

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月20日現在

機関番号：10101  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21592488  
 研究課題名（和文）インプラント埋入初期におけるオッセオインテグレーション獲得を阻害する原因の解明  
 研究課題名（英文）Investigation of the inhibitory factors for osseointegration in the early stage of the implantation.  
 研究代表者  
 堀内 留美 (HORIUCHI RUMI)  
 北海道大学・北海道大学病院・助教  
 研究者番号：10374274

研究成果の概要（和文）：本研究では、ラット大腿骨に埋入したチタンインプラント周囲組織の遺伝子変動について DNA マイクロアレイ法を用いて網羅的に解析し、オッセオインテグレーション獲得および非獲得ラットモデルにおける発現遺伝子の比較検討を行った。その結果、オッセオインテグレーションが獲得される場合には骨形成に関与する遺伝子が発現するが、オッセオインテグレーションを獲得できない場合には、多様な遺伝子が複雑に発現していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We comprehensively evaluated by whole genome microarray analysis for the variation of gene organization around titanium implants were implanted in the femur in rats, and we compared gene expression in a rat model of acquired and non-acquired osseointegration. This study suggested that the expression of genes may be involved in bone formation in the establishment of osseointegration, but that the various genes expressed in a complex were associated with failure of osseointegration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

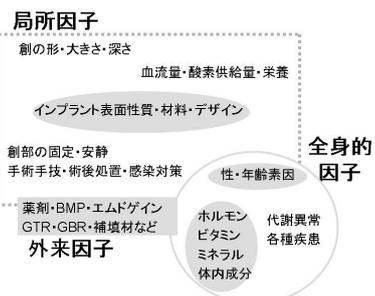
科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：オッセオインテグレーション、マイクロアレイ、チタンインプラント、Real time PCR

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療は、欠損補綴に対する有効な治療法の選択肢であり、現在では、100%に近い成功率を収めていることは周知である。しかし、インプラント臨床における問題点のうちいまだ解決されていないものがあり、数%のインプラント症例において、オッセオインテグレーションが獲得されず、その原因が判明しない場合がある。臨床において、初期治癒期間にインプラントと周囲骨の間に結合組織が侵入しオッセオインテグレーションが獲得されない場合、その経過においてイン

プラント体が骨と結合することは難しく、インプラント除去を検討することになる。初期治癒期間におけるインプラントの固定維



持は、臨床的成功を決定する要素であり、それに対しさまざまな臨床における検討や基礎

図1 オッセオインテグレーションを左右する因子  
 研究の報告がなされている。オッセオインテグレーションを左右する因子には図1のようなものがあり、複雑に絡み合っているとされる、その中に、インプラントの微小動揺に起因してインプラントと骨の間隙に結合組織が侵入するという報告があるが、多くは骨の growth factor について検索するもので、未だにそのメカニズムの解明には至っていない、

我々はこれまで、臨床における顎堤挙上を想定し、HAP および  $\beta$ -TCP といったリン酸カルシウム系セラミックスについて、その周囲の骨形成および吸収についての研究を行ってきた。その中の in vitro で評価の1手法として、DNA マイクロアレイを用いて、HAP および  $\beta$ -TCP ブロックをスキヤホールドとした場合の初期の骨形成過程の材料周囲においてどのような遺伝子が発現しているかについて解析し、その結果、初期の骨形成メカニズムを解明するうえで重要な示唆を得ている。

今回、我々は、オッセオインテグレーション成立初期において、骨とインプラント体が直接接することなく、両者間に結合組織が侵入する場合には、特定の遺伝子セットが影響を与えるという仮説を立て、ラット大腿骨に埋入したチタンインプラントモデルについて、DNA マイクロアレイ法を用いた網羅的な遺伝子解析を考案した。

## 2. 研究の目的

本研究では、インプラントの微小動揺によるオッセオインテグレーション阻害機構を遺伝子レベルで解明することを目的として、ラット大腿骨に埋入したチタンインプラント周囲組織の遺伝子変動について DNA マイクロアレイ法を用いて網羅的に解析し、オッセオインテグレーション獲得および非獲得ラットモデルにおける発現遺伝子の比較検討を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 予備実験：インプラントモデルの設定  
 材料：99.5% チタン線 ( $\phi$ 0.8~1.0mm を 0.05mm おきに5種類 ( $\phi$ 0.8, 0.85, 0.9, 0.95, 1.0mm) 用意)

方法：予備実験として、雄性 Fisher 系ラット大腿骨に形成した  $\phi$ 1.0mm のインプラント窩に直径の異なるチタン線を埋入し、埋入後2週にインプラント体周囲の光顕観察を行った。2週後の光顕像では、 $\phi$ 1.0mm 群ではインプラント体のほぼ全周が骨組織で囲まれているのを認め、 $\phi$ 0.8mm 群では全周に線維性結合組織が認められたため、前者 ( $\phi$ 1.0mm 群) をオッセオインテグレーション獲得モデル (OI 群)、後者 ( $\phi$ 0.8mm 群) をオッセオインテグレーション非獲得モデル (DI 群) に設定した。

