

Title	(2)コア研究部門概要
Journal	歯科学報, 112(6): 697-701
URL	http://hdl.handle.net/10130/2975
Right	

(2)コア研究部門概要

1. 分子再生コア研究部門

東 俊文

幹細胞は、その増殖力と分化能を利用することにより組織を再生する源になると考えられており、その能力を人工的に応用することにより医療への応用が実現されつつある。究極の幹細胞は胎児から得られる万能細胞で、一個の幹細胞からすべての組織へ分化しうることが確認されている。これを Embryonic stem cell (ES) 細胞と呼ぶ。さらに近年ではいわゆる induced pluripotent stem cell (iPS) 細胞という万能細胞を人工的に作成する技術が確立されます。再生医療に対する期待が高まりつつある。

一方、iPS 細胞の開発の少し前になるが、この幹細胞が癌の発生源であるという様々な証拠が見つかり、癌幹細胞という概念が定着した。幹細胞は増殖力を備えているが、そこに遺伝子の傷が生じ無軌道な増殖力を得ると癌となる。したがって幹細胞の存在は組織再生修復という生命維持のための重要なバクアップ細胞であると同時に癌の発生源という生命体の破綻の原因となる危険な細胞でもある。

癌の治療法の開発は常に医学における最も重要な課題であり続け、現在もなおその地位は揺らいでいない。幹細胞の研究が多く注目を集めると必然的に、幹細胞の性質と癌の関係を解明しようとする研究もすぐに始められ、現在大きな成果が得られつつある。

前述した ES 細胞の培養液を癌細胞に作用させると癌を抑える作用を発揮する。すなわち正常な幹細胞は増殖を自ら制御するフィードバック機能を備え発揮している。この装置の一つは Lefty といわれる分子である。“Lefty”(左利き)という名前は左側の組織を作るのに重要な分子として発見されたからこのような名前を付けられたのだが、実際は ES 細胞の無軌道な増殖を調整する重要な分子であることがわかってきた¹⁻³⁾。

私たちの研究室では特に骨組織再生を医療として応用することを目指す中で様々な増殖因子を利用している。TGF- β 、IGF-1 は私たちが特に注目してい

る増殖因子である。再生組織を形成するうえではこれらの増殖因子が非常に重要な役割を持つことがわかり、これを臨床に用いるための検討を進めている。しかしこれら増殖因子は癌にとっても増殖因子であり、癌を進行させる能力がある。再生医療と癌を同時に検討しより安全な再生組織を作成するか？これが現在私たちの研究の大きなテーマの一つとなっている。

特に骨組織の再生過程では間葉系幹細胞がその出発点になっていると考えられている。口腔内の顎骨再生では歯根膜細胞が骨組織再生出発点の役割を担っている可能性が注目されており、その分化過程の詳細な検討が進められている。我々はヒト間葉系幹細胞を用いた検討から、PI3 キナーゼが骨組織分化誘導に特に重要である可能性を指摘し⁴⁾、炎症において重要なサイトカインの TGF- β が骨組織の分化誘導を阻害し骨再生の障害になっている可能性を報告した。さらに詳細な検討から TGF- β が IGF-1 の発現を抑制することで骨分化を抑制するメカニズムを解明し報告した⁵⁾。この成果により、歯周炎症に基づく骨破壊と再生不良には TGF- β を抑制し IGF-1 を作用させることにより改善される可能性が示唆されるので、現在臨床応用の可能性を検討中である。

また、骨組織分化誘導において重要であるにも関わらずあまりメカニズムが解明されていない wnt- β catenin の関与において wnt 発現を誘導する分子を特定しこの分子により骨再生が促進されることを証明しつつある。すでに発現系を開発し、in-vivo での有効性についての検討を行っており、有効性が実証されれば臨床応用可能な新たな薬剤開発に結び付ける予定である。

さらに今後の可能性の大きい iPS 細胞を出発点として骨組織再生の応用を探る研究をスタートしている。iPS 細胞はその母細胞となった組織への分化誘導が良いことが知られており、歯根膜細胞を出発点として iPS 細胞を作成し、効率よく骨芽細胞へ分化誘導し、未熟な細胞(iPS 細胞の特性を有する細胞)をできる限り排除する手段を用いてより純粋な骨芽細胞集団を作成し、これに軟骨芽細胞、血管内皮細

