラント治療の計画を立案しておく。そして、インプラント体埋入時期が決まった際には、細胞の解凍・培養を行い、欠損部顎堤へのインプラント体埋入と同時にDPSCsの移植を行うことは有用であると考えられる。

本研究は、SA処理c. p. TiインプラントおよびDPSCsを併用した場合、インプラント埋入後の骨創傷治癒における細胞外基質の石灰化が促進され、それによりSA処理c. p. Ti表面上において骨伝導能が高くなるとの仮説を立て、SA処理c. p. Ti表面上でのDPSCsにおける分化能について *in vitro* 実験モデルにて検討した。

II. 実験材料および方法

1. 試料製作

c. p. TiディスクはJIS規格第2種、直径15 mm、厚さ1.5 mm、チタン含有率>99.8% (タカコー社、愛知) のディスクを使用した。c. p. Tiは、機械研磨 ($Ra; 0.29 \pm 0.01 \mu\text{m}$) を行った。0.15 M酢酸カルシウムおよび0.01M β -グリセロリン酸ナトリウムを含む電解質溶液中にてDC電源 (419A-630、メトロニクス、東京) を用い、 50 mA/cm^2 、350 Vの電流により放電陽極酸化 (anodic oxidation:AO) 処理を施し、AO処理c. p. Ti ($Ra; 0.73 \pm 0.04 \mu\text{m}$) を製作した。さらに、蒸留水を用い洗浄、乾燥後、オートクレーブ (日東光熱株式会社、茨城) にて 300°C で2時間水熱処理を施し、陽極酸化被膜表面にHA結晶の超薄層を有するSA処理c. p. Ti ($Ra; 0.75 \pm 0.03 \mu\text{m}$) を製作した。

AO処理c. p. Tiの表面は、直径1~3 μm の多数の放電痕および凹凸を持つ微細構造を特徴とする陽極酸化被膜で覆われている。また、カルシウムとリン酸を含むHA結晶は、SA処理c. p. Tiの陽極酸化被膜 (anodic titanium oxide film containing calcium and phosphorus:AOFCP) 上に析出している。この結晶は、典型的な六方晶系であり、非常に高い結晶度を特徴としている。SA処理c. p. Ti上においてHA結晶の被覆率は60%以上である。また、厚さ4.5 μm のAOFCP層上に約1 μm のHA層があり、被膜厚さは5.5 μm である。AO処理c. p. TiディスクのAOFCP表面構造の粗さは、 $0.83 \pm 0.03 \text{ nm}$ であり、SA処理c. p. TiのHA結晶と同時に形成されたナノ構造の粗さは $2.75 \pm 0.10 \text{ nm}$ である。X線光電子分光法およびX線回折により、HA結晶のCa/P比は1.48である。

細胞培養の前に、すべてのディスクを 121°C で20分間オートクレーブにて滅菌し、その後、72時間紫外線殺菌を行った。

2. DPSCsの分離および培養

DPSCsは6週齢雄性Sprague-Dawley (SD) ラット (中部科学資材株式会社、愛知) にイソフルラン (ゾエティス・ジャパン、東京) を吸引させ屠殺後、下顎中切歯を抜歯直後に歯髄組織を採取し、0.1% コラゲナーゼおよび0.25% トリプシンを用いて酵素処理を行い抽出した。そして、DPSCsをプラスチックディッシュ上に播種し20% ES細胞用ウシ胎児血清 (GIBCO, Billings, MT) および1% penicillin-streptomycin (GIBCO, Billings, MT) 含有 α -minimum essential medium (α -MEM) (GIBCO, Billings, MT) を用いて分離、培養を行った。3~6 継代のDPSCsを実験に供した。実験方法は、愛知学院大学動物実験規約に従い、愛知学院大学の施設内動物管理使用委員会によって承認 (承認番号AGUD414-3) された。