実験モデルの模式図を図2に示す。

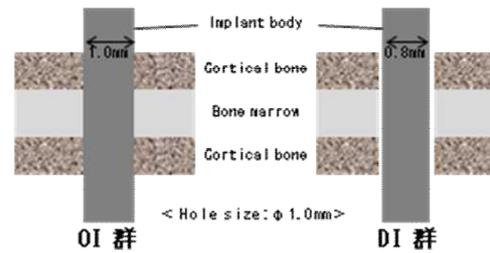


図2 チタンインプラントモデル

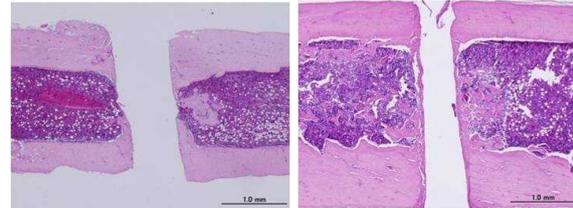


図3 2週後の HE 染色像

## (2) 方法

### ①インプラントモデルの製作

材料：99.5% チタン線 ( $\phi$ 0.8mm および  $\phi$ 1.0mm)

方法：雄性 Fisher 系ラット (22 週齢) 左側大腿骨に  $\phi$ 1.0mm のインプラント窩を2つつ形成し、グループごとに条件を変えたチタン線を埋入した。

- OI 群： $\phi$ 1.0mm チタン線を埋入 (n=5)
- DI 群： $\phi$ 0.8mm チタン線を埋入 (n=5)
- control 群：大腿骨骨膜剥離のみ (n=5)

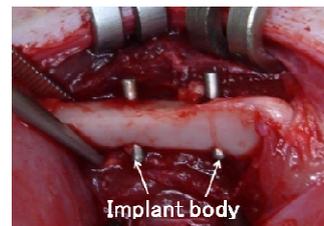


図4 インプラント体の埋入

### ②光顕による観察

埋入1週後にインプラント周囲組織を取り出し、組織像を観察した。

### ③total RNA 用組織の摘出

埋入1週後にインプラント周囲組織を取り出し、図5のようにインプラント体および周囲の骨髄組織を回収した。

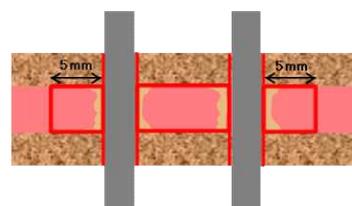


図5 回収する組織の部位  
回収した組織は、DNA マイクロアレイ解析および Real time PCR 解析に用いた。

### (3) DNA マイクロアレイ解析

#### ①total RNA の抽出

RNeasy Micro Kit(QIAGEN 社製)を用いて、インプラント周囲組織から TRI<sup>®</sup> reagent(SIGMA-ALDRICH)を用いて抽出したそれぞれの RNA 画分から total RNA を精製した。total RNA を、バイオアナライザー(Agilent Technologies), ND-1000 分光光度計(Nano Drop 社製)を用いてサンプルの精度、濃度を確認した。各群内5サンプルのうちで純度、濃度の良好な4サンプルを選択し、蛍光標識 cRNA の調製をした。

#### ②DNA マイクロアレイ解析

それぞれの cRNA を、Whole Rat Genome オリゴ DNA マイクロアレイ (4×44K) (Agilent Technologies) に対してハイブリダイズし、蛍光スキャナーにより蛍光強度の測定を行った。得られた結果を Gene Spring GX11.5 (Agilent Technologies) を用いて、オッセオインテグレーション成立初期に発現する遺伝子について解析を行った。

両群それぞれについて control 群に対し高い発現率を示した遺伝子については、多重比較補正 (Benjamini Hochberg FDR) ( $p < 0.05$ ) を行った。

### (4) Real time PCR 解析

#### ①cDNA の合成

One step SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>®</sup> PLUS RT-PCR Kit(Perfect Real Time, TAKARA)を用いて、マイクロアレイ解析に用いたのと同じ total RNA からそれぞれの cDNA を合成した。

#### ②Real time PCR 解析

マイクロアレイ解析で顕著な発現差異を認めた遺伝子に関して、SYBR<sup>®</sup>-Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus, TAKARA)を用いて Real time PCRによる相対定量 (ddCt 法)を行った。標準化には 18S rRNA を用いた。

## 4. 研究成果

インプラントモデルの埋入1週後のインプラント周囲組織の光顕像 (HE 染色) は、図6に示すように、OI 群および DI 群においてもインプラント近傍の骨髄組織部には、幼弱な結合組織を中心とした像が認められ、2つの群の間に大きな差は確認されなかった。ただし、皮質骨部位においては、OI 群ではインプラント体と骨が接していることが認めら

