

Appearance of cell-adhesion factor in osteoblast  
proliferation and differentiation of apatite coating  
titanium by blast coating method

(ブラストコーティング法によるアパタイトコーティング  
チタンの骨芽細胞増殖・分化における細胞接着因子の発現)

氏名 梅田 浩嗣

所属 山口大学大学院医学系研究科

情報解析医学系専攻 歯科口腔外科学分野

平成 30年 2月

## 目次

1. 要旨	• • • • •	3
2. 研究の背景	• • • • •	4
3. 目的	• • • • •	5
4. 方法	• • • • •	5
5. 結果	• • • • •	8
6. 考察	• • • • •	9
7. 結論	• • • • •	11
8. 参考文献	• • • • •	12
9. 図表	• • • • •	18

## 1. 要旨

【目的】新しいアパタイトコーティング法であるブラストコーティング法は、常温でコーティングする方法であるため、高温の熱履歴を受けず、変性することなくコーティングが可能である。われわれはブラストコーティングチタン(BC)が他のチタンと比較して、*in vivo*にてインプラント埋入初期より優れた骨伝導性を有することを証明してきたが、*in vitro*にて十分な基礎データはまだ明らかにされていない。本研究は、BCが他のチタンと比較して良好な骨伝導性を有する詳細なメカニズムの解明を目的とする。

【方法】チタン表面にアパタイトパウダーをブラストしてBCを作成した。Saos-2細胞を用い、3種のディスク（純チタン(Ti)、フレームスプレー法によるコーティングチタン(FS)およびBC)に播種し培養した。各ディスク上の細胞数およびALP活性の測定、relative qPCR、Western blottingを行った。

【結果】細胞数はすべての期間においてBCで高値を示した。ALP活性は、1日目よりBCにおいて増強を認めた。mRNA発現は、BCではRunx2、Cyclin D1およびOsteopontinにおいて、特に分化の初期に発現増強を認めた。一方、Osteocalcinの発現増強は認めなかった。これは、BCが分化の初期に骨芽細胞増殖に影響を与える可能性があることを示唆している。Msx2およびTwistは、BCおよびFSの両方で減弱していた。これは、コーティングされたBCおよびFSにおいて、Tiと比較し、骨芽細胞の増殖および分化の抑制が低いことを示唆している。E-Cadherin、Fibronectinにおいては、BCおよびFSで発現増強を認めた。これらの細胞接着因子は、骨芽細胞の細胞間接着を介して細胞増殖と分化を促進し、BCへの骨芽細胞の初期接着を増強することが示唆された。タンパク発現では、BCにおけるE-Cadherin、Fibronectinの発現のみが増加した。

【結論】BCでは、TiやFSと比較して細胞接着因子の発現増強を認めた。接着因子の増強はチタンと骨との接着を促進し、その結果骨芽細胞の増殖・分化が促進するため、BCは高い骨伝導性を有することが示唆された。

## 2. 研究の背景

インプラントに用いる材料には、化学的に安定し、優れた生物組織適合性を有する生物学的条件と、咬合力に耐えうる静的強度、耐疲労性を有する力学的安全性が必要となる。そのため機械的強度と耐食性を有する純チタン(Ti)が使用されるようになり[1, 2]、Brånemarkらが提唱したosseointegrated implantによってその安全性と生態適合性は認知されるようになった[3, 4]。しかしインプラント体と骨との結合には6ヶ月以上の治療期間が必要であり、治療期間の長さが問題となっている[5]。そこで、骨芽細胞の早期付着を期待し、インプラント表面を粗造にする処理や[6]、骨伝導性を有するハイドロキシアパタイトをコーティングするなどの処理を施したインプラントが多く開発され、現在まで様々なコーティング法が臨床応用されているが[7-9]、その一方でインプラント周囲炎や骨髄炎等の経過不良例も多数認めるようになっている[10, 11]。現在、臨床で多く用いられているフレイムスプレー法の経過不良の原因として、コーティング工程において高温の熱履歴を受けるため、コーティング層の一部に熱分解生成物が形成され、長期的には、コーティング層の溶解、剥離を起こし骨結合の崩壊を来すことが考えられている[12-15]。そこでわれわれは新しいアパタイトコーティング法として、常温でアパタイトをコーティングする方法であるブラストコーティング法を提案した[16]。ブラストコーティング法は高温の熱履歴を受けず、変性することなくコーティングすることが可能である。われわれは、ブラストコーティングチタン(BC)が他のコーティングチタンと比較してアパタイトの剥離の問題がなく、*in vivo*にてインプラント埋入初期より優れた骨伝導性を有することを証明している[17]。また、常温で作製するBCでは、コーティングされたアパタイトは炭酸を含有しており、骨に類似したアパタイトであることが分かっている[17]。さらに、擬似体液に浸漬したときにコーティング表面に多くのカルシウムとリンが析出するため、高温コーティング法と比較して、より高活性のアパタイトコーティングチタンを製造することができる[17]。しかし、*in vitro*にて骨芽細胞がどのような挙動をとるのか、またどのような遺伝子あるいはタンパクが機能し、BCが高い骨伝導性を示すのかに関する十分な基礎データはまだ明らかにされていない。そこで、近年、骨芽細胞の増殖・分化に関与が示唆される細胞外マトリックスタンパク[18]やその他の因子、特に骨伝導性に大きく影響しているとの報