3. DPSCsの同定

細胞形態の観察を位相差顕微鏡により行った。また、歯髄組織より分離・培養した3 継代目のDPSCsを用いて同定を行った。抗体はFITC共役ハムスター抗ラットCD29モノクローナル抗体、PE共役マウス抗ラットCD34、CD45、CD49dモノクローナル抗体、FITC共役マウス抗ラットCD90モノクローナル抗体 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) を用いた。コントロールとしてFITC共役マウスIgGモノクローナル抗体、FITC共役ハムスターIgMモノクローナル抗体、PE共役マウスIgGモノクローナル抗体 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) を使用した。MACS QUANT Flow Cytometers (MACS Quantify™, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) を用いてflow cytometryを行い、解析ソフトはMACS QUANTソフトウェア (MACS Quantify™, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) を使用した。

次に、DPSCsを4チャンバースライドに 1×10^4 個播種し、脂肪、骨分化誘導を行った。コントロールとして20% ES-FBS含有 α -MEMにて培養を行った。h-insulin、L-glutamine、mesenchymal cell growth supplement (MCGS)、dexamethasone、indomethasone、3-isobutyl-methyl-xanthine (IBMX) を含む脂肪分化誘導メディウム (hMSCs, Differentiation Media BulletKits-Adipogenic, Lonza, Basal, Switzerland) を用いて培養を行った。その後、h-insulin、L-glutamine、MCGSを含むメンテナンスメディウムを用いて培養した。3週間後、4% パラホルムアルデヒドを用いて固定を行い、oil red O染色 (Polysciences, Warrington, PA)、fatty acid-binding protein-4 (FABP-4) 免疫染色 (R&D Systems, Minneapolis, MN) を行った。Dexamethasone、L-glutamine、ascorbate、MCGS、 β -glycerophosphateを含んだ骨分化誘導メディウム (hMSCs Differentiation Media BulletKits-Osteogenic, Lonza, Basal, Switzerland) を用いて培養を行った。3週間後、4% パラホルムアルデヒドを用いて固定を行い、alkaline phosphatase (ALP) 染色 (Millipore, Billerica, MA)、osteocalcin免疫染色 (R&D Systems, Minneapolis, MN) を行った。

4. 細胞形態観察

DPSCsを24 wellプレート内のc. p. Ti、A0処理c. p. Ti、SA処理c. p. Ti上に 1.5×10^4 個播種し3、5、7日間培養を行った。DPSCsは、37°C 5% CO₂中にて、骨分化誘導因子非添加の20% ES-FBS含有 α -MEMを用いて培養した。培養後、すべてのディスクをPBSにて2回洗浄し、付着していない細胞を除去した。その後、細胞を2% グルタルアルデヒドにて室温6時間以上、1% オスミウム酸にて4°C 2時間以上使用し固定した。固定後、エタノール溶液を使用して細胞を脱水し、

t-ブチルにて凍結乾燥を行った。最後に、ディスク表面にカーボン蒸着を行った。すべてのディスク上のDPSCsの接着と形態は走査型電子顕微鏡 (SEM ; XM170007-0007、JEOL、東京) を使用して分析した。

5. 細胞増殖活性試験

DPSCsを24 wellプレート内のc. p. Ti、A0処理c. p. Ti、SA処理c. p. Ti上に 1.5×10^4 個播種し3、5日間培養を行った。プラスチックディッシュ上の培養をコントロールとして使用した。DPSCsは、37°C 5% CO₂中にて骨分化誘導因子非添加の20%ES-FBS含有 α -MEMを用いて培養した。細胞培養後、MTT Assay (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI) を使用し、細胞増殖能を測定した。MTT試薬を各ディスクに加え、プレートを3時間インキュベートした。結晶溶解液を加え、さらに4時間インキュベートした。マイクロプレートリーダー (SPARK 10M、テカンジャパン株式会社、神奈川) を使用して吸光度570 nmにて測定した。

6. 骨形成関連遺伝子発現解析

DPSCsを24 wellプレート内のc. p. Ti、A0処理c. p. Ti、SA処理c. p. Ti上に 1.5×10^5 個播種し培養を行った。プラスチックディッシュ上の培養をコントロールとして使用した。DPSCsは、37°C 5% CO₂中にて骨分化誘導因子非添加の20%ES-FBS含有 α -MEMを用いて培養した。DPSCsを培養3日および5日後に解析を行った。Total RNAの抽出はTRIzol (Invitrogen, San Diego, CA) を用いて行った。RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてRNAの精製を行い、Nano Drop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) より純度と濃度を確認した。逆転写酵素はReverTra Ace (東洋紡、大阪) を用いcDNAを作成した。qRT-PCRは、StepOne™&StepOnePlus™リアルタイムPCRシステム (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を使用し、DPSCsにおけるosteopontin、bone sialoproteinおよびosteocalcinの発現解析を行った。GAPDHを内在性コントロールとし、発現量の計測は $\Delta \Delta C^t$ 法を用いた。

