

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06777

研究課題名(和文) 骨再生時のメカニカルストレスに対する歯槽骨の形態的变化の解明

研究課題名(英文) The study on correlation between mechanical stress and morphological change of alveolar bone during bone regeneration

研究代表者

新井 祐貴 (ARAI, Yuki)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70778654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまでRANKL結合ペプチドが、BMP-2との局所投与により歯槽骨に対して骨形成促進効果を持つことを示してきた。一方、骨組織は機械的刺激に対する感受性が高いが、骨再生中の顎堤に対するメカニカルストレスの影響は明らかになっていない。本研究は歯槽骨に対しRANKL結合ペプチドによる骨増生を行い、メカニカルストレスの変化が骨再生中の歯槽骨に与える形態的变化を明らかにすることを目的とした。そこで、過剰咬合モデルマウスとBMP併用RANKL結合ペプチドを用い、メカニカルストレスの骨増生への影響を検討した。その結果、新生骨の骨密度は過剰な咬合によるメカニカルストレスで有意な増加を示した。

研究成果の概要(英文)：We have shown that RANKL-binding peptide has osteogenetic effect on alveolar bone by local administration with BMP-2. On the other hand, it is not clear whether mechanical stress influence morphological changes on alveolar bone during bone regeneration. In this study, we aimed to clarify the effect of mechanical stress by hyperocclusion on bone regeneration of alveolar bone. We investigated the effect of mechanical stress on the bone regeneration beside of the mice maxillary molar, using hyperocclusion mice model and RANKL binding peptide with BMP-2. In radiological and histological analysis, bone mineral density increased significantly with mechanical stress due to hyperocclusion.

研究分野：歯学・補綴系歯学

キーワード：歯槽骨再生 RANKL結合ペプチド BMP-2 メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

進行したう蝕や歯周病による歯の抜歯は、抜歯後に歯槽骨の三次元的な吸収を引き起こし、結果として顎堤の減少となる。顎堤の減少は、抜歯後に行う可撤性義歯やインプラント等の補綴治療の予後不良因子となり、咀嚼力低下や審美的問題をしばしば引き起こす。そのため、抜歯後の歯槽骨を維持する方法とその診査・診断が臨床の現場において強く望まれている。

局所の骨再生において、bone morphogenetic protein (BMP)-2 は高い骨形成能を有する成長因子であるが、高用量の使用では炎症や浮腫等の副作用の問題がある。receptor activator of nuclear factor Kappa-B ligand (RANKL) 結合ペプチドと BMP-2 を併用することで、BMP-2 の併用量を減らし、抜歯窩内部に多くの新生骨形成効果を持つことを示し、その周囲の顎堤の吸収を抑えることを明らかにした。

一方、顎堤における力学的刺激（メカニカルストレス）は、顎堤の骨形成と骨吸収に関与していることがこれまでに明らかとなっていることから（Suzuki et al. Biomech Model Mechanobiol 2015）、これらの周囲顎堤の変化は咬合を介したメカニカルストレスによるものである可能性が高い。しかし、メカニカルストレスが骨再生中の顎堤に形態的变化を及ぼすかどうかは明らかになっておらず、これを解明し、顎堤に対して適切なメカニカルストレスの付与が可能となれば、今後臨床において顎堤の予後を診査・診断する上で新たな戦略になると考えた。そこで本研究では、メカニカルストレスの分布を μ CT 撮影像から解析し（Fujiki et al. Biomech Model Mechanobiol 2013）、メカニカルストレスが骨再生中の顎堤に与える形態的变化を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は、歯槽骨に対し RANKL 結合ペプチドによる骨増生を行い、同時に過剰な咬合力を加えることで、メカニカルストレスの分布の変化が骨再生中の顎堤に与える形態的变化を明らかにすることである。最終的には、顎堤に対して適切なメカニカルストレスの診査・診断が可能となれば、臨床において再生した骨の維持のための一つの方法として応用することができる。そのため、以下の2つの目的を立てた。

- (1) BMP-2 および RANKL 結合ペプチドの併用によるマウス上顎骨増生法の確立すること
- (2) 骨増生に対し、過剰咬合が及ぼす新生骨形成への影響を明らかにすること