告を認める接着因子[19]を含む各種因子の発現を検討することで、*in vivo*にてBCが埋入初期より優れた骨伝導性を有するメカニズムの解明につながる可能性があると考えられる。

### 3. 目的

新しいアパタイトコーティング法であるブラストコーティング法は常温でコーティングする方法であるため、高温の熱履歴を受けず変性することなくコーティングが可能である。われわれはBCが他のチタンと比較して、*in vivo*にてインプラント埋入初期より優れた骨伝導性を有することを証明しているが、*in vitro*にて十分な基礎データはまだ明らかにされていない。

本研究は、BCが他のチタンと比較して優れた骨伝導性を有する詳細なメカニズムの解明を目的とする。

### 4. 方法

#### 4.1 チタンディスクの作製

直径30mm、厚さ3mmのチタンディスク (KYOCERA Medical Corporation, Osaka, Japan) を用いた。チタンディスクを10分間アセトンにて洗浄した。BCディスクは、Ti表面にサンドブラスター (Hi-blaster SHB-20, Shofu, Kyoto, Japan) を用いてチタン表面から2mmの距離で10秒間0.54MPaの圧縮圧力でアパタイトパウダー (HAP-BN; Central Glass, Tokyo, Japan) をブラストして作製した。フレイムスプレー法によるコーティングチタン (FS) は、3000°Cのフレイム溶射により、作製されたもの (KYOCERA Medical Corporation, Osaka, Japan) を用いた。コーティング後、ディスクに吸着したアパタイトパウダーを除去するために超音波洗浄を施行した。最後に酸化エチレンガス滅菌を行い実験に供じた (Fig. 1)。

## 4.2 細胞培養

ヒト骨肉腫由来のSaos-2細胞を, McCoy's 5A modified medium (Thermo Fisher Scientific K. K, Waltham, MA, USA)に10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand Island, New York, USA) と, antimycotic agent (Anti-Anti®, Invitrogen, Carlsbad, CA, U. S. A.)を加えたものにて培養した. 培養は, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>条件下にて行った. 培養液は3~4日に1度交換した.

カルシウムおよびマグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, Gibco) 中に0.05%trypsin (Gibco) と0.5mMエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含むtrypsin-EDTAによって細胞を分離した.

全ての実験において,  $2.5 \times 10^6$  / mlの細胞を3種類のディスク (Ti, FSおよびBCディスク) 上に播種し培養した.

## 4.3 骨芽細胞数の測定

$2.5 \times 10^6$  / mlの細胞を含有する100  $\mu$  lの培養液を, 3種のチタンディスク上で1, 5, 10および15日間培養した. 次いで, チタンディスクをPBSで2回洗浄し, 非接着細胞を除去した. 次に, 3種のチタンディスク上の細胞をtrypsin-EDTAで処理し, 血球計算盤 (n = 4) を用いて骨芽細胞数を計数した.

## 4.4 アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性

アルカリフォスファターゼ活性の測定のために,  $2.5 \times 10^6$  / mlの細胞を含む培養液100  $\mu$  lを3種のチタンディスク上で1, 5, 10および15日間培養した. 培養後に細胞をPBSで洗浄し, 50mM Tris-HCl, 0.1%Triton X-100, 0.9%NaCl中で4°C15分間溶解した. 遠心分離により細胞溶解物を清澄化した後, LabAssay™ ALP kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) によりALP assayを行った. 405nmでの吸光度を, microplate reader model 680 (Bio Rad, Tokyo, Japan) を用いて測定した (n = 4) .

## 4.5 relative qPCR 分析

2.5×10<sup>6</sup> / mlの細胞を含む100 μlの培養液を、3種のチタンディスク上で5、10日間培養した。培養後、RNA抽出を行い、マイクロアレイ解析によりスクリーニングされた差別的に発現した転写物を選択し、relative qPCRを用いて検討した。骨芽細胞の特異的マーカーであるRunx2, Cyclin D1, ALP, Osteopontin, Osteocalcin, Msx2, Twist, E-CadherinおよびFibronectinについて、relative qPCR assayを行った。各mRNA発現は、protocolに従い、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて行った。各遺伝子のPCR 反応は、TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)とAssays-on-Demand™ Gene Expression assay mix, Hs01598309\_m1 (Applied Biosystems)を用いて、全量50 μl中に50ngのcDNAを加えてアッセイした。ウラシル-N-グリコシラーゼ (UNG) 消化のための50°Cで2分間と、Universal PCR master mixによるAmpliTaq Gold® DNAポリメラーゼの活性化のための95°Cで10分間の初期インキュベーション後、サンプルは95°Cで15秒引き続き60°Cで1分間の40サイクル処理を行うことで増幅された。使用したプライマーをtable 1に示す。