7. 石灰化基質形成能評価

DPSCsを24 wellプレート内のc. p. Ti、A0処理c. p. Ti、SA処理c. p. Ti上に 1.5×10^5 個播種し培養を行った。プラスチックディッシュ上の培養をコントロールとして使用した。DPSCsは、37°C 5% CO₂中にて骨分化誘導因子非添加の20%ES-FBS含有 α -MEMを用いて培養した。DPSCs培養7日および14日後に解析を行った。培養後、プラスチックディッシュ、c. p. Ti、SA処理c. p. Ti上の細胞を10%ホルムアルデヒドにて30分間室温固定し、アリザリンレッドS (岩井化学、東京) を用いて30分間染色した。5%ギ酸 (岩井化学、東京) を各ウェルに加え、プレートを10分間攪拌し色素を溶出した。溶液を96 wellプレートに移し、吸光度405 nmにて測定することで石灰化基質形成能を測定した。石灰化基質形成能を吸光度により計測する際、それぞれ細胞培養を行ったディスクおよび未培養のディスクの差を用いて評価した。また、細胞形態を評価するために培養7日後および14日後におけるc. p. Ti、A0処理c. p. Ti、SA処理c. p. Ti上のDPSCsをSEMを用いて観察を行った。

8. 統計処理

細胞増殖活性試験、骨形成関連遺伝子発現解析、石灰化基質形成能に関するデータに一元配置分散分析を行い、Bonferroni法による多重比較検定を行った。有意水準は5%とした。統計分析は、Windows用のSPSSソフトウェア、バージョン15.0 (SPSS Japan、東京) を使用した。

III. 結果

1. DPSCsの同定

位相差顕微鏡を用いた観察により紡錘形の形態の細胞が確認された。続いて、DPSCsを培養後、表面抗原を解析した結果、幹細胞マーカーであるCD29、CD49dおよびCD90は陽性であった。一方、造血幹細胞マーカーであるCD34およびCD45では陰性であった。

2. 多分化能評価

脂肪分化および骨分化誘導用培地にて培養を行った結果、oil red O染色およびFABP-4免疫染色陽性よりDPSCsの脂肪分化が認められた。また、ALPおよびosteocalcin免疫染色陽性よりDPSCsの骨分化が認められた。

3. 細胞形態観察

SEMによる形態学的評価は、培養3日目においてDPSCsはc. p. Ti表面に接着し、細胞突起の伸展および扁平な形態が観察された。高倍率においてもc. p. Ti表面への細胞の接着が確認された。A0処理c. p. Ti上のDPSCsは、細胞が薄く広がり、ディスク表面に接着し、高倍率においても接着が確認された。SA処理c. p. Ti上のDPSCsは、扁平な形態を示し細胞突起の伸展が認められた。細胞突起は陽極酸化被膜上のHA結晶に接着を示した。細胞突起とSA処理c. p. Ti表面間の密接な状態は、高倍率においても確認され、陽極酸化被膜のナノ構造も観察された。

培養5日後においてDPSCsはc. p. Ti表面に接着し、伸展し細長い形態を示した。高倍率においてもc. p. Ti表面のDPSCsはディスク表面に接着していることが確認された。DPSCsは、A0処理c. p. Tiディスクに接着し、細胞突起の伸展が認められた。高倍率においても細胞突起の伸展が確認され、陽極酸化被膜の表面に接着していた。DPSCsは、SA処理c. p. Ti表面に接着し細胞突起の伸展も認められた。細胞はHA結晶と陽極酸化被膜に密着し、被覆していた。高倍率においても、細胞突起が陽極酸化被膜上のナノ構造に密着していることが確認された。