れたが、DI 群では線維性結合組織を介在してインプラントと骨が接していた。

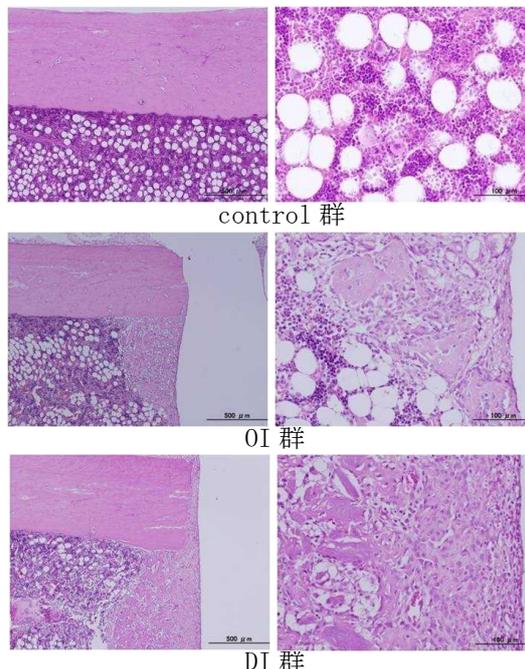
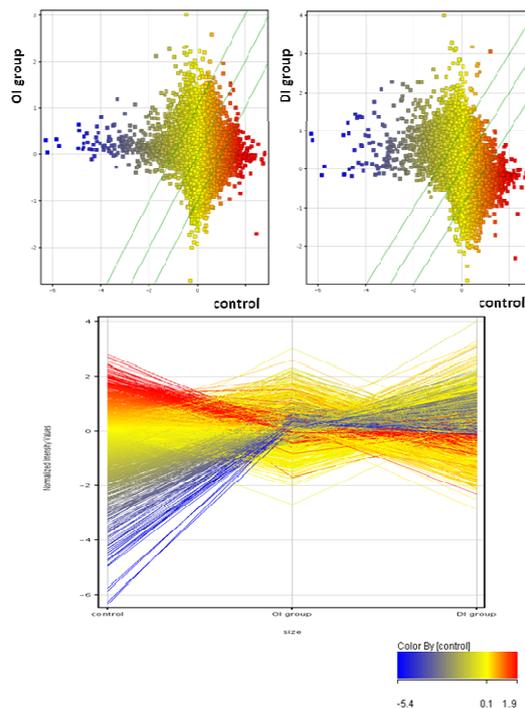


図6 埋入1週後の組織像

マイクロアレイ解析より、インプラント周囲に見られる4万個あまりの遺伝子の中で、両群それぞれについてコントロール群に対し高い発現率を示した遺伝子について多重比較補正 (Benjamini Hochberg FDR) を行ったところ、OI 群特有に発現している遺伝子は638個、DI 群特有に発現している遺伝子は381個、両群共通に発現している遺伝子は155個確認された。



#### 図7 Internal validation of microarray

OI 群特有に発現している遺伝子のうちコントロール群と顕著な発現差異を示したものには, Spp1, Thbs2, Dmp1, Dkk1 などの骨形成に關与する遺伝子が含まれていた. これらについて Real time PCR による相対定量を行ったところ, マイクロアレイと同様の傾向が確認された. 一方, DI 群特有に発現している遺伝子のうちコントロール群と顕著な発現差異を示したものに, Clqtnf3, Gabre, Myh1 などが認められたが, その変動量は個体差が大きく一様ではないことが考えられた.

この結果から, オッセオインテグレーションが獲得される場合には骨形成に關与する遺伝子が発現するが, オッセオインテグレーションを獲得できない場合には, 多様な遺伝子が複雑に発現していることが示唆された.

今回の実際的なモデルで行うマイクロアレイを用いた遺伝子レベルでの検索とあわせ, 検索した遺伝子について, in vitro, in vivo における生物実験での整合性を図ることにより, 臨床のインプラント治療の予知性の向上に役立つ事が考えられる.

この研究により, 基礎医学的根拠のあるインプラントを成功させる因子を同定し, そのデータを基にこの因子を臨床のインプラント治療に反映することが可能になる. インプラント周囲に結合組織が侵入する場合に影響を与える特定の遺伝子が判明すれば, 優れた初期固定を達成するのに役立つことが可能であろう. また, その遺伝子セットを応用する事により, 臨床的に厳しい状況においても, 周囲組織のオッセオインテグレーションが促進され, 確実な固定が達成されるため, インプラント治療の予知性は向上するであろう. また, いままで困難とされていた症例や即時負荷を要する症例に応用することも考えられ, インプラント治療のよりいっそうの向上へとつながるであろう.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計0件)

〔学会発表〕 (計2件)

- ①堀内留美、他、チタンインプラントにおけるオッセオインテグレーション獲得に関する遺伝子の網羅的解析、歯科チタン学会、2012年2月19日、愛知学院大学歯学部(名古屋市)
- ②堀内留美、他、オッセオインテグレーション獲得および非獲得ラットモデルにおける

遺伝子の網羅的解析、日本バイオマテリアル学会、2011年11月21日、京都テルサ(京都府)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

堀内 留美 (HORIUCHI RUMI)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号: 10374274

##### (2) 研究分担者

横山 敦郎 (YOKOYAMA ATSURO)  
北海道大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 20210627

山本 悟 (YAMAMOTO SATORU)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号: 10344524

堀内 正隆 (HORIUCHI MSASATAKA)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教  
研究者番号: 90322825

##### (3) 連携研究者

なし