胞を組み合わせるにより骨組織を再生することを目指している。

文 献

- 1) Yajima T, Ochiai H, Uchiyama T, Takano N, Shibahara T, Azuma T. Resistance to cytotoxic chemotherapy-induced apoptosis in side population cells of human oral squamous cell carcinoma cell line Ho-1-N-1. *Int J Oncol.* 2009 Aug ; 35(2) : 273~80.
- 2) Fujishiro Y, Tonogi M, Ochiai H, Matsuzaka K, Yamane GY, Azuma T. The receptor tyrosine kinase inhibitor vandetanib activates Akt and increases side population in a salivary gland tumor cell line (A253). *Int J Oncol.* 2012 Jul ; 41(1) : 362~8. 2012.
- 3) Miyata N, Azuma T, Hozawa S, Higuchi H, Yokoyama A Ba, Kabashima A Ms, Igarashi T Ms, Saeki K, Hibi T. Transforming Growth Factor β and Ras/MEK/ERK Signaling Regulate the Expression Level of a Novel Tumor Suppressor Lefty. *Pancreas.* 2012 Jul ; 41(5) : 745~752. PubMed PMID : 22441145.
- 4) Ochiai H, Okada S, Saito A, Hoshi K, Yamashita H, Takato T, Azuma T. Inhibition of IGF-1 expression by prolonged TGF- β 1 administration suppresses osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2012 May 9.[Epub ahead of print] PubMed PMID : 22573330.
- 5) Ochiai H, Yamamoto Y, Yokoyama A, Yamashita H, Matsuzaka K, Abe S, Azuma T. Dual nature of TGF- β 1 in Osteoblastic Differentiation of Human Periodontal Ligament Cells. *J. Hard Tissue Biol.* 2010. 187~194.
- 6) Kabashima A, Higuchi H, Takaishi H, Matsuzaki Y, Suzuki S, Izumiya M, Iizuka H, Sakai G, Hozawa S, Azuma T, Hibi T. Side population of pancreatic cancer cells predominates in TGF-beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and invasion. *Int J Cancer.* 2009 Jun 15 ; 124(12) : 2771~9.
- 7) Nishimura T, Azuma T, Yokoyama A, Ochiai H, Saito H, Hibi T. New mechanism of transforming growth factor-beta signaling in hepatoma: Dramatic up-regulation of tumor initiating cells and epidermal growth factor receptor expression. *Hepatol Res.* 2009 May ; 39(5) : 501~9.

2. 口腔インプラント学研究部門

吉成正雄

1. 顎骨の生体アパタイト結晶配向性と力学的特性評価¹⁻³⁾

顎骨の力学的特性はインプラント治療の正否を決める重要な因子である。顎骨の力学的特性は、骨密度(BMD)のみではなく、生体アパタイト(BAp)結晶配向性に大きく依存することが報告されているが、顎骨のBAp結晶配向性と力学的特性の具体的な関係に言及した研究は少なく、ましてやヒト顎骨

を使用した研究は皆無である。そこで、ヒト下顎骨のBMD値とBAp結晶配向性の関係を調査するとともに、動物を使用した片咀嚼モデル、およびインプラント埋入モデルにおいてBAp結晶配向性と力学的特性の関係を調査することを目的とした。これらが明らかになれば、骨生検手法による骨質診断、骨増生法のガイドライン策定へ寄与するだけでなく、メカニカルストレスのメカニズムの解明に繋がる可能性を有している。ヒト下顎骨(有歯顎)における皮質骨および海綿骨のBMD値とBAp結晶配向性の計測により、歯槽部と下顎底部ではBMD値に差がないがBAp結晶配向性に大きな違いがあり、下顎底部では近遠心的に配向しているのに対し、歯槽部では歯の植立方向に強い配向性が認められることが明らかとなった。また、顎骨のBAp結晶配向性と弾性係数などの力学的性質は相関性があることが立証された。これは、ヒト下顎骨が、咬合圧に応答する歯槽部と長管骨構造を有する下顎底部といった有歯顎に特徴的な二重構造を反映している結果と考えられ、咬合圧が顎骨の力学的特性に影響していることを示唆した。また、実験的片咀嚼による咬合力の除去が下顎骨構造に及ぼす影響を調査した結果、咬合力の除去により歯槽部のBAp配向性が変化することが明らかとなり、メカニカルストレスに伴う骨強度評価におけるBAp配向性測定的重要性が示唆された。