#### 4.6 ウェスタンブロッティング分析

2.5×10<sup>6</sup> / mlの細胞を含む100 μlの培養液を、3種のチタンディスク上で10日間培養した。Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Thermo Fisher scientific) を用いて全細胞溶解物を調製し、10% SDS-polyacrylamide gels (Thermo Fisher scientific)上で電気泳動し、次いでPVDF membrane (Thermo Fisher scientific) に転写した。ブロッキング後、membraneは、各種一抗体 anti-Osteocalcin mouse monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), Osteopontin rabbit monoclonal antibody (Santa Cruz), E-Cadherin (Santa Cruz), Fibronectin (Santa Cruz) と一晩インキュベートし、その後二次抗体 Novex® alkaline-phosphatase conjugated (goat) anti-rabbit あるいは (goat) anti-mouse immunoglobulin G (IgG) secondary antibody (Thermo Fisher scientific) と1時間インキュベートした。それぞれの抗体は、発色免疫測定システム、WesternBreeze (Thermo Fisher scientific) をprotocolに従って

使用して検出した。また, anti $\alpha$ -tubulin monoclonal antibody (Santa Cruz Biotech.) をウエスタンブロット分析の内部コントロールとして使用した。

#### 4.7 統計分析

統計分析は、Mann-Whitney U検定にて行った。全ての統計的有意差は、 $P < 0.05$ に設定した。StatView software (version 5.0J, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) を用いて統計分析を行った。

## 5. 結果

### 5.1 骨芽細胞数の測定

Figure 2は、Ti, BCおよびFSディスク上での1, 5, 10および15日間の培養後の骨芽細胞数を示す。これらの期間中、Saos-2細胞は3種のディスクすべてにおいて同様の増殖変化を示した。1日目では3種全てにおいてほぼ同数であった。5日目ではコーティングを施したBCおよびFSにおいて、1日目に比べて有意に増加した。10日目には、3種類すべてにおいて細胞数のピークを認め、Tiと比較してBCは約2.2倍、FSは約1.8倍であった。さらにFSとBC間で有意差を認めた。15日目には3種全てのディスクにおいて細胞数の減少を認めたが、Tiと比較しコーティングが施されたBCおよびFSでは細胞数は高値であった。すべての期間において、BCではTiおよびFSよりも細胞数は高値であった。

### 5.2 アルカリフォスファターゼ(ALP) 活性の測定

Figure 3は、Ti, BC, およびFSディスク上での1, 5, 10および15日間の培養後のALP活性を示す。ALP活性は、3種のディスクすべてにおいて同様の変化であった。1日目ではTiおよびFSと比較して、BCにおいてALP活性の増強を認めた。さらに、FSとBCとの間に有意差を認めた。3種すべてにおいて5日目にピークを認めた。Tiと比較してコーティングが施されたBCおよびFSでは、いずれも約2.5倍の増強を認めた。10日目以降は、ALP活性の阻害が3種全てで認められ、5日目ではALP活性は1日目よりも低下していた。



### 5.3 mRNA発現

Figure4は、Ti, BCおよびFSディスク上での培養5日目および10日目における各因子のmRNA発現を示す。BCはTiと比較して、Runx2においては5日目および10日目にいずれも約2倍高値であった。また、5日目のCyclin D1では約2倍、10日目のALPは約5倍、10日目では約3.5倍であり、また5日目および10日目のOsteopontinは約3.5倍であった。さらに、分化を抑制するMsx2およびTwistに関しては、Tiと比較してBCとFSの両方において、5日目にTwistの発現減弱が認められたが、Msx2に関してはほぼ同様であった。骨芽細胞の細胞間接着を担うE-CadherinおよびFibronectinでは、BCおよびFSの両方において、Tiと比較して発現増強を認めた。特にBCでは、E-CadherinおよびFibronectinは、5日目にそれぞれ約7.5倍、5.5倍の発現増強を認めた。

### 5.4 タンパク発現

Figure5は、Ti, BCおよびFSに対する培養10日目における様々な因子のタンパク発現を示す。すべての因子のタンパク発現が認められた。OsteocalcinおよびOsteopontinに関しては、Ti, BCおよびFSにおいてほぼ同様の発現レベルであった。E-CadherinおよびFibronectinに関しては、TiおよびFSと比較してBCにおいて発現増強を認めた。

## 6. 考察

本研究では、我々はアパタイトを常温で変性することなくコーティングする方法あるブラストコーティング法を提案した[16]。

TiまたはFSと比較して、BCはin vivoにてインプラント埋入後1週間および3週目に、より良好な初期骨伝導性および生物学的親和性をもたらすことが既に実証されている[17]。本研究では、これまでのin vivoでの実験で示したこのコーティング法の優れた骨伝導性の発現メカニズムの解明を試みた。

マイクロメートルレベルでのチタンの粗さの変化は、骨芽細胞の接着、増殖および分化に影響することが報告されており[20, 21]、表面が粗過ぎると分化

マーカーの発現が抑制されることが報告されている[22, 23]. 本研究で使用したTi, FS, BCディスク(粗さ:それぞれ1.7, 3.9, 1.3 $\mu\text{m}$ ) [17]の中で, BCディスクは表面が最も滑らかで, 骨芽細胞において最も高い分化を示した. ほぼ同じ粗さを有するTiとBC間の骨芽細胞の分化機能において確認された明確な差異に関して, われわれの結果は, これが主にハイドロキシアパタイトコーティングの化学的特性の差に起因する可能性があることを示唆している.

ALPは骨芽細胞の細胞膜に多く含まれ, 骨髄細胞が骨芽細胞に分化していることを示すとともに, 骨芽細胞の増殖, 初期分化マーカーであることが知られている[24]. 本研究においても, BC, FSではTiと比較して, 初期より骨芽細胞数の増加, ALPの活性を認め, 骨芽細胞の増殖, 分化が促進している可能性が示唆された.