3. 研究の方法

(1) RANKL 結合ペプチドと BMP-2 による歯槽骨増生モデルマウスの作成

実験には C57BL6/J マウスを用いた。RANKL 結合ペプチドの足場材として、徐放性のあるゼラチンハイドロゲルを使用した。ゼラチンハイドロゲルの形状には粒子状で注射可能なもの（Uehara et al. J Dent Res 2016）とシート状のもの（Kimura et al. J Oral Maxillofac Surg 2015）とがあるため、どちらが上顎骨頰側への骨増生に適するかを検討した。麻酔下でマウスの上顎第一臼歯頰側歯肉に注射もしくは切開し、RANKL 結合ペプチドである OP3-4 と BMP-2 とを含浸させた上記ゼラチンハイドロゲルを埋入し、それぞれの新生骨形成を μ CT 再構築像にて比較した。

(2) 咬合を介したメカニカルストレスの変化が及ぼす骨増生への影響の検討

マウス臼歯咬合面にワイヤーを付与した過剰咬合モデルを用いた（Goto et al. J Dent Res 2011）。麻酔下でマウスの下顎右側大臼歯咬合面に、直径 0.3mm のワイヤーを接着させた（図 1）。接着には、MMA 系レジンセメント（スーパーボンド、サンメディカル）を用いた。ワイヤーはサンドブラスト処理し、歯面は、10 秒エッチング処理を行った。その後水洗・乾燥し、3 臼歯の咬合面にワイヤーを接着させた。これと同時に、左右両側の上顎骨頰側に(1)で検討した骨増生を行った。右側を過剰咬合側とし、ワイヤーをつけていない左側の臼歯部は咬合することができないため、非咬合側として比較した。骨増生期間は 2 週間とした。この期間の間、骨形成マーカーとして蛍光色素（カルセイン、アリザリン、デメクロサイクリン）の皮下注射をそれぞれ 1 度ずつ計 3 回行った。



図 1. 過剰咬合モデルとして用いたマウス顎骨と接着したワイヤー（ μ CT 再構築像）

(3) X線学的解析および組織学的解析

X線学的解析として、 μ CTの再構築像にて新生骨の観察、pQCTによる骨密度の解析を行った。また、凍結切片により顎骨標本を作成し、各々の組織切片を用い、von kossa染色による石灰化組織の観察、TRAP染色による破骨細胞出現の確認、蛍光ラベリングによる骨形成の速度や局在性も含め検討を行った。

4. 研究成果

(1) マウス上顎骨増生法

RANKL結合ペプチドの足場材となるゼラチンハイドロゲルの形状による骨増生法の検討を行った結果、 μ CT再構築像よりどちらの足場材の上顎臼歯部頰側に海綿骨様の新生骨が認められ、BMP-2とOP3-4はマウス上顎歯槽骨の骨増生においても有効であることが明らかとなった。しかしながら、粒子状の足場材の場合、歯槽骨頰側にうまく留まることができず軟組織内に拡散している様子が確認された。一方で、シート状の足場材では歯槽骨に沿った新生骨の増生を示しており、歯槽骨からのメカニカルストレスの影響を観察するために適切であり、過剰咬合モデルマウスに対しても同様の方法で行うこととした。

(2) 過剰咬合モデルマウスに対する歯槽骨増生作用の検討

μ CT再構築像より、両側ともに上顎臼歯部頰側に海綿骨様の新生骨が認められた。一方で、過剰な咬合によるメカニカルストレスを与えた右側の過剰咬合側は、左側の非咬合側よりも多くの明瞭な海綿骨様構造が現れていた(図2)。

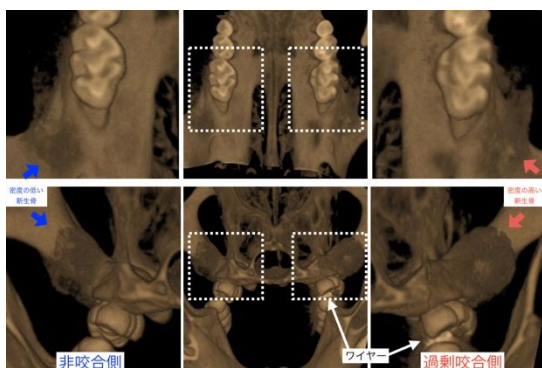


図2. 骨新生後の μ CT再構築像

より詳細に新生骨を解析するためにpQCTを用いた。上顎歯槽骨の母骨と新生骨を区別

するために骨密度が $690\text{mg}/\text{cm}^3$ 以下を新生骨として骨密度を解析したところ、上顎骨頰側の新生骨骨密度は過剰咬合側において非咬合側と比べ有意に高かった(図3)。

