

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 竹内 陽香
学位 博士(歯学)
学位記番号 新大院博(歯)第473号
学位授与の日付 令和3年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Investigation of titanium-adhesive proteins using a nano-smooth titanium substrate
(超平滑チタン基板を用いたチタン接着タンパク質の探索)

論文審査委員 主査 教授 泉 健次
副査 教授 魚島 勝美
副査 教授 照沼 美穂

博士論文の要旨

【緒言】

オッセオインテグレーションの成立はインプラント治療の成功の要因の一つと考えられているが、オッセオインテグレーションの成立機序には未解明な部分が多い。オッセオインテグレーションは骨とインプラントの密着であるが、埋入直後のチタン表面には骨などの組織分化に先んじて、インプラント窩洞に満たされた血液中のタンパク質が付着すると考えられる。インプラント埋入後の極めて早い時期に表面に接着するタンパク質は、それに続く細胞との相互作用、骨形成に重要と考えられるが、チタン製インプラントの表面に特異的に接着するタンパク質とその機能の探索は十分に行われていない。臨床的には同じ純チタン製のインプラントでも、粗面構造を持つチタンの方が平滑なチタンより優れた成績を残しているとされる。

しかしながら、これまでの研究では、粗面構造の凹凸に非特異的に付着するタンパク質とチタン特異的に接着するタンパク質とを区別できず、そのいずれがオッセオインテグレーション成立にとって重要な役割を果たしているのかは不明である。チタン特異的に接着するタンパク質が細胞接着を促進し、オッセオインテグレーション成立に寄与するとすれば、このタンパク質接着を促進することは、臨床成績の向上に繋がる可能性がある。

本研究では、構造的な影響を排除できると考えられる表面粗さ 0.6 nm の超平滑チタン基板を用いて、チタンそのものに特異的に接着するタンパク質を同定し、ラット血液中に存在する該当タンパク質の機能評価を行ったので報告する。

【方法】

表面粗さ 0.6 nm の超平滑チタン基板上にラット血液を播種、洗浄し、基板上に接着するタンパク質を回収して、タンパク質量分析を実施した。得られたタンパク質群を大きさと機能によりスクリーニングし、チタンに接着し、細胞接着促進に関連すると思われるタンパク質を候補タンパク質として選別した。候補タンパク質の血液中の存在を確認するために、ラット血球成分と血漿成分にウエスタンブロット解析を行なった。候補タンパク質の機能を確認するために、骨髄由来細胞接着促進機能解析、石灰化促進機能解析を行った。

【結果】

超平滑チタン基板上より回収したタンパク質を、相同性と大きさにより選別し、さらに細胞接着配列を有するタンパク質を機能解析候補タンパク質として選択した。候補タンパク質のうち **Vitronectin** は、ウエスタンブロット解析からラットの血漿成分中に存在することが確認された。**Vitronectin** を超平滑チタン基板表面にコーティングし、骨髄由来の接着性細胞と浮遊細胞の接着促進機能を解析したところ、**Control** と比較して骨髄由来の接着性細胞の接着を有意に促進した。一方で遺伝子発現と石灰化能の検討

結果から、Vitronectin に骨芽細胞分化促進機能は認められなかった。

【考察】

本研究では超平滑チタン基板を用いて血液中に存在するチタン接着タンパク質の分析を行なった。チタンやデンタルインプラントに接着するタンパク質を解析した研究は過去にも存在するが、実験には機械研磨、または粗面構造処理されたチタンインプラントを使用しており、粗面構造による非特異的タンパク質付着とチタン特異的な接着タンパク質を区別した解析には至っていない。本研究で用いた表面粗さ 0.6 nm の超平滑チタン基板は、SEM 画像分析で基板上に凹凸が確認できず、非特異的にタンパク質を付着させる可能性は極めて低いと考えられる。オッセオインテグレーションにおいて血液中のタンパク質接着はそれに続く細胞接着や各種細胞と相互作用を促進すると考えられるので、タンパク質量分析で得られたタンパク質群より RGD 配列を持つタンパク質をスクリーニングし、候補タンパク質の血液中の局在をウエスタンブロット解析によって確認した。今回のスクリーニングでは Vitronectin が細胞接着促進機能を持つチタン接着タンパク質として同定された。機能解析から Vitronectin は骨芽細胞の分化促進機能はないが、細胞接着を促進することでオッセオインテグレーションを促進する可能性が示された。今後は Vitronectin をより効果的に吸着させるインプラント表面の構造を探索し、デンタルインプラント治療の臨床成績を向上させることの可能性が示唆された。

【結論】

超平滑チタン基板を使用して血液より回収したタンパク質を分析することで、チタン接着タンパク質を同定することが可能になった。本研究ではチタン接着タンパク質の中から細胞接着を促進すると考えられるタンパク質として Vitronectin を同定した。Vitronectin はラット血漿成分に存在し、骨芽細胞分化促進機能は確認されなかったが、骨髄由来細胞接着を促進することが確認された。

