

## 論文内容の要旨

Establishment of Epithelial Attachment on Titanium Surface Coated  
with Platelet Activating Peptide  
—血小板活性化ペプチド処理したチタン表面への上皮細胞付着の確立—  
(PLOS ONE 平成 28 年 10 月掲載)

すがわら しほ  
菅原 志帆

### I. 研究目的

天然歯では、接合上皮細胞が基底膜を介して歯面に結合する強固な上皮封鎖が存在する。しかし、現行のインプラントアバットメントでは上皮細胞の基底膜は結合組織側を向いており、天然歯のような強固な封鎖は認められない。したがって、アバットメント周囲の脆弱な上皮封鎖は、細菌の侵入増殖を許し、インプラント周囲炎の一因となる。一方、活性化された血小板は、上皮細胞の遊走、付着および増殖活性因子の分泌によって上皮の再生を促すことが報告されている。本研究では、血小板活性化能を有するペプチドを応用し、チタン表面に基底膜を介した上皮細胞の接着を誘導することを目的とした。

### II. 研究方法

#### 1. 血小板活性化能を有するペプチドのチタン表面への固定

血小板活性化能を有するペプチド (protease activated receptor-4 activating peptide: PAR4-AP) をホスホン酸リンカーを介してチタン (0.05 mm 厚) 表面に固定した。

#### 2. チタン表面上で活性化された血小板が分泌する上皮誘導因子の分析

PAR4-AP を固定したチタン表面上に platelet-rich plasma を播種し、血小板の凝集を経時的に total ATP レベルで測定した。1 時間の培養後、走査型電子顕微鏡 (SEM) で血小板凝集塊の形成を観察し、ELISA にて活性化された血小板から分泌された上皮誘導因子 (EGF, IGF-I, TGF- $\beta$ , VEGF) を分析した。

#### 3. チタン表面に対する上皮細胞接着の分析

上皮細胞接着の分析には、不死化ヒト歯肉上皮細胞様細胞 OBA9 を用いた。細胞は EGF と bovine pituitary extract を含む keratinocyte-serumfree medium (SFM) で継代、維持した。チタン表面に形成した血小板凝集塊上での上皮細胞培養では、血小板凝集塊が分泌する因子の効果を判定する為、EGF と bovine pituitary extract を除いた SFM で共培養した。

OBA9 細胞と血小板凝集塊との共培養でチタン表面上に接着した OBA9 細胞は、DNA 染色を用いて経時的に測定した。48 時間の培養後、SEM にて接着した上皮細胞の超微細構造を観察し、共焦点顕微鏡にて基底膜の接着タンパク質である Laminin-5 およびタイトジャンクションの接着タンパク質である ZO-1 を免疫細胞化学的に観察した。さらに ELISA にて、培養上清中に分泌された抗菌ペプチドである LL37、および血小板凝集塊分解能を持つ線溶系プロテアーゼである tPA, uPA およびプラスミンを測定した。また、Laminin-5 と DAPI 陽性の核面積を Fiji (Image Processing Program) にて定量分析した。得られたデータは、t 検定または一元配置分散分析および Tukey の検定によって統計学的分析を行った。

### III. 研究成績

血小板の凝集は PAR4-AP 処理群で急速に進行し、SEM 像で密に凝集した血小板凝集塊が観察された。また、各種上皮誘導因子の有意な増加が確認された。接着細胞数は、PAR4-AP 処理群において経時的な増加が認められ、SEM 像にてチタン表面上への上皮細胞の接着が確認された。免疫細胞化学染色により、Laminin-5 陽性の伸展した基底膜および ZO-1 陽性のタイトジャンクションで連結している上皮シートが観察された。さらに、培養上清中の LL37 および tPA, uPA, プラスミンの有意な増加が確認された。未処理群では、チタン表面上に付着している上皮細胞は小さくラウンドアップしていたのに対し、PAR4-AP 処理群では Laminin-5 陽性面積が有意に増加し、チタン表面上への伸展した基底膜での接着を示した。

### IV. 考察及び結論

血小板活性化能を有するペプチドの応用によって、タイトジャンクションで連結している上皮細胞が、基底膜を介してチタン表面へ接着可能であることが明らかとなった。PAR4-AP 処理群の培養上清中には高濃度の tPA, uPA およびプラスミンが検出されており、これは上皮細胞が血小板凝集塊を分解してチタン表面に接着したことを示唆している。また PAR4-AP 処理群より LL37 の分泌が確認されたことから、抗菌活性向上への寄与が期待される。血小板活性化能を有するペプチドの修飾をチタンカスタムアバットメントに施すことが可能となれば、基底膜を介した細胞接着による抗菌性の獲得が可能と考えられ、インプラントの長期安定への貢献が期待できる。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授	八重柏 隆 (歯科保存学講座 歯周療法学分野)
副査 教授	近藤 尚知 (補綴・インプラント学講座 補綴・インプラント学分野)
副査 教授	石崎 明 (生化学講座 細胞情報科学野)

