

## 主論文の要旨

# The effect of macrophages on an atmospheric pressure plasma-treated titanium membrane with bone marrow stem cells in a model of guided bone regeneration

Guided bone regeneration モデルにおける  
大気圧プラズマ処理したチタンがマクロファージ  
に与える影響

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：日比 英晴 教授)

外山 直人

## 【緒言】

Guided bone regeneration (GBR)は、骨再生を目的とした治療法として臨床応用されている。GBRは生体材料の遮蔽膜により骨再生のスペースを保持し非骨形成性組織の侵入を防ぐことが原理とされるが、根底にある分子レベルでの生物学的メカニズムは十分に説明されていない。

埋入された生体材料に最初に付着するマクロファージは炎症性のM1と抗炎症性のM2と双極性を示し、その分極は生体材料の表面修飾により影響される。GBRの遮蔽膜として用いられるチタン(Ti)の表面修飾による骨再生、特に骨髄間葉系幹細胞(hBMSC)に及ぼす影響は近年報告されるようになってきたが、マクロファージに着目した報告は少ない。

大気圧プラズマ(APP)処理は、安全かつ容易な操作が可能であり、Ti表面を親水化させるために有用な方法である。本研究では、GBRの遮蔽膜として用いられるTiをAPP処理することにより骨再生が促進され、その機序としてマクロファージが関与するとの仮説を立て、検証した。

## 【方法】

厚さ0.02  $\mu\text{m}$ のTiを6 mm径の円形に成形し、窒素ガスを用いた大気圧プラズマ発生装置を使いAPP処理した(APP-Ti)。未処理のものをN-Tiとして実験に用いた。Ti表面を走査型電子顕微鏡、エネルギー分散型X線分光法、原子間力顕微鏡、水接触角(WCA)で評価した。

2種類のTi上でマクロファージに分化させた単球細胞株THP-1(hMps)を培養した。hMpsについて細胞増殖能をWST-8、炎症性/抗炎症性遺伝子をqPCR(CD80、CD163、CD206、IL-18、IL-10)、蛍光免疫染色(IL-18、IL-10)で評価した。また培養上清を液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS/MS)で評価した。

またAPP-TiとN-Tiで培養したhMpsと非接触型共培養し、細胞遊走能をhMpのqPCR(SDF-1)およびhBMSCのcell migration assayで評価した。また、hBMSCの骨形成関連遺伝子をqPCR(Runx2、OCN、Col1)、石灰化能をアリザリンレッドS染色、ALP活性で評価した。

動物実験では、10週齢のSprague-Dawleyラットの頭蓋骨に4.7 mm径の骨欠損を設定しAPP-Ti、N-Tiで被覆したGBRモデルを $\mu\text{CT}$ 、ヘマトキシリン-エオジン染色で評価した。

## 【結果】

### 1. Tiの表面解析

N-TiとAPP-Tiの間でトポグラフィーに有意な変化はなかった(Fig.1a、b、d-f)。APP-Tiの表面の元素の割合はOがN-Tiの表面よりも有意に高くなった(Fig.1c)。APP-TiのWCAは、N-Tiと比較し有意に小さかった(Fig.1g-i)。

2. Ti 上におけるマクロファージの細胞増殖能、炎症/抗炎症性遺伝子の発現解析  
WST-8 の結果、APP-Ti は N-Ti に比べて 2 時間後の細胞数が有意に少なかった。  
(Fig.2a)。APP-Ti 上の hMps では、炎症性遺伝子である IL-1 $\beta$  の発現は低下し  
(Fig.2c)、抗炎症性マーカー遺伝子である IL-10、CD163、CD206 の発現は有意に  
上昇した (Fig.2d-f)。蛍光免疫染色像においても同様の結果を示した (Fig.2g-i)。
3. 培養上清の LC/MS/MS  
LC/MS/MS の結果、N-Ti、APP-Ti で培養した hMps に由来する特異的なタンパク質  
を Table.1 に示す。骨芽細胞の分化に関連するタンパク質として PAI-1 および  
Syndecan-2 を同定した。
4. 単球細胞株 THP-1 (hMps) との非接触型共培養による hBMSCs の解析  
APP-Ti では hMp の SDF-1、hBMSCs の Runx2、Col1 の遺伝子発現が N-Ti と比較  
して有意に上昇した (Fig.3a-d)。Migration assay では APP-Ti における hBMSCs  
の遊走能は N-Ti と比較して有意に向上していたが (Fig.3e)、石灰化能に関して N-  
Ti と APP-Ti との間に有意な差はなかった (Fig.3f-h)。
5. GBR モデルによる解析  
 $\mu$ CT 解析では、N-Ti と APP-Ti の骨欠損部の不透過性は時間の経過とともに向上し  
ていたが、両群間に有意差を認めなかった (Fig.4b、c)。組織学的解析でも 1~2 週  
間で欠損部に新たに形成された骨が観察されたが両群間に有意差を認めなかった  
(Fig.4e)。

### 【考察】

APP 処理はトポグラフィーを変化させることなく、Ti 表面の O 原子の割合を増加させ濡れ性を向上させた。これは、早期の段階より hMps の細胞接着と増殖速度、炎症/抗炎症性マーカーの発現に影響を与えた。特に炎症性マーカーである IL-1 $\beta$  の低下、抗炎症性マーカーの IL-10 の上昇は M2 マクロファージに分極したことが考えられる。

培養上清の LC/MS/MS により、N-Ti 上および APP-Ti 上で培養した hMps は異なる機能を持つことが示唆された。また N-Ti 上で特異的に検出された PAI-1、Syndecan-2 は骨芽細胞の骨形成能に関連しており、hMps が hBMSC の骨形成能へ影響を及ぼすことを裏付けることになった。

APP-Ti 上での非接触型共培養は hMp の SDF-1 の遺伝子発現を上昇させ hBMSC の遊走を促進した。骨形成関連遺伝子の発現も N-Ti に対して有意に上昇したが、石灰化結節の形成や ALP 活性に有意差はなかった。この不一致は骨形成遺伝子の内因性発現よりも外因性タンパク質の影響が大きいことが窺われる。先行研究の多くは骨形成関連遺伝子の発現と石灰化結節の形成と ALP 活性の結果は一致するとしているが、IL-4 および IL-13 によって誘導された従来の M2 マクロファージを用いており、本研究のように APP 処理で誘導した hMps は、M2 マクロファージとは異なる表現型である可能性が示唆される。

動物実験では放射線学的小よび組織学的解析の結果、APP-Ti および N-Ti は新生骨の体積に有意差はなく、Ti に付着したマクロファージの効果は限定的であることが示唆された。GBR で骨形成を促進するためには、トポグラフィーの変化や Ti 表面への成長因子やサイトカインの固定などのさらなる改変が必要である。

#### 【結論】

Ti に付着した hMps が hBMSC の遊走能、骨芽細胞分化に影響を与える。APP 処理により hMps は hBMSC の遊走をさらに促進するが骨形成への影響は限定的であることが示唆された。