審査結果の要旨

オッセオインテグレーションの確立は、「生活を営む骨組織とインプラント体とが光学顕微鏡レベルで直接密着し、持続した結合状態を呈し、インプラント体に加わった力が骨組織に直接伝達されること」を意味し、臨床的にデンタルインプラント成功に欠かせない要件と言われている。表面に不動態被膜をもつチタンは耐食性が高く、仮に何らかの原因でイオン化して体内に溶出しても、即座に酸素やH₂Oと反応し不活性化するため、チタンは生体内で異物として認識されにくく、免疫反応が起こりにくいため、生体内で使用するのに適した材料である。現在、臨床応用されているインプラントは骨芽細胞活動促進によるオッセオインテグレーション促進を意図して、粗面処理がなされている。しかし現状ではオッセオインテグレーションの機序、成立機構や、粗面処理がなぜオッセオインテグレーションを促進し得るか、といった疑問は解決されていない。本研究は、こうしたオッセオインテグレーションのメカニズムを組織学的アプローチではなく、タンパク質という生物学の根本からアプローチし直し、オッセオインテグレーションをこれまでの研究とは別の視点から、すなわち分子レベルで解明しようとしており、オッセオインテグレーションの新たな理解につながる可能性を秘めた有意義な研究である。

一般的にも、生体移植材料の研究に対しては、材料が生体に移植された直後に接するのは血液であり、細胞接着現象以前に血中因子の特異的接着が誘発されているということは、見逃しがちな視点であることから、他の研究者にも大いに参考となり、他方面の研究に貢献できると考えられることは、本研究のユニークさを際立たせている。

中でも本研究において特筆すべき点は、オッセオインテグレーションの機序解明に粗面構造によるオッセオインテグレーションの促進機序解明を目的にした点と言える。具体的には、逆説的なアプローチを実施したことである。すなわち、ナノレベル超平滑チタン基板を用いて、チタンに非特異的に接着し、細胞接着を促進し得るタンパク質がオッセオインテグレーションの起点になり得ると仮定し、スクリーニングと機能解析を実施したことである。この手法によりチタン表面に接着する非特異的タンパク質が同定されると、オッセオインテグレーションに対する今までの概念を覆すようなブレークスルーをもたらすポテンシャルを有しており、本研究はその科学的価値の高さを有している。

さらに、チタンの粗面処理によってオッセオインテグレーションが促進されるメカニズムの探索には粗面処理と平滑面処理による表面構造因子がチタン非特異的に付着を促進するタンパ

ク質の探索と、このタンパク質の機能解析が必要であった。そのためには、まずは構造因子によらず平滑なチタン表面に接着可能なタンパク質の解析が必要となる。これまでも粗面構造チタンや機械研磨チタン表面に付着するタンパク質を解析した研究報告はあったが、機械研磨表面は肉眼では平滑ではあるものの、電子顕微鏡ではマイクロサイズの構造が観察され、機械研磨表面と粗面構造表面との間に十分な構造因子的差異を検出困難である。このハードルを越えられたのは、本研究で使用した表面粗さ0.6 nmのナノレベル超平滑基板の作成に他ならず、構造因子によらないチタン特異的接着タンパク質の探索は、高度な金属表面加工技術と、質量分析を用いた異分野連携によるコラボレーションの確立は特筆すべきであり、大きな意義があるものと認められる。本研究では、顎骨へのインプラント埋入直後にはインプラント窩洞内の血液がチタン表面に接することから、血液を試料として、血中のタンパク質のスクリーニングを行っている。具体的には相同性と大きさにより選別し、細胞接着配列を有するタンパク質を機能解析候補タンパク質として選択した。このスクリーニングしたタンパク質のビッグデータの解析を実施したうえで、Vitronectinを超平滑チタン基板表面にコーティングし、骨髄由来の接着性細胞と浮遊細胞の接着促進機能を解析したところ、Controlと比較して骨髄由来の接着性細胞の接着を有意に促進したことを示している。かつ、候補タンパク質としてのVitronectinが、ウエスタンブロット解析からラットの血漿成分中に存在することが確認された。膨大な量のタンパク質からVitronectinにたどり着けたことは、オッセオインテグレーションの新しい解釈に対する大きな糸口となる貴重なデータであるといえ、Vitronectinという既知のタンパク質であったことが重要なポイントであり、本研究の影響力の大きさが期待できる。

一方で、Vitronectinの骨芽細胞への分化促進機能を本研究では確認できなかった。この点は、今後の研究方針を、結合ドメインを持つタンパク質であれば間接的に骨芽細胞分化を促進する効果をもち、オッセオインテグレーションの促進が可能であろうと解釈することで研究のターゲットが広がり、今後の成果につながる事が予想されるので、興味深い。

本研究によって得られた粗面構造を持たないナノレベル超平滑基板に非特異的に接着するたんぱく質として、血中に存在するVitronectinを同定できたことは、新しいオッセオインテグレーションの理解と、それを臨床的に応用する戦略の開発にとっても、非常に意義のある研究といえ、学位論文としての十分な価値が認められる。竹内氏の最終目標は「特定のタンパク質(群)のインプラント表面への接着を促進することでオッセオインテグレーションを促進可能なナノサイズ構造因子を付与したインプラント体の開発」である。本研究を推進することで、科学的基盤を元にしたオッセオインテグレーション促進可能な粗面構造の開発が可能となり、臨床における成功率、生存率の向上を達成するインプラント開発が可能になると思われ、本論文がインプラントの基礎的研究へ大きく寄与することを期待する。