

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名（本籍） 宮本 永浩（神奈川県）
博士の専攻分野 博士（歯学）
学位記番号 甲第 486 号
学位授与年月日 平成 30 年 9 月 30 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科
（博士課程）歯学専攻
学位論文題目 Bone Response to Titanium Implants Coated with Double- or Single-stranded DNA
（2 本鎖ならびに 1 本鎖 DNA により被覆したチタンインプラント体の骨反応）
Biomedical research international Article ID 9204391, Volume 2018 2018 年 6 月 13 日発行
論文審査委 主査 教授 山越 康雄
副査 教授 早川 徹 副査 教授 細矢 哲康

内容の要旨

【緒言】

歯科用チタン（Ti）インプラントの骨適合性向上を目指して、様々な表面改質法が考案されてきた。我々は、これまで新たな表面改質法として、DNA/プロタミンレイヤー固定化に着目し検討してきた。DNA は骨形成に重要だと考えられているリン酸基を豊富に含む生体高分子であり、今日までに種々の DNA/ポリカチオン複合体が検討され、特に DNA/プロタミン複合体が良好な骨形成を示すことが報告されている。我々は、チタンインプラントに DNA/プロタミンをレイヤー状に固定化し、動物を用いた埋入実験の結果から早期に骨形成が促進されることを見出した。

本研究では、DNA の立体構造が骨形成に関与しているとの仮説を立てた。本仮説の検証として、2 重らせん構造を持つ 2 本鎖 DNA（DNA-d）と 1 本鎖 DNA（DNA-s）を用いて、Ti インプラント体にプロタミンとのレイヤーコーティングを施し、ラット臼歯部に DNA-d / プロタミンおよび DNA-s / プロタミンレイヤー固定化 Ti インプラントを埋入することで、DNA の立体構造の違いが骨形成に与える影響について検討した。さらに、水晶発振子マイクロバランス（QCM）法を用い、各レイヤーコーティング表面への疑似体液中でのアパタイト沈着挙動の観察を行った。

【材料および方法】

1. DNA/プロタミンレイヤー固定化 Ti の作製

Ti 基材として、Ti ディスク（厚さ 1.0 mm, ϕ 12.0 mm）および Ti スクリュー（長さ 3.0 mm, ϕ 1.5 mm）の 2 種類を用いた。DNA には、サケ白子由来 DNA である DNA-d（bp300）および DNA-s（分子量=約 4,500）を用いて、DNA/プロタミンレイヤー固定化 Ti を作製した。

はじめにトレシルクロリド法を用いて、Ti 表面に塩基性タンパクであるプロタミンを化学的に結合させる処理を行った。すなわち、Ti 表面をトレシルクロリドで処理後、プロタミン水溶液にトレシル化 Ti を浸漬することでチタン表面にプロタミンを固定化した。次に、プロタミン固定化された Ti ディスクまたは Ti スクリューを DNA-d または DNA-s 水溶液およびプロタミン水溶液に 7 分ごとに交互に浸漬し、プロタミンと DNA のレイヤー固定化を行った。5 層となるように DNA/プロタミンレイヤーを積層し、表層は DNA とした。以上の方法を用いて、DNA-d/プロタミンレイヤー固定化 Ti（DNA-d/プロタミン Ti）、ならびに DNA-s/プロタミンレイヤー固定化 Ti（DNA-s/プロタミン Ti）を作製した。

2. DNA/プロタミンレイヤー固定化 Ti 表面のキャラクタリゼーション

固定化 Ti ディスクの表面状態を原子間力顕微鏡（AFM）にて観察し、表面粗さの測定を行った。また、接触角計を用い

て純水に対する接触角を計測した。

3. 動物埋入実験 (鶴見大学歯学部動物実験委員会 承認番号 28A070)

Wistar系ラット(6週齢, オス)の上顎第一大臼歯を抜歯後, DNA-d/プロタミンTi, ならびにDNA-s/プロタミンTiインプラント, およびコントロールとして無処理Tiインプラント体を埋入した。また, インプラント体周囲の新生骨を蛍光顕微鏡で観察するため, 試料摘出1週前にカルセインを皮下に注射した。インプラント体埋入3週後および6週後に試料を摘出し, 厚さ50-70 μ mの非脱灰薄切標本を作製した。共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)による蛍光ラベリングの観察後, 塩基性フクシン・メチレンブルーによる重染色を行い, 光学顕微鏡を用いてインプラント体周囲の骨形成の状態を観察した。さらに画像解析ソフトを用いて, 蛍光標識長ならびに骨-インプラント接触率(BIC)を求めた。

4. QCM測定

周波数27MHzのQCM装置を用いた。Tiセンサーに同様のDNA-d/プロタミンまたはDNA-s/プロタミンレイヤー固定化を行った。コントロールとして無処理Tiセンサーを用いた。各センサーを装着後, センサーセル内に疑似体液としてハンクス溶液(pH=7.4)を0.5ml注入した。ハンクス溶液注入後からの振動数変化を測定し, 各センサーでのアパタイトの析出開始時間ならびに10時間後のアパタイト析出量を求めた。