培養7日後においてすべてのディスク表面上にDPSCsの伸展が認められた。c. p. Tiディスク上のDPSCsは、伸展した細胞突起を有する形態を示した。高倍率において、ディスク表面への細胞の接着が確認された。A0処理c. p. Tiディスク上のDPSCsも伸展した細胞突起を有する扁平な形態を示した。高倍率において、DPSCsはディスク表面の陽極酸化被膜に接着する細胞突起が確認された。SA処理c. p. Tiディスク上のDPSCsは、ディスク表面に扁平な形態を示し広範囲に伸展が確認された。細胞突起は陽極酸化被膜上のHA結晶と密接な接着を認めた。高倍率において、A0処理c. p. Tiディスク上の細胞と比較し、細胞突起およびSA処理c. p. Tiディスク表面間の密接な接着が確認された。さらに、細胞突起の先端部分はナノ構造全体に広がり、SA処理c. p. Tiディスクの放電痕内部まで伸展が確認された。

4. 細胞増殖活性試験

DPSCsの増殖活性は、MTT Assayを用いて評価を行った。培養3日後において、c.p. Ti、A0処理c.p. Ti、SA処理c.p. Tiおよびコントロール間に有意差は認められなかった。培養5日後において、A0処理c.p. TiおよびSA処理c.p. Tiは、c.p. Tiと比較してDPSCsの有意な差が認められた。ただし、A0処理c.p. TiディスクおよびSA処理c.p. Ti間において差は認められなかった。

5. 骨形成関連遺伝子発現解析

DPSCsのosteopontin、bone sialoproteinおよびosteocalcinのmRNA発現量を培養3日および5日後に分析をした。

1) Osteopontin

培養3日および5日後、SA処理c.p. Tiは、c.p. Ti、A0処理c.p. Tiおよびコントロールと比較し、osteopontinのmRNA発現量が有意に増加した。c.p. Ti、A0処理c.p. Ti、コントロールの間に有意差は認められなかった。

2) Bone sialoprotein

培養3日および5日後、SA処理c.p. Tiは、c.p. Ti、A0処理c.p. Tiおよびコントロールと比較し、bone sialoproteinのmRNA発現量が有意に増加した。c.p. Ti、A0処理c.p. Ti、コントロール間に有意差は認められなかった。

3) Osteocalcin

培養3日後、osteocalcinのmRNA発現量は、c.p. Tiとコントロールと比較しSA処理c.p. Tiにおいて有意に増加したが、A0処理c.p. Tiと比較した場合、有意な増加は認められなかった。c.p. Ti、A0処理c.p. Ti、コントロール間に有意差は認められなかった。

培養5日後、c.p. Ti、A0処理c.p. Tiおよびコントロールと比較してSA処理c.p. Tiは、osteocalcinのmRNA発現量が有意に増加した。c.p. Ti、A0処理c.p. Ti、コントロール間に有意差は認められなかった。

6. 石灰化基質形成能評価

石灰化基質のカルシウム沈着を評価するために、アリザリンレッドS染色を培養7日および14日後に行った。培養7日および14日後に、DPSCsはc.p. Tiおよびコントロールと比較し、SA処理c.p. Tiにおいて顕著な石灰化を示した。SA処理c.p. Tiディスクは、培養7日および14日後にc.p. Tiおよびコントロールと比較し、石灰化基質形成能の有意な増加を示した。

また、SEMによる形態観察ではc.p. Tiは、培養7、14日後は細胞突起の伸展が認められた。A0処理c.p. Tiも培養7日および14日後において細胞突起の伸展が認められた。SA処理c.p. Tiは、培養7日後では多数の石灰化様小球が確認された。培養14日後においては、石灰化様小球に加え、細胞同士が近接し癒合するような状態が確認され、細胞は板状の形態を示した。

IV. 考察

1. 本研究の意義

顎骨内に埋入後のインプラント体が恒常的に維持されその機能を保つためには、初期安定性および二次安定性の獲得が重要な因子としてあげられる。岩手医科大学歯学部では、二次安定性の早期獲得による治癒期間の短縮や骨質・骨量が劣る部位への適応範囲拡大を目的として、c. p. Ti表面に陽極酸化・水熱処理を行い、ナノ構造を有する陽極酸化被膜上にHA結晶を析出させたSA処理c. p. Tiについて報告している。Bioinertとbioactiveの両方の長所を兼ね備えたこの材料は、インプラント支持による部分床義歯補綴治療への適用において有効性の高いインプラント体表面構造として期待できるものと考えられる。

