

令和元年6月7日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11585

研究課題名(和文)非感染性に惹起されるインプラント周囲骨吸収病態の分子生物学的探索

研究課題名(英文)Molecular biological search for non-infectiously induced peri-implant bone resorption

研究代表者

石橋 実 (Ishibashi, Minoru)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：40231138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：非感染性インプラント周囲骨吸収の動物実験モデルを確立し、その分子生物学的機構を探索することを目的とした。まず感染感受性の低いインプラント表面性状を同定するため、各種チタンディスク上で黄色ブドウ球菌株を培養した結果、マイクロ粗面に比べて、平滑面もしくはナノ粗面は感染感受性が少ないという知見を得た。

次に非感染性骨吸収と関連する酸化ストレスが骨治癒に与える影響を検証した。その結果、酸化ストレスにより間葉系幹細胞にアポトーシスや老化が誘導され、骨治癒が著しく阻害されること、抗酸化物質で間葉系幹細胞を処理すると、骨欠損に局所細胞移植後のアポトーシス誘導が抑制され、骨再生が著しく促進することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非感染性インプラント周囲骨吸収はインプラントの生存だけでなく、インプラント補綴の審美性や清掃性を損なうため、その術前診断と予防法の確立は重要な臨床的課題の一つである。本研究成果の学術的な特色は、インプラント周囲骨吸収病態解明研究上の障壁を的確に捉え、最新の細胞生物学的知見と組織学および分子生物学的解析を駆使して、未知であった非感染性インプラント周囲骨吸収の病態を探索し、重要な臨床的課題に解決の糸口を与えた点である。そのため、歯科補綴学の医学的レベルを向上させ、生体材料学ならびに分子細胞生物学の発展にも貢献し得る意義深い成果を得たと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study purposed to establish an animal experimental model of non-infectious peri-implant bone resorption and to explore its molecular biological mechanism. First, Staphylococcus aureus strains were cultured on various titanium disks to identify the implant surface property with low infection sensitivity. It was found that smooth surface or nano-rough surface had lower infection sensitivity than micro-rough surface. Next, the influences of oxidative stress associated with noninfectious bone resorption on bone healing were examined. As a result, oxidative stress induced apoptosis and senescence in mesenchymal stem cells and hence, significantly inhibited bone healing. In contrast, conditioning of mesenchymal stem cells with an antioxidant suppressed induction of apoptosis and promoted bone regeneration after cell local transplantation into a bone defect.

研究分野：クラウンブリッジ補綴学

キーワード：Occlusal Overloading Saucerization 破骨細胞 骨芽細胞 骨細胞 インプラント周囲組織 免疫染色 脱灰切片

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

インプラント補綴は必要不可欠な欠損補綴治療の一つであるが、荷重後のインプラント周囲骨吸収が臨床的問題となっている。インプラント周囲骨吸収には、細菌感染によるインプラント周囲炎だけでなく、Saucerization や Occlusal Overloading といった非感染性骨吸収の存在も報告されている。しかし、それらの病態は解明されていない。病態解明のためには、非感染性インプラント周囲骨吸収を生じた動物実験モデルでの分子生物学的解析が必要であるが、その手法論は未だ確立していない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、非感染性インプラント周囲骨吸収の動物実験モデルとインプラント埋入試料を用いた分子生物学的分析を可能とする組織切片作製法を確立し、非感染性インプラント周囲骨吸収の分子生物学的機構を探索することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 各種インプラントの表面性状が細菌付着性に与える影響

平成 28 年度は、使用するインプラントの表面性状が細菌付着性に与える影響を培養試験で検証した。平滑面(機械研磨面)とマイクロ粗面(酸処理面)、および細菌よりも細かい凹凸部を持つ実験的ナノ粗面のチタンディスク上で *Staphylococcus aureus* 209P 株および *Staphylococcus sanguis* ATCC 10556 株を Brain heart infusion 培養液中で培養した。

#### (2) 酸化ストレスの抑制が骨再生効果に与える影響

過荷重、特に圧縮力がインプラント周囲組織に加わった際に、骨細胞に酸化ストレスが加わり、アポトーシスが誘導されることに注目し、抗酸化物質の応用が骨組織の治癒に有効であるかどうかを検証した。ラット大腿骨から分離培養した MSC を、強力な抗酸化能をもつ小分子化合物であり、細胞内へ能動輸送された後に、細胞内抗酸化システムを担う主要な分子の一つであるグルタチオン(GSH)を増加させる N-acetyl-L-cysteine(NAC)で 6 時間処理した後に、過酸化水素水に 24 時間曝露させ、酸化ストレスや老化マーカーの発現を評価した。

さらに、NAC で前処理を行った骨髄 MSCs を含むコラーゲンスポンジをラット大腿骨皮質骨臨界サイズ骨欠損に自家局所移植し、組織学的観察およびマイクロ CT 解析により、移植細胞の生存と骨再生を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 各種インプラントの表面性状が細菌付着性に与える影響

