

〔学位論文〕

化学修飾法によるチタン表面の生体活性化

門 貴司

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野

Chemical modification of titanium surface

Takashi KADO

Division of Periodontology and Endodontology, Department of Rehabilitation, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

Key words : Titanium, Implant, Chemical modification, Biofunctional molecules

緒 言

インプラント周囲の組織構築には、インプラント表面が重要な役割を担うため、インプラント表面に対する様々な改質法が検討されている。インプラント周囲に目的の組織を構築するには、その中でも生体機能性分子をインプラント表面に固定化する手法が適しているが、純チタン表面に固定化した生体機能性分子による影響を種々の細胞に対して比較検討した報告はない。

そこで本研究では、まず純チタン表面に生体機能性分子を簡便かつ低温においても固定化できる化学修飾法を検討した。さらに、純チタン表面に生体機能性分子として細胞外マトリクスであるI型コラーゲン (Col)、フィブロネクチン (pFN) またはフィブロネクチンの主要活性部位であるGly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) ペプチドを固定化し、ヒト骨髄間葉系幹細胞 (hBMMSC) およびヒト歯根膜細胞群 (hPDLCs) の動態と分化に与える影響を比較検討した。

方 法

表面を鏡面に仕上げた純チタン (JIS第2種) 試料をコントロールとした。実験群として、研磨した純チタン試料を1%p-Vinylbenzoic acid (pVBA) 溶液に室温で2時間浸漬し、その後、GRGDS、pFNあるいはColを脱水縮合反応によってチタン表面に固定化した試料を用いた (GRGDS-im, pFN-im, Col-im)。

pVBAの結合と生体機能性分子の固定化は、フーリエ

変換型赤外分光高感度反射法 (FT-IR-RAS) とX線光電子分光分析法 (XPS) を用いて確認した。チタン表面に固定化された生体機能性分子はアミノ酸に加水分解し、さらにfluorescamineを結合させ、蛍光分光光度計を用いて定量した。

細胞動態は、hBMMSCとhPDLCsを用いて、初期付着細胞数の計測およびSEMと共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞の形態観察によって評価した。また、hBMMSCの骨芽細胞への分化は、RT-PCR法を用いた骨関連遺伝子発現の解析、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定およびアリザリン染色による石灰化物形成量の定量を行って調べた。

結果および考察

pVBAを結合させた純チタン表面では、超音波洗浄後においてもチタン表面に結合したpVBAに由来するメチレン基、ベンゼン環およびカルボキシル基による吸収のピークがFT-IR-RASにより観察され、本化学修飾法によりpVBAがチタン表面に結合されていることが確認された。また、XPSによる分析の結果、超音波洗浄後においてもコントロールおよびGRGDSを物理吸着させた試料と比較して、GRGDS-imでは400.3eVにN1sスペクトルの明瞭なピークが観察された。この結果から本化学修飾法によりGRGDSが純チタン表面に固定化されていることが確認された。さらに、物理吸着したGRGDSは容易に脱着することも分かった。

チタン表面に固定化された生体機能性分子の定量を行

受付：平成24年10月12日

ったところ、それぞれの分子の固定化密度は、GRGDSは $4.46\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (2.61×10^{15} GRGDS molecules/ cm^2), pFNは $2.92\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (7.66×10^{12} GRGDS molecules/ cm^2), Colは $6.73\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (4.06×10^{13} GRGDS molecules/ cm^2)であることが分かった。この結果より、GRGDSはpFNよりも多くの分子が固定化されていることが明らかとなった。