骨-インプラント界面部における早期のオッセオインテグレーション獲得に向けた治療戦略として、多分化能を有し採取時の侵襲が少なく、抽出が容易なDPSCsをSA処理c. p. Tiと併用する方法が有効であると思われる。これまでに、成人の腸骨稜から採取したヒトBMMSCを適用した手法は、細胞を採取する際に患者への侵襲性が高く、疼痛を伴うものであった。一方、抜去歯よりDPSCsを分離・培養する方法は、侵襲性が低く、抽出した細胞は長期間の凍結保存後も多分化能を維持する。さらに、DPSCsは、若年時に採取し凍結保存可能なため、高血圧、糖尿病、動脈硬化などの細胞機能障害を引き起こす可能性のある全身疾患の影響を受けないと考えられる。また、DPSCsは、移植部位での血管新生を促進させる血管新生因子や抗炎症因子など、さまざまな因子を分泌している。骨形成分化マーカーの発現を比較検討した研究では、DPSCsはBMMSCよりも石灰化を促進することが報告されている。そのため、DPSCsは、歯の欠損部位へのインプラント治療の成功率を上げる効果的な細胞源であると考えられている。

オッセオインテグレーションは、骨誘導、骨伝導、骨形成プロセスを表す。インプラント体表面にて間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させることは、オッセオインテグレーションを獲得する重要なステップである。そして、インプラント体の表面形状および表面性状は、骨創傷治癒の初期過程におけるインプラント体表面での接触骨形成 (contact osteogenesis) に影響を与える重要な因子である。また、インプラントの長期的な安定性と保持力は顎骨のリモデリングに依存しており、インプラント体埋入時の初期安定性は、インプラント体の形状、直径、長さの影響を受けるとされている。さらに、二次安定性は、マイクロまたはナノレベルのインプラント体表面構造の物理化学的特性に影響を受けるとされている。

Manganoらは、酸エッチングまたはレーザー焼結を施したc. p. Ti表面上にてDPSCsを培養し、骨芽細胞への分化誘導に有効であったと報告している。さらに、Iaculliらは、サンドブラストおよび酸エッチングを施したc. p. Ti表面上にてDPSCsを培養し、骨芽細胞への分化誘導に有効でありオッセオインテグレーションの早期獲得の可能性があると報告している。

これらの報告より、DPSCsおよびSA処理c. p. Tiインプラントを併用することにより、インプラント体表面に早期の骨形成を促進することが可能となり、新たな治療戦略として期待できる。したがって、本研究の仮説は、SA処理c. p. TiインプラントおよびDPSCsを併用した場合、インプラント埋入後の骨創傷治癒における細胞外基質の石灰化が促進され、骨伝導能が高くなることで早期のオッセオインテグレーション獲得に繋がり、補綴歯科・インプラント治療として有効になるというものである。

SA処理c. p. Tiの表面形状および表面性状は、ナノ構造を有する陽極酸化被膜上にHA結晶が析出しており、CaイオンおよびPイオンの吸着促進化、陽極酸化被膜のぬれ性の向上、表面自由エネルギーが高値を示すことにより早期の骨伝導能を促進する特徴を有する。本研究では、*in vitro* 実験モデルを構築し、SA処理表面上にてDPSCsの細胞分化、細胞外基質の石灰化形成が早い段階から認められた。このことから、SA処理c. p. Tiを補綴歯科・インプラント治療へ応用するにあたり、インプラント体埋入時にDPSCsを併用した新しい治療戦略構築への一助となる基礎的データをj得ることができた。以上のことより、本研究手法および研究結果は、今後の部分床義歯補綴治療へのインプラント治療応用にあたり、有用で意義深いものである。