インプラントの長期予後を獲得するためには、オッセオインテグレーションのみならず、インプラントアバットメントへの軟組織の強固かつ機能的な生着が重要な役割を持つと考えられる。天然歯では、接合上皮細胞が基底膜を介して歯面に結合する強固な上皮封鎖が存在する。しかし、現行のインプラントアバットメントでは上皮細胞の基底膜は結合組織側を向いており、天然歯のような強固な封鎖は認められない。したがって、アバットメント周囲の脆弱な上皮封鎖は、細菌の侵入を許し、インプラント周囲炎の一因になっていると推測される。現在までに軟組織を接着させる方法として、アバットメント表面の機械的加工（超音波スケーラー、チタンブラシの使用、酸エッチング）や歯周細胞の接着を促す成長因子を用いた生化学的表面処理方法が用いられてきたが、いずれもインプラント周囲軟組織の強固かつ機能的な接着を達成させるには至ってはならず、インプラント治療における課題となっている。一方、活性化された血小板は、上皮細胞の遊走、付着および増殖活性因子の分泌によって上皮の再生を促すことが報告されている。本研究においては、血小板活性化能を有するペプチドを応用し、チタン表面に、上皮細胞の基底膜を介した接着を獲得することを目的とした。

チタン表面に、血小板活性化能を有するペプチド (protease activated receptor-4 activating peptide: PAR4-AP) をホスホン酸リンカーを介して固定し、platelet-rich plasma を播種し、血小板の凝集を経時的に total ATP レベルで測定した。1 時間の培養後、走査型電子顕微鏡 (SEM) で血小板凝集塊の形成を観察し、ELISA にて活性化された血小板から分泌された上皮誘導因子 (EGF, IGF-I, TGF- $\beta$ ,

VEGF) を分析した。さらに、不死化ヒト歯肉上皮細胞株 OBA9 細胞を、血小板凝集塊を形成したチタン表面上に播種し、DNA 染色を用いて、接着細胞数を経時的に測定した。48 時間の培養後、SEM にて上皮細胞の超微細構造を観察し、共焦点顕微鏡にて基底膜の接着タンパク質である Laminin-5 およびタイトジャンクションの接着タンパク質である ZO-1 を免疫細胞化学的に観察した。さらに ELISA にて、培養上清中に分泌された血小板凝集塊分解能を持つ線溶系プロテアーゼである tPA、uPA、プラスミン、および抗菌ペプチドである LL37 を測定した。また、Laminin-5 と DAPI の免疫染色陽性領域を画像解析ソフトウェアで分析した。

その結果、血小板の凝集は PAR4-AP 処理群で急速に進行し、SEM 観察下で密な血小板凝集塊が確認された。また、各種上皮細胞誘導因子の有意な増加が確認された。接着細胞数は、PAR4-AP 処理群において経時的に増加し、SEM にてチタン表面上への上皮細胞の接着が確認された。免疫化学染色により、Laminin-5 陽性の伸展した基底膜および ZO-1 陽性のタイトジャンクションで連結している上皮シートが観察された。さらに、培養上清中の tPA, uPA, プラスミンが有意に増加していることから、上皮細胞が血小板凝集塊を分解してチタン表面に接着したことが示唆された。また、PAR4-AP 処理群より LL37 の分泌が確認されたことから、抗菌活性向上への寄与が期待される。未処理群では、チタン表面上に付着している上皮細胞は小さくラウンドアップしていたのに対し、PAR4-AP 処理群では Laminin-5 陽性面積が有意に増加し、チタン表面上への伸展した基底膜を介した接着を示した。

上記より、血小板活性化能を有するペプチドの応用によって、タイトジャンクションで連結している上皮細胞が、基底膜を介してチタン表面へ接着可能であることが明らかとなった。血小板活性化能を有するペプチドの修飾をチタンカスタムアバットメントに施すことが可能となれば、基底膜を介した細胞接着による抗菌性の獲得が可能と考えられ、インプラントの長期安定への貢献が期待できる。

## 試験・試問結果の要旨

本研究の内容について本人から説明を受け質問を行った。また、今後の研究の展開ならびに関連する基本事項についても試問を行い、適切かつ十分な回答が得られたことから、学位に値する十分な学識と研究能力を有し、博士(歯学)の学位を授与することを適当と認める。

## 参考論文

1. unction of platelet-induced epithelial Journal of Dental 平成 29 年掲載予定  
attachment at titanium surfaces inhibit Research  
microbial Colonization  
(Masahiko Maeno 他 9 名と共著)