2. 顎骨再生

1) 三次元培養⁴⁾

広範囲の顎骨欠損を修復して母床骨を改善し、インプラント治療の適用範囲を広げる試みが続けられている。ラジアルフロー型バイオリアクター(RF-B)は、比較的均一な培養環境を保つことが可能であることから、RFBにより三次元的に構築した培養組織を用いたTissue Engineering法が注目を集めている。本研究はRFBを用いたヒト骨髄間葉系幹細胞(hMSC)の三次元培養について検討した。結果、RFBによる灌流培養を行った場合、スキャフォールド外部から内部に至るまで、hMSCの増殖が観察された。一方灌流させずに培養した場合は、スキャフォールドの外周部にhMSCの存在が確認できたものの、内部ではほとんどhMSCを観察できなかった。それに対応してDNA抽出による細胞数の

評価においても灌流培養では細胞の増殖が確認できたが、静置培養での細胞数は播種時と同程度かやや減少していた。細胞表面マーカーの発現は、培養前、灌流培養後、静置培養後で違いがなく形質の変化はなかった。また、灌流培養後 hMSC は骨分化能を有していた。以上の結果から、RFB を用いた灌流培養はスキャフォールド全体に均等に培地が供給され、細胞増殖が進行すると考えられた。生体内に移植するためには三次元的にある程度の大きさと細胞密度が必要であると思われるため、RBM を用いた hMSC の培養は *in vivo* での組織構築に有用であると示唆された。

2) スタチン系薬剤の応用^{5,6)}

高脂血症治療薬スタチンは、骨芽細胞への分化決定シグナルである BMP-2 の生合成を促進すること、また、血管内皮増殖因子(VEGF)の遺伝子発現を著明に促進させることが報告されている。これにより、様々な問題点を有する生理活性タンパク質の直接利用の弊害を回避でき、スタチンは骨増生に有効な薬剤として期待が集まっている。現在、口腔インプラントを高齢・骨粗鬆症患者へ適用するために、インプラント周囲母床骨を改善する治療法が求められている。その中で、骨形成能を有するとされるスタチンの臨床応用が期待されているが、スタチンの種類は数多くあり、それらの至適濃度、局所投与方法、徐放性制御技術が定まっていない。また、増生された骨がインプラント埋入に必要な骨質(強度)を有しているかについての検討も行われておらず、本剤の有効性を確認するまでには至っていない。本研究は、高齢・骨粗鬆症患者のインプラント母床骨の改善に有効なスタチンの全身投与方法、徐放システム(DDS)を見出すことを目的とした。その結果、シンバスタチンの全身投与、フルバスタチンの局所投与の何れでも骨増生効果が得られることが明らかとなった。

3) 低出力超音波パルス(LIPUS)の応用

LIPUS は骨折の治療促進に有効であることが知られており、インプラントの骨結合促進や高代謝回転型骨粗鬆症モデルラットにおける骨欠損の治療を促進することが報告されている。しかし、加齢に伴う機能低下による低代謝回転型骨粗鬆症に対する LIPUS の効果は報告されていない。そこで本研究

では、低代謝回転型骨粗鬆症モデルマウス SAMP6 を用いて、LIPUS 照射が低代謝回転型骨粗鬆症の骨欠損部治療過程に及ぼす影響を、実験動物用 3D マイクロ X 線 CT を使用した同一個体における放射線学的変化、ならびに組織形態学的に検討した。その結果、SAMP6 における骨欠損の治療遅延に対して、LIPUS 照射は正常な骨膜由来の細胞の分化を促進することで、低下した骨髄側からの骨形成を補い、治療を促進する可能性が示唆された。

3. 表面化学修飾法による表面改質⁷⁻¹¹⁾

現在、チタンやジルコニアの生体活性やオッセオインテグレーションを向上させる様々な表面改質法(低温プラズマ処理、UV 処理、過酸化水素処理など)が試みられているが、それらの効果については未だコンセンサスを得ていない。インプラント表面の官能基は、表面の親水性・疎水性、表面荷電状態に影響を及ぼし、細胞の初期接着およびその後の細胞動態に重要な役割を果たす。本研究は、表面化学修飾法がチタンおよびジルコニア表面のぬれ性(接触角)ならびに表面荷電状態に及ぼす影響、さらには各種タンパク質の吸着傾向との関係を調査することにより、インプラントが生体に埋入されてからの創傷治療の過程を経て Osseointegration を達成するまでのメカニズムを解明することを目的とした。さらには、有効な組織親和性を付与する化学修飾法を検索することを目的とした。