2. 本研究の結果

1) DPSCsおよびSA処理c. p. Tiの有効性

本研究では、SA処理c. p. Tiに接着したDPSCsの骨芽細胞分化に対する効果が明らかとなった。新たな知見として、骨分化誘導因子非添加培地においてSA処理c. p. Ti上のDPSCsの骨分化が促進されたことである。この現象は、非コラーゲン性骨基質タンパク質であるosteopontin、bone sialoproteinおよびosteocalcinのmRNA発現量の増加と関連していた。さらに、培養7日および14日後において、SA処理c. p. Ti上のDPSCsの石灰化基質が有意に増加した。これらの結果は、DPSCsの初期細胞応答が、HA結晶を含むナノ構造を有するSA処理c. p. Ti表面上の表面自由エネルギー、水酸基、親水性などの物理化学的性質の影響を受けることにより、細胞外基質の石灰化が促進されたと考えられる。したがって、本研究結果は、SA処理c. p. Tiを用いた“インプラント支持による部分床義歯補綴治療”において、DPSCsを併用することにより石灰化基質形成が促進され、早期のオッセオインテグレーション獲得するために有効な方法であることを示唆したものである。

2) SA処理c. p. Ti表面上のDPSCsの骨分化促進メカニズム

SA処理c. p. Ti表面上でのDPSCsに与える因子は、SA処理c. p. Tiの表面形状および表面性状が関与している。本研究の結果より、培養3日および5日後におけるSA処理c. p. Ti上のDPSCsの細胞挙動は、表面のナノ構造およびHA結晶に接着した細胞突起の伸展に関連していることが明らかとなった。さらに、非コラーゲン性骨基質タンパク質であるosteopontin、bone sialoproteinおよびosteocalcinのmRNA発現量は、培養3日および5日後におけるc. p. TiおよびA0処理c. p. Tiと比較し、SA処理c. p. Tiが有意に増加していた。培養3日後では、細胞外基質形成の過程に分泌されるbone sialoproteinおよびosteopontinのmRNA発現量が増加した。培養5日後は、細胞外基質が石灰化形成へと促進される過程に分泌されるosteocalcinのmRNA発現量が増加した。さらに、骨分化誘導因子非添加培地におけるDPSCsの培養7日および14日後の石灰化基質形成能をアリザリンレッドS染色を用いて解析した結果、培養7日および14日後にSA処理c. p. Ti表面上でのDPSCsの石灰化基質形成が有意に増加することが明らかとなった。

SA処理c. p. Tiの表面形状および表面性状が細胞骨格アクチンフィラメントと接着斑キナーゼ(FAK:focal adhesion kinase)に影響することが報告されている。本研究の結果より、osteopontinおよびbone sialoproteinのmRNA発現量の増加については、DPSCsがSA処理c. p. Ti表面上に接着することにより、HA結晶を含むナノ構造を有する陽極酸化被膜が、細胞のインテグリ

ンを介した細胞内シグナル伝達経路に作用することにより細胞の分化調節機構を活性化させ、その結果、DPSCsの細胞外基質の石灰化は促進されたと推察している。

さらに、SA処理c. p. Ti表面上でのDPSCsの分化については、A0処理c. p. Tiの水熱処理後、HA結晶の形成と同時に陽極酸化被膜表面にナノ構造が形成されることにより、水酸基が増加することでぬれ性が大きくなり、親水性が向上したことから表面自由エネルギーが大きくなったこと、そして、これらの表面形状、表面性状によりCaイオンおよびPイオンの吸着が促進されやすくなったことで骨基質石灰化が促進されたものと考えられる。A0処理c. p. Ti表面の陽極酸化被膜にはCaイオンおよびPイオンが含まれており、水熱処理後に陽極酸化被膜から六方晶系の針状結晶である結晶性の高いHA結晶として析出する。陽極酸化被膜表面のナノ構造は、陽極酸化被膜中からのCaイオンおよびPイオンがHA結晶として析出する際の同時期に形成されたものである。近年では、CaイオンおよびPイオンは細胞接着タンパク質を吸着することが報告されている。Caoらは、CaイオンとPイオンがヒトDPSCsの骨形成分化に影響すると報告しており、Stovallらは、アデノシン三リン酸（ATP）は、PLC-IP3経路を介したCaイオン依存性メカニズムを含むラットDPSCsの骨形成分化を増強すると報告している。これらの報告は、SA処理c. p. Ti表面上でのDPSCsの石灰化基質形成メカニズムの一端を示唆するものである。