骨結合率は, 急速な骨芽細胞の接着や, 分化の初期段階において, インプラント表面と骨表面とが, いかに素早く接着するかが影響することが報告されている[25]. 本研究では, Runx2(骨芽細胞分化に必須)[26], Cyclin D1(細胞増殖期初期の細胞周期を制御)[27], およびOsteopontin(骨芽細胞の接着を促進)[28, 29]のmRNA発現は, 他のディスクと比較して, BCでは特に分化の初期段階で数倍高値であった. 一方, Osteocalcin(成熟骨芽細胞で発現される石灰化組織中の骨形成マーカー)[30]の発現は, BCでは増強されなかった. これらのデータは, BCが分化の初期段階の骨芽細胞増殖に影響を与える可能性があることを示唆している. さらに, Msx2およびTwistは, 骨芽細胞の増殖および分化を阻害する可能性のある因子として知られており[31, 32], それらの発現はBCおよびFSの両方で減弱していた. この結果は, コーティングが施されたBCおよびFSにおいて, 骨芽細胞の増殖および分化の阻害がTiに比べて低いことを示唆している.

Fibronectinは, 骨芽細胞の初期接着を増強させることが知られており[33], またE-Cadherinは細胞間接着タンパク質であることが知られている[34]. Shibataらは, Fibronectinはチタンディスクへの細胞接着にとって必要不可欠な因子であると報告している[35]. 今回の研究で, BCにおいてFibronectinとE-CadherinのmRNAの著しい発現増強を認めたことより, これらの細胞接着因子は骨芽細胞の細胞間接着を介して細胞の増殖と分化を促進し, BCへの骨芽細胞の初期接着を増強する可能性が示唆された.

われわれはまた、Osteocalcin, Osteopontin, E-Cadherin, および Fibronectinのタンパク発現を検討した。BCにおけるE-Cadherinおよび Fibronectinのタンパク発現のみ増強を認めた。

本研究で、BCでは接着因子は分化の初期段階でインプラント体と骨表面との接着を促進し、また、骨芽細胞の増殖および分化を促進することで骨とBCとの早期の骨結合をもたらすことが示唆され、*in vivo*での実験結果[17]を裏付ける結果となった。また、BCは常温で作製されるためコーティング層に亀裂や剥離が生じにくく、BCディスク上のアパタイトが吸収され、骨に置換されることでより強固な骨結合が期待できる。

## 7. 結論

本研究の結果、BCでは、TiやFSと比較して骨芽細胞の増殖・分化因子と同様に細胞接着因子の発現増強を認めることで高い骨伝導性を有することが示唆された。その結果、*in vivo*での研究で確認されたようにインプラントと骨との早期接着を促進する可能性が考えられ、本研究の結果はこれまでの*in vivo*での実験結果を裏付けとなることが示唆された。

## 8. 参考文献

1. Itakura Y, Kosugi A, Sudo H, Yamamoto S, Kumegawa M. Development of a new system for evaluating the biocompatibility of implant materials using an osteogenic cell line(MC3T3-E1). J Biomed Mater Res. 1998;22:613-22. doi:10.1002/jbm.8202 20703.
2. Bordji K, Jouzeau JK, Mainard D, Payan E, Netter P, Rie KT, Stucky T, Hage-Ali M. Cytocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti- 5Al-2.5Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts. Biomaterials. 1996;17:929-40. doi:10.1016/0142-9612(96)83289-3.
3. Hansson HA, Albrektsson T, Branemark P-I. Structural aspects of the interface between tissue and titanium implants. J Prosthet Dent. 1983;50:108-13.
4. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Int J Oral Surg. 1981;6:387-416. doi:10.1016/S0300-9785(81) 80077-4.
5. Barber HD, Seckinger RJ, Hayde RE, Weinstein GS. Evaluation of osseointegration of endosseous implants in radiated, vascularized fibula flaps to the mandible. J Oral Maxi Surg. 1995; 53:640-44. doi:10.1016/0278-2391(95)90158-2.
6. Kakuta S, Miyaoka K, Fujimori S, Lee WS, Miyazaki T, Nagumo M. Proliferation and differentiation of bone marrow cells on titanium plates treated with a wire-type electrical discharge machine. J Oral Implantol. 2000;26:156-62. doi:10.1563/1548- 1336. (2000)026%3C0156:PADOBM%3E2. 3. CO;2.

7. Yang Y, Kim KH, Ong JL. A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process—An alternative to plasma spraying. *Biomaterials*. 2005;26:327-37. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.029.
8. Roy M, Krishna VB, Bandyopadhyay A, Bose S. Compositionally graded hydroxyapatite/tricalcium phosphate coating on Ti by laser and induction plasma. *Acta Biomater*. 2011;7:866-73. doi:10.1016/j.actbio.2010.09.016.
9. Roy M, Bandyopadhyay A, Bose S. Induction plasma sprayed Sr and Mg doped nano hydroxyapatite coatings on Ti for bone implant. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011;99:258-65. doi:10.1002/jbm.b.31893.
10. Elias CN, Oshida Y, Lima JH, Muller CA. Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2008;1:234-42. doi:10.1016/j.jmbbm.2007.12.002.
11. Ong JL, Chan DC. Hydroxyapatite and their use as coatings in dental implants: a review. *Crit Rev Biomed Eng*. 2000; 28:667-707.
12. Zyman Z, Weng J, Liu X, Zhang X, Ma Z. Amorphous phase and morphological structure of hydroxyapatite plasma coatings. *Biomaterials*. 1993;14:225-8.
13. Gross KA, Berndt CC. Thermal processing of hydroxyapatite for coating production. *J Biomed Mater Res*. 1998;39:580-7.
14. Sergo V, Sbaizero O, Clarke DR. Mechanical and chemical consequences of the residual stresses in plasma sprayed hydroxyapatite coatings. *Biomaterials*. 1997;18:477-82. doi:10.1016/

S0142-9612(96)00147-0.