4. ジルコニアの応用

ジルコニア(正方晶ジルコニア多結晶体, TZP)は強度、審美性、生体適合性に優れることから、可撤性義歯のみならず、インプラントアバットメントやインプラントボディへ応用すべく研究が進められている。しかし、セラミックスであるが故に長期臨床応用に耐えうるか、インプラントが接する全ての組織と親和性があるのか、については明らかになっていない。本研究は、ジルコニアの口腔環境における疲労特性を評価するとともに、骨組織接触部位のみではなく、軟組織接触部位、および口腔内露出部位に適合した表面改質法を開発することより、長期使用に耐える「生体多機能化ジルコニアインプラント」を開発することを目的とした。

1) 疲労特性、摩耗特性、陶材積層の影響¹²⁻¹⁵⁾

TZP をインプラントボディに応用するためには

表面を粗造化する必要がある、また生体環境下で長時間機能することが求められる。しかし、表面を粗造化したTZPの湿潤下における疲労特性を検討した報告は見あたらない。表面を粗造化したTZPの疲労特性を2軸曲げ試験法、および臨床環境を模倣したISO14801準拠法により臨床的な疲労特性を評価した。その結果、熱間等方圧加圧(HIP)処理を施したY-TZP、およびCe-TZP/Al₂O₃ナノ複合体は、臨床応用に耐える疲労強度を有していることが明らかとなった。

TZPは白色不透明であるため、審美性が要求される部位へ応用する場合、半透明性を有する前装材を積層する必要がある。TZPの表面処理(表面粗さ)、熱処理、およびライナー陶材の使用の有無がTZPに対する前装陶材の結合強さに及ぼす影響を調査した結果、何れの条件においても結合強さに差がなく、TZP表面近傍に前装陶材が一層付着していることが確認された。以上より、前装陶材の結合強さを向上させるためには、前装陶材とTZPの間に強度の大きな中間層を介在させる必要性が示唆された。現在は、前装材を積層しない半透明性を有するTZPの応用を検討している。さらには、CAD/CAMを用い作製されたカスタムメイドアバットメントのマイクロギャップと、アバットメントの材料の厚みが破壊荷重に及ぼす影響についても検討を加えている。

2) 生体多機能化¹⁶⁻²⁰⁾

TZPをインプラント材へ応用するための研究は、骨組織接触部位に対しての表面粗造化処理法に集中し、軟組織接触部位や口腔内露出部位にまで言及した研究は皆無である。本研究では、歯周病関連細菌の付着・増殖特性、上皮細胞の接着特性、骨芽細胞の接着・増殖・分化特性をチタン(Ti)と比較しながら検討すると同時に、有効な表面改質法を開発して「生体多機能化ジルコニアインプラント」を創製することを目的とした。

歯周病関連細菌の付着・増殖特性に関して、TZPはTiと同様な歯周病原菌の初期付着と増殖傾向を示し、本材料の使用にあたってはTiと同様に感染に対する対策が必要であること、また表面改質による細菌付着を抑制する必要性が示唆された。

上皮細胞の初期接着特性に関しては、TZPはTi

と同等もしくは劣っているため、細胞接着性を高める細胞接着性分子の固定化や表面の物理化学的性状の改質が必要であると考えられた。細胞接着性分子については、ジルコニア表面に指向性をもつ人工ペプチド(ペプチド・アプタマー)の創製を行った。

骨芽細胞様細胞の初期接着、細胞形態、増殖、分化に及ぼす表面形状の影響について、ブラスト処理とエッチング処理を併用することにより、表面にマイクロ構造とナノ構造を付与することが可能となり、初期接着、増殖、分化を促進することが明らかとなった。表面性状(物理化学的性質の)に関しては、低温プラズマやUV処理などの親水化処理を施すことにより、骨芽細胞様細胞の初期接着の向上が認められた。また、表面形状を調製後直ちに水中に保存することで親水性の効果が保たれることも確認された。さらに骨形成能を付与するために、カーボネートアパタイトの薄膜コーティング法、人工ペプチド固定化法などを検討している。