SA処理c. p. Ti表面上での血清アルブミンとHank's平衡塩溶液（Hanks' Balanced Salt solution: HBSS）の接触角測定分析により、SA処理c. p. Tiが水酸基を含んだ超親水性になり、c. p. TiおよびA0処理c. p. Ti表面と比較してぬれ性が著しく向上することが報告されている。また、表面自由エネルギーは、SA処理c. p. Tiはc. p. TiおよびA0処理c. p. Ti表面と比較して著しく改善されることもわかっている。Kilpadiら、Hennessyらは、血清タンパク質および表面自由エネルギーは、インプラント体表面への初期の細胞接触および細胞接着に重要な役割を果たすことを報告している。SA処理c. p. Ti上のHA結晶と同時に形成された陽極酸化被膜のナノ構造は、HBSSに浸漬後、リン酸カルシウムの沈着物によって被覆されていることが報告されている。この現象は、既述のように、SA処理c. p. Ti上のHA結晶を含む陽極酸化被膜表面上に形成されたリン酸カルシウムにより構成されているナノ構造の水酸基、ぬれ性の向上による表面自由エネルギーが大きくなったことによるものであると推察される。したがって、c. p. TiおよびA0処理c. p. Ti表面と比較して、SA処理c. p. Ti表面のHA結晶を含むナノ構造を有する陽極酸化被膜は、超親水性表面となっており、これらは細胞応答、特に未分化間葉系幹細胞からの骨芽細胞系への分化誘導に関わる重要な因子であることが理解できる。

今後は、SA処理c. p. Ti表面とDPSCs界面（インターフェイス）におけるシグナル伝達経路のメカニズムを解明するためにさらなる研究が必要であり、実施していくことを計画している。

3) DPSCsおよびSA処理c. p. Tiの臨床応用

SA処理c. p. Tiに関する研究では、SA処理c. p. Tiインプラントの表面エネルギーが、細胞-インプラント体表面の界面における細胞の初期接着および分化に影響を与えることにより、骨形成および石灰化基質形成能に影響を与えることが報告されている。本研究より、SA処理c. p. Ti表面上においては、骨分化誘導因子非添加培地においてDPSCsの細胞分化が誘導され、骨芽細胞分化マーカー発現の上昇および石灰化基質形成が促進される特徴を有することが明らかとなった。これらの結果は、骨伝導能を有するSA処理c. p. Tiを用いた“インプラント支持による部分床義歯補綴

治療”において、DPSCsを併用する方法により、石灰化基質形成が促進されて早期のオッセオインテグレーション獲得の可能性を示唆するものである。また、重度の骨吸収を生じた顎骨の再生、頭蓋冠形成術、腰椎破裂骨折の再建の際に適用されるチタンメッシュに関する報告がある。このチタンメッシュ表面に対しては、SA処理を施すことで骨再生への治療効果が高まることが期待されることから、今後の研究課題の1つとして考えている。

今後の研究では、実験動物を用いて骨とインプラント体の界面の観察、およびSA処理c. p. Ti表面上でのDPSCsの生体内における動態を評価し、骨組織形成の有効性を検証する予定である。

V. まとめ

本研究の結果より、SA処理c. p. Ti表面上のDPSCsはc. p. TiおよびAO処理c. p. Tiと比較して細胞突起の伸展や接着が認められ、骨分化誘導因子非添加培地においてもDPSCsの骨分化促進が示された。SA処理c. p. Ti表面のHA結晶を含む陽極酸化被膜上のナノ構造は、DPSCsの接着、非コラーゲン性骨基質タンパク質であるosteopontin、bone sialoproteinおよびosteocalcinの各骨形成関連遺伝子発現量および石灰化基質形成を促進することが明らかとなった。したがって、今回のSA処理c. p. Ti表面上でのDPSCsを用いた分化能に関する*in vitro*実験モデルの結果から、SA処理c. p. Tiを用いた“インプラント支持による部分床義歯補綴治療”への新たな治療戦略として考えた場合には、DPSCsの併用は骨創傷治癒の初期過程においてインプラント埋入部位の石灰化基質形成を促進させ、早期のオッセオインテグレーションを獲得するための有効な方法であることが示唆された。今後、SA処理c. p. Tiインプラントのさらなる生物学的効果を検証するためには、*in vivo* 実験系によるさらなる組織学的分析が必要である。