15. Yang CW, Lee TM, Lui TS, Chang E. A comparison of the microstructural feature and bonding strength of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings with hydrothermal and vacuum post-heat treatment. *Mater Trans.* 2005;46:46709-15. doi:10.2320/matertrans.46.709.
16. Mano T, Ueyama Y, Ishikawa K, Matsumura T, Suzuki K. Initial tissue response to a titanium implant coated with apatite at room temperature using a blast coating method. *Biomaterials.* 2002;23:1931-6. doi:10.1016/S0142-9612(01)00319-2.
17. Mano T, Ishikawa K, Harada K, Umeda H, Ueyama Y. Comparison of apatite-coated titanium prepared by blast coating and ame spray methods - evaluation using simulated body uid and initial histological study. *Dental Mater J.* 2011;30:431-7. doi:10.4012/dmj.2010-162.
18. Barros RR, Novaes AB, Palexiou V, Souza SL, Taba M, Palioto DB, Grisi MF. Effect of biofunctionalized implant surface on osseointegration: a histomorphometric study in dogs. *Braz Dent J.* 2009;20:91-8. doi:10.1590/S0103-64402009000200001.
19. Gorbahn M, Klein MO, Lehnert M, Ziebart T, Brullmann D, Koper I, Wagner W, Al-Nawas B, Veith M. Promotion of osteogenic cell response using quasicovalent immobilized fibronectin on titanium surfaces: introduction of a novel biomi- metic layer system. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70:1827-34. doi:10.1016/j.joms.2012.04.004.
20. Masaki C, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression.

- Clin Oral Implants Res. 2005;16:650-6. doi:10.1111/ j.1600-0501.2005.01170. x.
21. Guéhenec LLe, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. Dent Mater. 2007;23:844-54. doi:10.1016/j.dental.2006.06.025.
22. Quirynen M, Abarca M, Van Assche N, Nevins M, van Steenberghe D. Impact of supportive periodontal therapy and implant surface roughness on implant outcome in patients with a history of periodontitis. J Clin Periodontol. 2007;34:805-15. doi:10.1111/j.1600-051X.2007.01106. x.
23. Albrektsson T, Wennerberg A. The impact of oral implants- past and future, 1966-2042. J Can Dent Assoc. 2005;71:327 .
24. Yasuyoshi T, Kiyotaka H, Yasuko Y, Nnorihito T. Demonstration of alkaline phosphate participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. Cell Biol Int. 1996;20:459-64. doi:10.1006/cbir.1996.0060.
25. Park JM, Koak JY, Jang JH, Han CH, Kim SK, Heo SJ. Osseointegration of anodized titanium implants coated with fibroblast growth factor-fibronectin (FGF-FN) fusion protein. Int J Oral Maxillofac Implant. 2006;21:859-66.
26. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. Annu Rev Cell Dev Biol. 2009;25:629-48. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113308.
27. Schwartz MA, Assoian RK. Integrins and cell proliferation: reg-

ulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci.* 2001;114:2553-60.

28. Scarano A, Degidi M, Iezzi G, Petrone G, Piattelli A. Correlation between implant stability quotient and bone-implant contact: a retrospective histological and histomorphometrical study of seven titanium implants retrieved from humans. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2006;8:218-21. doi:10.1111/j.1708-8208.2006.00022.x.

29. Aboushelib MN, Salem NA, Taleb AL, El Moniem NM. Influence of surface nano-roughness on osseointegration of zirconia implants in rabbit femur heads using selective infiltration etching technique. *J Oral Implantol.* 2013;39:583-90. doi:10.1563/AAID-JOI-D-11-00075.

30. Gerstenfeld LC, Chipman SD, Glowacki J, Lian JB. Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. *Dev Biol.* 1987;122:49-60.

31. Jeong M, Jin YH, Choi YH, Yum J, Choi JK, Yeo CY, Lee KY. PKC signaling inhibits osteogenic differentiation through the regulation of Msx2 function. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823:1225-32. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.05.018.

32. Lee MS, Lowe GN, Strong DD, Wergedal JE, Glackin CA. TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, can regulate the human osteogenic lineage. *J Cell Biochem.* 1999;75:566-77.

33. Dean JW, Culbertson KC, D' Angelo AM. Fibronectin and laminin enhance gingival cell attachment to dental implant surfaces in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 1995;10:721-8.

34. Fiorino C, Harrison RE. E-cadherin is important for cell differ-



entiation during osteoclastogenesis. *Bone*. 2016;86:106-18.  
doi:10.1016/j.bone.2016.03.004.