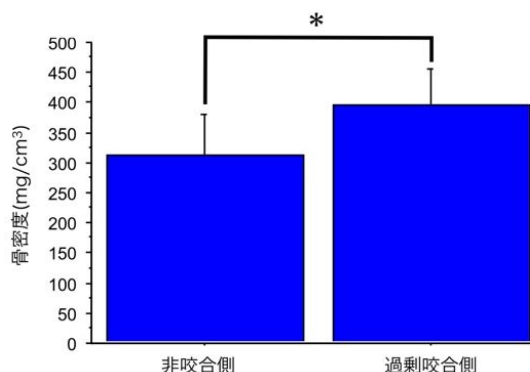
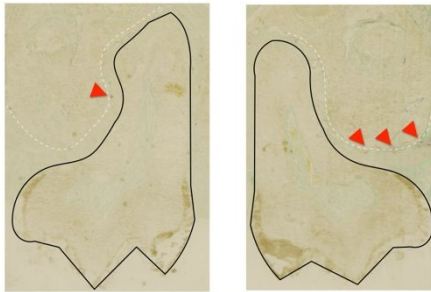


図3. メカニカルストレスの有無による新生骨骨密度の比較

組織学的解析では、von Kossa染色の結果、過剰咬合側には多くの石灰化した骨が認められ、X線学的解析と同様の所見であった。蛍光ラベリングの結果、アリザリンにラベルされた頰側骨の根尖側の部位では、過剰咬合側で広いラベルが観察され、5日目での顕著な骨形成活性が示された。そのため、この部位を中心に咬合を介したメカニカルストレスが周囲歯槽骨の骨形成に影響を与えたことが示唆された。また、TRAP染色にて、歯根分岐部周囲の歯根膜上のTRAP陽性細胞を観察したところ、過剰咬合側において破骨細胞が出現していた(図4)。これは、過剰咬合によるメカニカルストレスの影響により、歯根分岐部に破骨細胞が出現するという報告と一致しており、本研究においても過剰咬合モデルによるメカニカルストレスが関与したことを明らかにすると考えられる。一方で、過剰咬合モデルマウスに対する7日間の観察報告によると、歯根分岐部の破骨細胞出現は、メカニカルストレスの作用開始後4日目に最大となり、その後減少していくとされるが、本研究においては14日目にも破骨細胞の出現が認められた。このことは、歯槽骨の増生により、メカニカルストレスの分布が変化し、長期に渡って歯槽骨のリモデリングが起こっている可能性が推察される。

以上の結果から、過剰な咬合を介した歯槽骨へのメカニカルストレスの変化が、歯槽骨の骨増生における新生骨形成を促進することが示唆された。



過剰咬合により根分岐部に破骨細胞が出現している
 咬合の喪失 過剰な咬合
 図4．歯根分岐部の破骨細胞出現

5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Yuki Arai, Kazuhiro Aoki, Yasuhiro Shimizu, Yasuhiko Tabata, Takashi Ono, Ramachandran Murali, Setsuko Mise-Omata, Noriyuki Wakabayashi. Peptide-induced de novo bone formation after tooth extraction prevents alveolar bone loss in a murine tooth extraction model. *Eur. J. Pharmacol.* (査読あり) 2016.07; 782 89-97. (DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.04.049)

〔学会発表〕(計4件)

田村 幸彦、上原 智己、宮新 美智世、新井 祐貴、若林 則幸、青木 和広. 歯髄内に誘導されたメタロチオネインについて. 第44回日本毒性学会学術年会 2017.07.10 パシフィコ横浜 会議センター(横浜)

小川 実穂、小柳 達郎、竹内 康雄、片桐 さやか、井川 貴博、竹内 祥吾、関内 孝侑、新井 祐貴、風間 龍之輔、若林 則幸、和泉 雄一. 口蓋粘膜の計測におけるCBCTの有用性. 日本歯科保存学会学術大会 秋季大会 145回 2016.10.27 キッセイ文化センター(長野県)

Yuki Arai, Kazuhiro Aoki, Noriyuki Wakabayashi. Peptide-induced de novo bone formation after tooth extraction prevents alveolar bone loss in a murine tooth extraction model. The 5th Tri-University Consortium on Oral Science and Education. 27-28 October 2016. Peking University (in China)

新井 祐貴、青木 和広、清水 康広、田村 幸彦、小野 卓史、三瀬 節子、Ramachandran Murali、若林 則幸. ペプチ

ドが誘導する抜歯後の新生骨形成および歯槽骨保護 BMP-2 誘導マウス抜歯窩骨新生モデルによる検証研究. 第36回日本骨形態計測学会 2016.06.25 朱鷺メッセ(新潟)

〔その他〕

ホームページ等

http://reins.tmd.ac.jp/html/100008221_ja.html?k=新井祐貴

6．研究組織

(1)研究代表者

新井 祐貴 (ARAI, Yuki)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70778654