Brain heart infusion 培養液中で *Staphylococcus aureus* 209P 株を 2 時間培養した結果、実験的ナノ粗面上の付着細菌数は平滑面およびマイクロ粗面上よりも少なかった。また、24 時間培養し 5 分間振とう後の残存細菌数を評価したところ、マイクロ粗面は平滑面よりも多かったが、実験的ナノ粗面は平滑面と同程度であった。振とう後の表面を走査型電子顕微鏡で観察すると、マイクロ粗面上では凹部に細菌が適合するように固着し凝集塊を形成していた。一方、実験的ナノ粗面上では、平滑面と同じように、表面上に少数のコロニーが点在しているだけであった。*Staphylococcus sanguis* ATCC 10556 株培養でも類似した結果が得られた。

この結果より、マウスモデルで骨結合が獲得でき、かつ、可及的に口腔内細菌が付着しないインプラント表面性状として、機械研磨面もしくはナノ粗面インプラントが第一選択であるという知見を得た。さらに、ラット口腔内に埋入するチタンミニインプラントの形状を決定し、その埋入術式の確立と骨結合の成立を確認した。また、各種表面処理が応用可能であることを確認した。

#### (2) 酸化ストレスの抑制が骨再生効果に与える影響

NAC で前処理した骨髄 MSC では、処理後 18 時間、細胞内 GSH レベルが 2 倍以上増加した状態で維持されるとともに、過酸化水素水への曝露により誘導される酸化ストレスやアポトーシス、老化マーカーの発現が抑制された。

組織学的解析の結果、未処理の骨髄 MSC では、大腿骨臨界サイズ骨欠損へ自家局所移植後に広汎なアポトーシス誘導および移植細胞の喪失が認められた。一方、NAC で前処理した骨髄 MSC は、移植後のアポトーシスを回避し、移植後 3 週間生存し続けることが示された。未処理の骨髄 MSC を移植した骨欠損では、新生骨組織は未成熟であり、骨欠損は閉鎖されなかった。一方、NAC で前処理した骨髄 MSC は、術後 3 週で骨欠損を成熟骨組織で完全に閉鎖させることが判明した。

以上の結果より、細胞の酸化ストレス抵抗性を向上させることにより、炎症により惹起されるアポトーシスに対する抵抗性が向上すること、またその結果、骨再生が著しく促進することが示された。

平成 28 年度から 30 年度にかけて行った細菌培養試験、細胞培養試験および動物実験により、非感染性骨吸収を分子生物学的に解析する小動物実験モデルに必要なインプラントのデザインや解析手法を確立することができた。また、過荷重により骨細胞にアポトーシスが引き起こされる可能性があり、抗酸化物質の応用がその解決の一助となる可能性が示された。本研究成果は、インプラント治療のみならず骨生物学に多大な貢献をすることが期待される。

### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 2 件)

1. Watanabe Jun, Yamada Masahiro, Niibe Kunimichi, Zhang Maolin, Kondo Takeru, Ishibashi Minoru, Egusa Hiroshi  
Preconditioning of bone marrow-derived mesenchymal stem cells with N-acetyl-L-cysteine enhances bone regeneration via reinforced resistance to oxidative stress, *Biomaterials*. 査読有、185: 25-38, 2018.  
doi:10.1016/j.biomaterials.2018.08.055
2. Yamada M, Egusa H.  
Current bone substitutes for implant dentistry.  
*J Prosthodont Res*, 査読有, 62(2): 152-161, 2018.  
doi: 10.1016/j.jpor.2017.08.010.

(学会発表)(計 4 件)

1. 山田将博、バイオメテックインプラントによる軟組織付着獲得への挑戦、第 48 回日本口腔インプラント学会(シンポジウム)、2018
2. Watanabe J, Yamada M, Egusa H, Redox biology-based strategy in bone regeneration for efficient transplantation of osteoblastic cells. to enhance bone regeneration. International meeting the 7th Temu Ilmiah Nasional and 4th Scientific Meeting in Dentistry, 2017.
3. 山田将博、インプラント表面性状の解釈とその骨結合能を推測する方法、平成29年度(公社)日本補綴歯科学会 東北・北海道支部学術大会(招待講演)、2017
4. Watanabe J, Yamada M, Egusa H. N-acetyl-L-cysteine Reinforces Apoptosis Resistance of MSCs to Promote Bone Regeneration. Hatton competition in Japanese Association for Dental Research 65th Annual Meeting, 2017.

(図書)(計 0 件)

(産業財産権)

○出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

(その他)

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 江草 宏

ローマ字氏名:(EGUSA, hiroshi)

所属研究機関名: 東北大学  
部局名: 大学院歯学研究科  
職名: 教授  
研究者番号(8桁): 30379078

(2)研究分担者

研究分担者氏名: 山田将博  
ローマ字氏名: (YAMADA, masahiro)  
所属研究機関名: 東北大学  
部局名: 大学院歯学研究科  
職名: 准教授  
研究者番号(8桁): 90549982

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名:  
ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。