35. Shibata Y, Hosaka M, Kawai H, Miyazaki T. Glow discharge plasma treatment of titanium plates enhances adhesion of osteoblast-like cells to the plates through the integrin-mediated mechanism. *Int J Oral Maxillofacial Implant*. 2002;17:771-7.

## 9. 図表

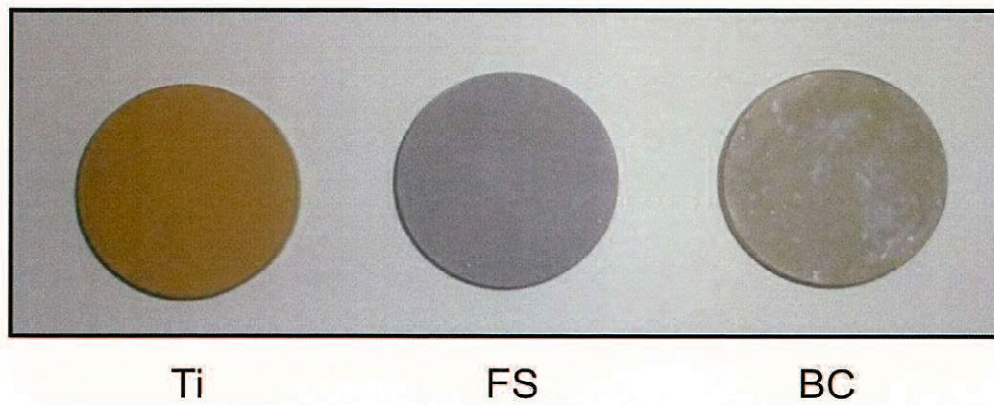


Figure 1.

Ti, FS, BCディスクを示す。Tiディスクはコーティングを施していない純チタンを使用した。(直径30mm, 厚さ3mm)。FSディスクは 3000°Cのフレイム溶射により作製されたものを使用した。BCディスクはアパタイトパウダーをブラストして作製したものを使用した。

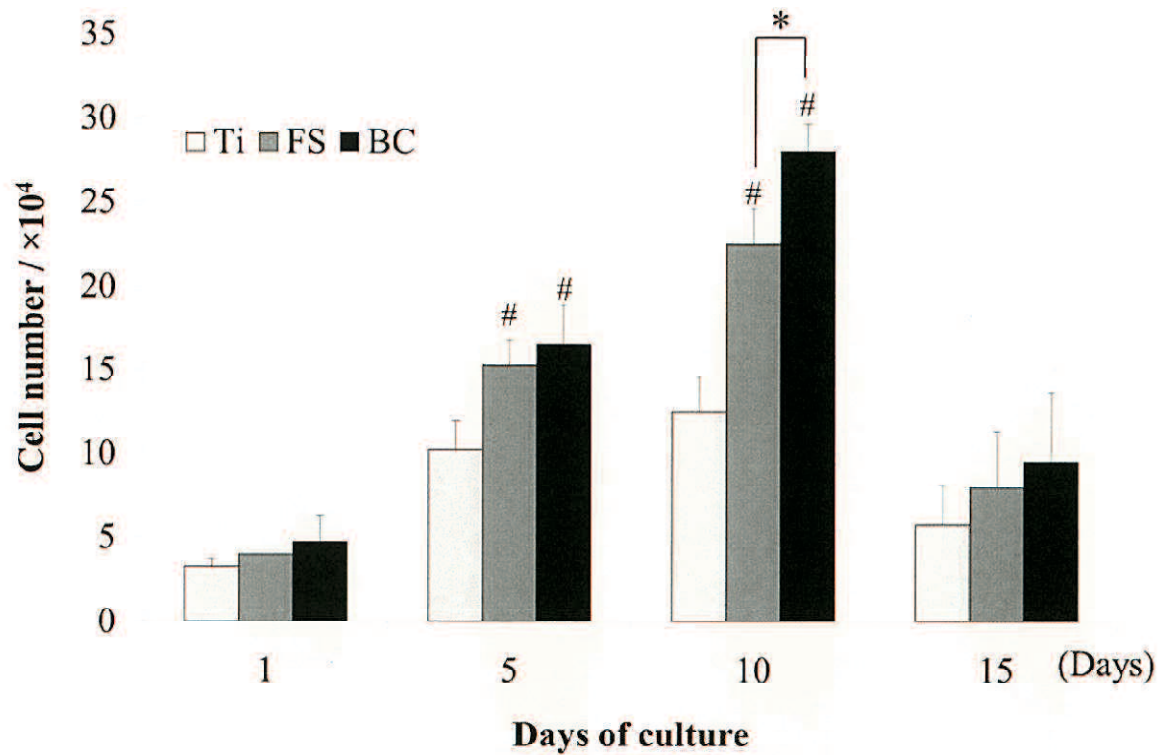


Figure 2.

Ti, BC, FS上で1, 5, 10, 15日間培養した後の骨芽細胞数を示す(n = 4). Ti, FSと比較して, BCで最も高値であった.

#P < 0.05 when compared to that of Ti (Mann-Whitney's U test),

\*P < 0.05 FS vs. BC (Mann-Whitney's U test).