hBMMSCおよびhPDLCSの各チタン表面に対する初期付着細胞数を計測したところ、両細胞ともpFN-imおよびCol-imでは、コントロールと比較して2倍以上の細胞が付着していた。さらに、両細胞ともpFN-imおよびCol-imでは、コントロールおよびGRGDS-imと比較して明らかに細胞骨格が発達していた。pFN-imおよびCol-imにおけるhBMMSCのビンキュリンの発現は、コントロールおよびGRGDS-imと比較して、アクチンフィラメントに沿って広範囲に強く発現していた。また、Col-imにおけるhPDLCSのビンキュリンの発現は、コントロール、GRGDS-imおよびpFN-imと比較して、アクチンフィラメントに沿って広範囲に強く発現していた。これらの結果から、pFNおよびColを固定化したチタン表面は、hBMMSCの付着および伸展を促進し、ビンキュリンの発現から接着斑の形成を促進することが明らかとなった。また、pFNおよびColを固定化したチタン表面は、hPDLCSの付着および伸展を促進し、ビンキュリンの発現からColを固定化したチタン表面はhPDLCSの接着斑様構造の形成を促進する可能性が示唆された。

Col-imにおける骨関連遺伝子の発現を調べたところ、骨芽細胞分化初期に発現する転写因子の遺伝子であるRanx-2とOsterixの発現量は、コントロールと比較して有意に上昇した。ALP活性を測定したところ、Col-imおよびpFN-imでのALPの活性は、コントロールおよびGRGDS-imと比較して有意に上昇していた。また、アリザリン染色では、Col-imおよびpFN-imにおける石灰化物の形成量は、コントロールおよびGRGDS-imと比較して増加していることが分かった。これらの結果より、pFNおよびColを固定化したチタン表面は、hBMMSCの骨芽細胞への分化を促進していることが明らかとなった。

本研究では3種類のペプチドおよびタンパク質の細胞に対する応答を詳細に調べた結果、pFNの主用な活性部位であるRGD配列を持ったGRGDS-imでは、pFN-imと比較して、細胞の付着、伸展、接着斑様構造の形成および骨分化の活性が低いことが明らかとなった。この理由は、RGD配列は相乗部位であるPro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN) 配列が必要であることが推測される。従っ

て、GRGDSとPHSRNの両方を純チタン表面に固定することによりpFNと同等の活性に近づく可能性が考えられるが、固定量や比率をコントロールしてGRGDSとPHSRNの位置関係を制御する必要があると考えられる。

現在、インプラントの表面改質法は物理学的手法および形態学的手法が主流であり、これらは、主にオッセオインテグレーションの早期獲得を目的とした表面改質である。物理学的手法および形態学的手法は、様々なものが提案されており、様々な実験が行われている。今回の実験は、生化学的手法にp-ビニル安息香酸を用いた生体機能性分子をチタン表面に固定化する新規の化学修飾法を提案している。今回の実験の結果から、オッセオインテグレーションの早期獲得を目的とする場合はColあるいはpFNを固定化し、歯根膜様組織の構築を目的とする場合は、Colを固定化することで、インプラント周囲に目的の組織を構築することができる可能性を示唆している。

結 論

1. 本研究で検討した簡便かつ低温においても反応可能な化学修飾法を応用し、生体機能性分子を純チタン表面に本来の機能を維持した状態で固定化できることが明らかとなった。
2. コラーゲンおよびフィブロネクチンを固定化した純チタン表面は、鏡面研磨およびGRGDSを固定化した純チタン表面と比較して、ヒト骨髄間葉系幹細胞の付着、伸展および接着斑の形成が促進されることが明らかとなった。また、骨芽細胞への分化を促進していることも明らかとなった。
3. コラーゲンおよびフィブロネクチンを固定化した純チタン表面は、鏡面研磨およびGRGDSを固定化した純チタン表面と比較して、ヒト歯根膜細胞群の付着および伸展が促進されることが明らかとなった。また、コラーゲンを固定化した純チタン表面はヒト歯根膜細胞群の接着斑の形成を促進していることも明らかとなった。
4. 早期オッセオインテグレーションの獲得にはコラーゲンおよびフィブロネクチンを固定化したチタン表面が適していることが示唆され、チタン表面への歯根膜様組織の構築にはコラーゲンを固定化したチタン表面が適していることが示唆された。



門 貴司

平成19年 3 月 北海道医療大学歯学部歯学科卒業

平成24年 3 月 北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程卒業