なお上記の統計学的検査はすべてone-way ANOVA, Tukeyの検定で行った。

【結果および考察】

AFM観察の結果, DNA-d/プロタミンTiおよびDNA-s/プロタミンTiの表面には球状構造物が確認された。表面粗さ(Sa)は, DNA-d/プロタミンTi > DNA-s/プロタミンTi > Tiの順に統計学的に有意に高い値を示した($p < 0.05$)。純水に対する接触角は, DNA-d/プロタミンTiおよびDNA-s/プロタミンTiともに, 無処理Tiに比べ有意に低い値であった($p < 0.05$)。これにより, 表面が親水化されたことが認められた。DNA-d/プロタミンTiとDNA-s/プロタミンTi間には有意差は認められなかった($p > 0.05$)。

動物埋入実験後, CLSM観察から算出したカルセインラベリング長は, 埋入3週および6週後, いずれも無処理Tiに比べ, DNA-d/プロタミンTiならびにDNA-s/プロタミンTiは有意に高い値を示した($p < 0.05$)。DNA-d/プロタミンTiとDNA-s/プロタミンTiとの間に有意差は認められなかった($p > 0.05$)。また, 6週後ではいずれの試料でも, 3週後に比べて有意にカルセインラベリング長が低下していた($p < 0.05$)。

BIC測定においても, 埋入3週および6週後でDNA-d/プロタミンTiならびにDNA-s/プロタミンTiは無処理Tiよりも有意に高い値を示した($p < 0.05$)。DNA-d/プロタミンTiとDNA-s/プロタミンTiとの間に有意差は認められなかった($p > 0.05$)。また無処理Tiでは, 6週後では3週後に比べて有意にBICが増加していたが($p < 0.05$)。DNA-d/プロタミンTi, DNA-s/プロタミンTiでは, 3週後と6週後に有意な差は認められなかった($p > 0.05$)。これらの結果から, DNA-d/プロタミンレイヤーおよびDNA-s/プロタミンレイヤー固定化はTiインプラント体と骨との早期の接合を促すことが示唆された。

QCM測定の結果, DNA-d/プロタミンTi, DNA-s/プロタミンTiのいずれもアパタイトの析出開始までの時間はTiの約1/2であり, 有意に速い値であった($p < 0.05$)。これは, DNAのリン酸基の効果によるものと思われる。しかしながら, DNA-d/プロタミンTi, DNA-s/プロタミンTi間に有意差は認められず($p > 0.05$)。10時間後のアパタイト析出量においても, 3種類の試料間に有意差は認められなかった($p > 0.05$)。アパタイトの析出開始時間は, コントロール群に比べ約1/2であった。QCM測定による早期のアパタイト形成は, 動物埋入実験における早期の骨形成を支持する結果であると推察される。

本研究の結果から, DNA-d/プロタミンおよびDNA-s/プロタミンレイヤー固定化が骨形成に与える有効性が明らかとなった。しかしながら, DNAの立体構造による差は認められず, DNAのリン酸基が骨形成に関与している可能性が示唆された。

今後は, DNA/プロタミンレイヤーとタンパク質との相互作用などを詳細に検討する必要がある。

審査の結果の要旨

歯科用チタン(Ti)インプラントの骨適合性向上を目指した表面改質法のうち, DNA/プロタミンレイヤー固定化法は, Tiインプラントに対して良好な骨形成を促進することが報告されている。本研究では, Tiインプラントに2本鎖DNA(DNA-d)/プロタミンおよび1本鎖DNA(DNA-s)/プロタミンをそれぞれレイヤーコーティングした複合体を用いて,

両 DNA 鎖の立体構造の違いが骨形成に与える影響について調べることと、疑似体液中でのレイヤーコーティング表面へのアパタイト沈着挙動を観察することを目的とした。

トレスクロリド法を用いて Ti インプラントにプロタミンを固定化した後 (プロタミン Ti), それを DNA-d 溶液とプロタミン溶液に交互に浸漬させて DNA-d/プロタミン Ti インプラント複合体を, また, DNA-s 溶液とプロタミン溶液に交互に浸漬させて DNA-s/プロタミン Ti インプラント複合体を作製した。両複合体の表面状態を原子間力顕微鏡にて観察し, 表面粗さを計測したところ, 両複合体の表面には球状構造物が存在することと, 表面が親水化されていることが確認された。さらに両複合体の接触角には有意差が無いことも確認された。

次に両インプラント複合体を Wistar 系ラットの上顎第一大臼歯抜歯窩に埋入し, インプラント体周囲の骨形成の状態を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) で観察後, 解析ソフトを用いてカルセインの蛍光標識長および骨-インプラント接触率 (BIC) を算出した結果, DNA-d/プロタミンおよび DNA-s/プロタミンレイヤーの固定化は Ti インプラント体と骨との接合を促進することが示唆された。

さらに Ti センサーに DNA-d/プロタミンおよび DNA-s/プロタミンを固定化し, 両 Ti センサー複合体に疑似体液として注入したハンクス溶液中の振動数変化を QCM 装置で測定して各センサーに対するアパタイト析出量を算出した結果, 両複合体のアパタイト析出開始時間は, コントロール群の約 1/2 であったことより, 上記動物埋入実験において示した早期骨形成の可能性を支持する結果であった。

本研究により DNA-d/プロタミンおよび DNA-s/プロタミンレイヤー固定化の骨形成に与える有効性が証明された。

本研究は今後の歯科インプラント治療に関連した医療応用に発展することが大いに期待できると考えられる。

よって, 本論文は博士 (歯学) の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。