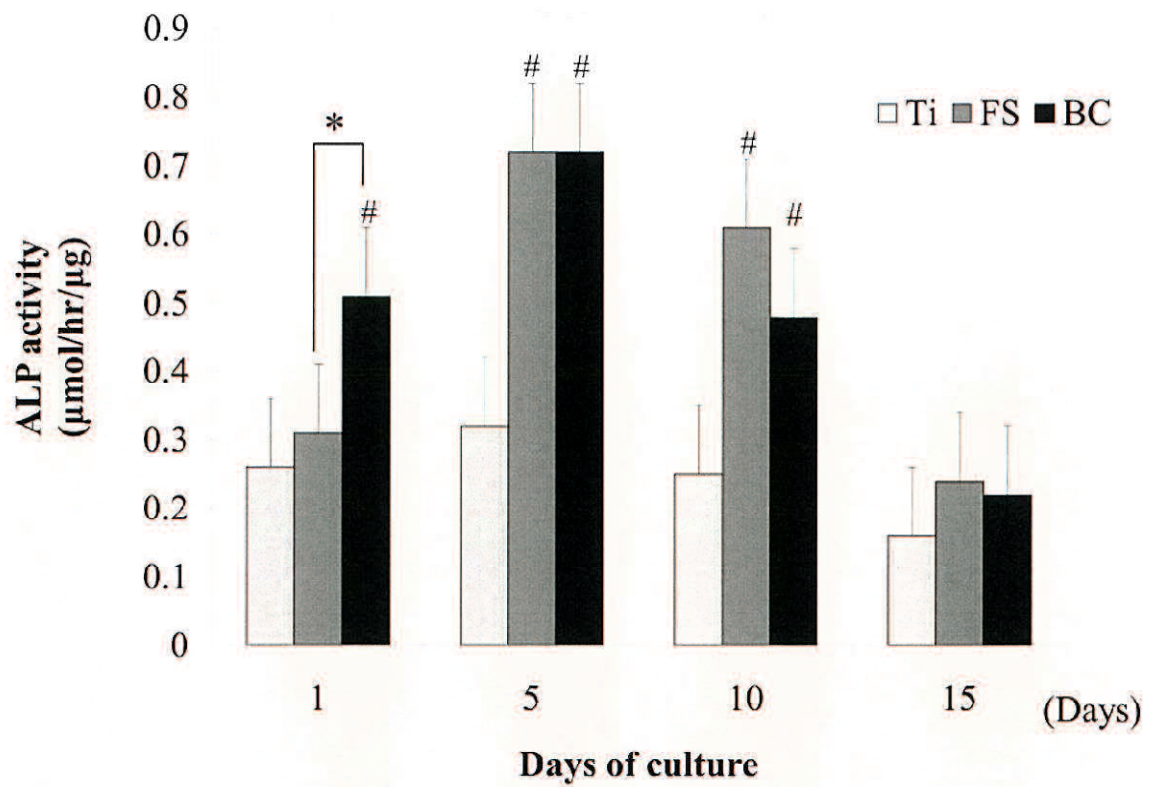


Fig. 3 Ti, BC, FS上で, 1, 5, 10, 15日間培養した後のALP活性(n = 4)を示す. BCにてALP活性の発現増強を認めた.

#P < 0.05 when compared to that of Ti (Mann-Whitney' s U test),

\*P < 0.05 FS vs. BC (Mann-Whitney' s U test).