文 献

- 1) Morioka T, Matsunaga S, Yoshinari M, Ide Y, Nakano T, Sekine H, Yajima Y. Alignment of biological apatite crystallites at first molar in human mandible cortical bone. *Cranio*, 2012; 30 : 32~40.
- 2) Ogai T, Morioka T, Matsunaga S, Nojima K, Nishii Y, Sueishi K, Yoshinari M. Relationship between biological apatite alignment and hemi-occlusion in rabbit mandibular cortical bone. *Journal of Hard Tissue Biology* 2012; 21(2) : 165~172.
- 3) Furuya H, Matsunaga S, Tamatsu Y, Nakano T, Yoshinari M, Abe S, Ide Y. Analysis of biological apatite crystal orientation in the anterior cortical bone of the human mandible using microbeam X-ray diffractometry. *Materials Transactions*, 2012 : 53 : 980~984.
- 4) Katayama A, Arano T, Sato T, Ikada Y, Yoshinari M. Radial-flow bioreactor enables uniform proliferation of human mesenchymal stem cells throughout 3-d scaffold. *Tissue Engineering : Part C*, 2012, in press.
- 5) Tanabe K, Saima Hi, Suzuki K, Miura T, Yoshinari M. Effect of fluvastatin release on local osteogenicity in rat calvaria. *J Oral Tissue Engin*, 2011 ; 8 : 181~187.
- 6) Tanabe K, Nomoto H, Okumori N, Miura T, Yoshinari M. Osteogenic effect of fluvastatin combined with biodegradable gelatin-hydrogel. *Dent Mater J*, 2012, in press.
- 7) Yoshinari, M., Matsuzaka, K., Inoue, T. Surface modification by cold-plasma technique for dental implants -Bio-functionalization with binding pharmaceuticals-, *J Den Science Rev*, 2011 ; 47 : 89~101.
- 8) Miura T, Miyake N, Tanabe K, Yoshinari M. Change in zeta potential with physicochemical treatment of surface of anatase-form titania particles. *J Oral Tissue Engin*, 2011 ; 9(2) : 64~70.
- 9) Miura T, Iida M, Murata I, Yoshinari M. Ultraviolet irradiation alters adsorption behavior of albumin and

- lysozyme on titania particles, *J Oral Tissue Engin*, 2012; 9(3) : 147~151.
- 10) Miura T, Tanabe K, Yoshinari M. Ca(II)-EDTA shows antimicrobial activity against periodontopathic bacteria, *J Biomedical Sci Eng*, 2012; 5 : 10~14.
 - 11) Yoshida E, Yoshimura Y, Uo M, Yoshinari M, Hayakawa T. Influence of nanometer smoothness and fibronectin immobilization of titanium surface on MC3T3-E1 cell behavior, *J Biomed Mater Res A*, 2012; 100 : 1556~1564.
 - 12) Tada K, Sato T, Yoshinari M. Influence of surface treatment on bond strength of veneering ceramics fused to zirconia, *Dent Mater J*, 2012; 31(2) : 287~296.
 - 13) Takano T, Tasaka A, Yoshinari M, Sakurai K. Fatigue strength of Ce-TZP/Al₂O₃ nanocomposite with different surfaces, *J Dent Res*, 2012; 91 : 800~804.
 - 14) Kanbara T, Yajima Y, Yoshinari M. Wear behavior of tetragonal zirconia polycrystal versus titanium and titanium alloy *Biomed. Mater.* 6(2011)021001 doi: 10.1088/1748-6041/6/2/021001.2011.
 - 15) Koyama T, Sato T, Yoshinari M. Cyclic fatigue resistance of yttria-stabilized tetragonal zirconia polycrystals with hot isostatic press processing, *Dent Mater J*, 2012, in press.
 - 16) Egawa M, Miura T, Kato T, Saito A, Yoshinari M. In vitro adherence of periodontopathic bacteria to zirconia and titanium surfaces, *Dent Mater J*, 2012, in press.
 - 17) Hashimoto K, Yoshinari M, Matsuzaka K, Shiba K, Inoue T. Identification of peptide motif that binds to the surface of zirconia, *Dent Mater J*, 2011; 30 : 935~940.
 - 18) Kimura Y, Matsuzaka K, Yoshinari M, Inoue T. Initial attachment of human oral keratinocytes cultured on mirror surface zirconia or titanium, *Dent Mater J*, 2012; 31 : 346~353.
 - 19) Watanabe H, Saito K, Katsutoshi K ; Sasaki H, Yoshinari M. Change in surface properties of zirconia and initial attachment of osteoblast-like cells with hydrophilic treatment, *Dent Mater J*, 2012, in press.
 - 20) Ito H, Sasaki H, Yajima Y, Yoshinari M. Response of osteoblast-like cells to zirconia with different surface topography, *Dent Mater J*, 2012, in press.