

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

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

近年では、部分床義歯による補綴歯科治療においては、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維持・安定させるためには、インプラント体表面の表面形状と表面性状が重要な役割を担っている。そこで、純チタン (c. p. Ti) 表面に陽極酸化・水熱処理 (SA 処理) を施し、ナノ構造を有する陽極酸化被膜上にハイドロキシアパタイト (HA) を析出させた SA 処理 c. p. Ti が開発され、インプラント表面処理法としての有効性が報告されている。

歯髄幹細胞 (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。

これらの報告より、補綴歯科・インプラント治療への新たな治療戦略としては、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になると考えられる。

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、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 は JIS 規格第 2 種、直径 15 mm、厚さ 1.5 mm のディスクを使用し、機械研磨を行った。0.15M 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 50 mA/cm²、350 V の電流により放電陽極酸化 (AO) 処理を施し、AO 処理 c. p. Ti を製作した。さらに、300°C で 2 時間水熱処理を施し、SA 処理 c. p. Ti を製作した。

2. DPSCs の分離および培養

DPSCs は 6 週齢雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットの顎中切歯抜歯後にトリプシンコラゲナーゼを用いた酵素処理により分離、培養した。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、フローサイトメト

リーにより DPSCs の表面抗原を同定し、分化誘導を行い、脂肪分化は oil red O 染色および FABP-4 免疫染色により、骨分化は ALP 染色および osteocalcin 免疫染色により多分化能を確認した。

4. 細胞形態観察

DPSCs を c. p. Ti、AO 処理 c. p. Ti、SA 処理 c. p. Ti 上にて培養を 3、5、7 日間行い、DPSCs を固定後、走査型電子顕微鏡 (SEM) により形態観察を行った。

5. 細胞増殖活性試験

DPSCs を c. p. Ti、AO 処理 c. p. Ti、SA 処理 c. p. Ti 上にて培養を 3、5 日間行い、MTT Assay を使用し、細胞増殖能を測定した。

6. 骨形成関連遺伝子発現解析

DPSCs を c. p. Ti、AO 処理 c. p. Ti、SA 処理 c. p. Ti 上にて培養を 3、5 日間行い、リアルタイム PCR を使用し、osteopontin、bone sialoprotein および osteocalcin の発現解析を行った。

7. 石灰化基質形成能評価

DPSCs を c. p. Ti、SA 処理 c. p. Ti 上で培養を 7、14 日間行い、アリザリ

ンレッド S を用いて染色、測定した。また、細胞形態評価のため c. p. Ti、A0 処理 c. p. Ti、SA 処理 c. p. Ti 上の DPSCs を SEM により観察を行った。

8. 統計処理

各データは、一元配置分散分析を使用し比較検討した。有意水準は 5 % とした。

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。また、DPSCs の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 は陽性であり、造血幹細胞マーカーである CD34 および CD45 は陰性であった。

2. 多分化能評価

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

培養3、5、7日目において DPSCs は c. p. Ti、A0 処理 c. p. Ti、SA 処理 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。SA 処理 c. p. Ti 表面の DPSCs は、陽極酸化被膜のナノ構造、HA 結晶と接着し、細部突起は放電痕内部まで伸展していた。

4. 細胞増殖活性試験

培養3日後、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、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 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

1) Osteopontin、Bone sialoprotein

培養3、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、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。

2) Osteocalcin

培養3日後、mRNA 発現量は、c. p. Ti、コントロールと比較し SA 処理 c. p. Ti

は有意に増加したが、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。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、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

培養 7、14 日後のアリザリンレッド S 染色より、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。また、SEM による形態観察では c. p. Ti、A0 処理 c. p. Ti は、培養 7、14 日後は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、さらに培養 14 日後では板状の細胞形態も示した。

IV. 考察

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。

本研究結果より、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し細胞の分化調節機構を活性化させ、

DPSCs の細胞外基質の石灰化が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で、水酸基が増加しぬれ性が大きくなり、親水性の向上により表面自由エネルギーが大きくなったこと、そして、Ca および P を含むナノ構造の表面形状により骨基質石灰化が促進されたものと考えられる。

これらのことから、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、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示され、SA 処理 c. p. Ti インプラント治療へ DPSCs を併用する方法により、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が獲得される可能性が示唆された。

V. 結論

SA 処理 c. p. Ti 表面上の DPSCs は、c. p. Ti および A0 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、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

(論文内容の要旨)

No.8.....

愛知学院大学

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。