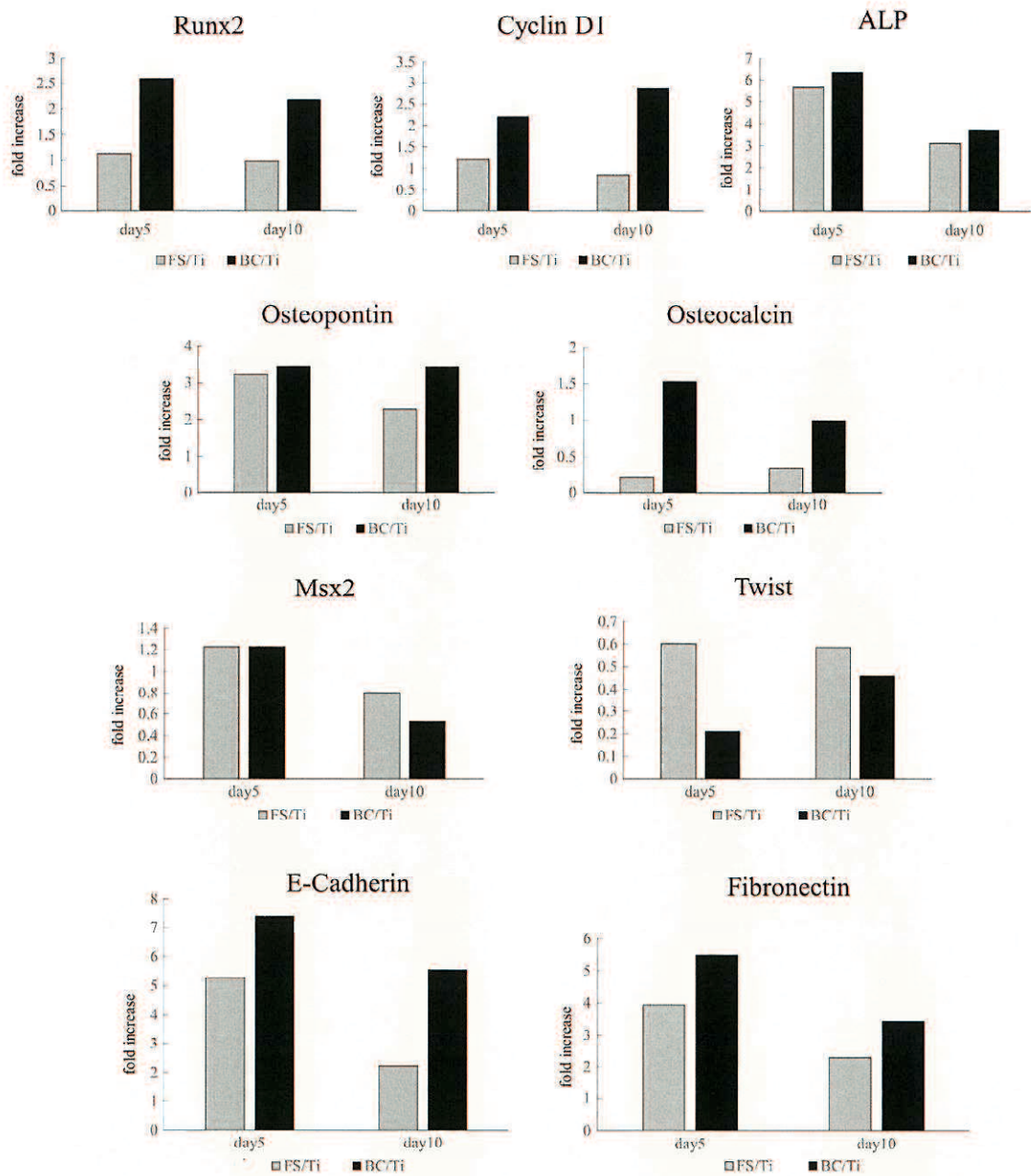


Fig. 4 Ti, BC, FS上で5, 10日間培養した後の骨芽細胞増殖・分化を促進する各因子のmRNA発現量を示す。FSと比較し, BCにて様々な骨形成因子の発現増強を認めた。

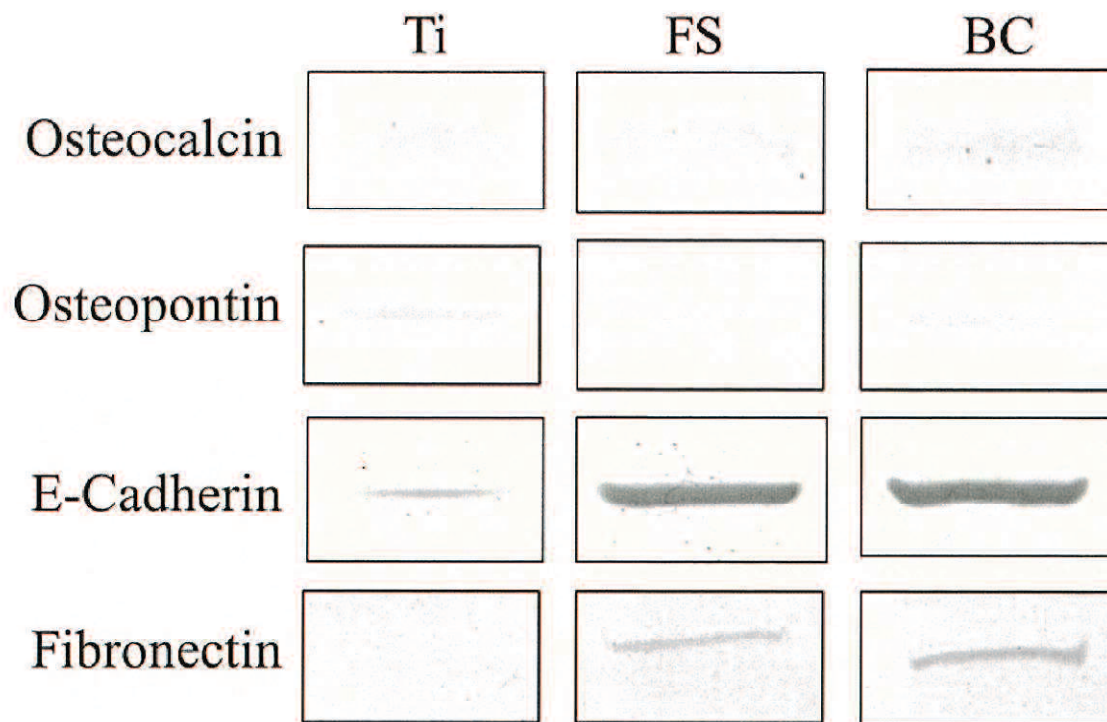


Fig. 5 Ti, BC, FS上で10日間培養した後の各因子のタンパク発現量を示す。E-CadherinおよびFibronectinの発現は、TiおよびFSと比較してBCにおいて最も増強していた。

**Table 1** List of primers used in relative qPCR analysis

Name of primer	Assay ID
Runx2	Hs04902285
Cyclin D1	Mm00432359
ALP	Hs01013953
Osteopontin	Gg03362460
Osteocalcin	Gg03362460
Msx2	Hs00751239
Twist	Hs00814299
E-Cadherin	Hs01013953
Fibronectin	Hs00916107

Table 1 relative qPCR analysisに使用したプライマー.