

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11794

研究課題名（和文）オッセオインテグレーション関連因子を用いた新規インプラント周囲骨再生治療の開発

研究課題名（英文）Development of new peri-implant bone regeneration therapy using osseointegration related factors

研究代表者

堀内 留美（Horiuchi, Rumi）

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：10374274

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：インプラント周囲炎の進行により喪失したオッセオインテグレーションを再獲得し、周囲骨の再生を目指すのは、インプラント臨床において重要な課題である。我々は、これまでにインプラント埋入初期の微小動揺により変動する遺伝子を複数同定している。本研究では、これら変動の大きい遺伝子それぞれの翻訳産物の骨形成への影響について、まずはin vitroでの検証を行った。その結果、オッセオインテグレーション獲得群に有意に発現しているDmp1の添加はオッセオインテグレーションに影響を与えることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果に基づいて開発される医薬品は、学術的なエビデンスに基づいており、安全でより確実な次世代のインプラント治療へと発展的につながることが期待される。インプラント周囲炎の重症化で骨結合を喪失し、現在ならばインプラント体の除去を検討しなければならないような臨床的に厳しい状況においても、オッセオインテグレーションを再び獲得できるようになることが予想される。

研究成果の概要（英文）：It is an important issue in implant clinical practice to re-acquisition osseointegration lost due to the progression of peri-implantitis and to regenerate the surrounding bone. We have identified several genes that fluctuate due to micro-agitation in the early stages of implant placement. In this study, the effects of translation products of each of these variable genes on bone formation were verified in vitro. As a result, it was suggested that the addition of Dmp1, which is significantly expressed in the osseointegration acquired group, affects the osseointegration.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：オッセオインテグレーション

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラント治療の恩恵を受ける患者は年々増加し、35歳以上の2.3%がインプラント治療を受けるまでに普及している。その一方で、臨床においてはそのトラブルや合併症に苦慮する場面も増えている。

合併症の一つであるインプラント周囲炎は比較的高い罹患率(患者単位で約19-56%)を示すが、その初期症状は見逃されやすく、重症化するまでの自覚症状も少ない。しかも重症化した場合の適切な治療方法は確立されておらず、その進行を止めることも困難である。インプラント周囲の構造は天然歯の歯周組織とは異なり、消炎しても、周囲支持骨の吸収が生じてオッセオインテグレーションを徐々に失ってしまうため、骨との接触を回復することは現状では不可能である。インプラント周囲炎が重症化した場合、骨結合の喪失は不可逆的に進行するので、インプラント周囲の支持骨を失うと、罹患インプラントの撤去や再手術を選択する場合も少なくない。オッセオインテグレーション喪失への対応はインプラント治療の大きな課題であり、世界的にみても今後のさらなる基礎および臨床研究が必須である。

申請者らは、これまで、埋入初期治療期間におけるインプラントの微小動揺と骨結合との関係に視点をおき、未だに詳細が明らかでないオッセオインテグレーションの分子レベルでのメカニズムについて研究を進めてきた。その結果、インプラントの微小動揺時に発現する特定の遺伝子セットが、オッセオインテグレーション獲得と強い相関をもっていることを見出し、以下のようなプレリミナリーな結果を得ている。(H24~26年科研費 基盤研究(C))

ラットを用いたチタンインプラントモデルにおける、インプラント埋入1週後の発現遺伝子の網羅的解析では、オッセオインテグレーションが獲得されたモデルでは、Dmp1のように骨形成と関連することがすでに報告されている遺伝子が高発現していた。一方、非獲得モデルにおいては骨形成との関連がまだに報告されていない遺伝子の発現が認められた。

2. 研究の目的

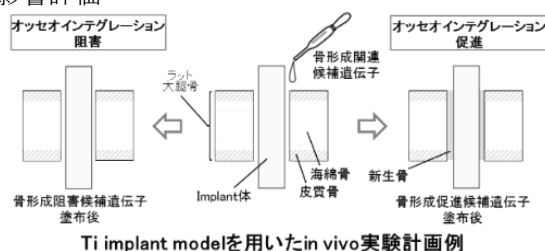
本研究の目的は、インプラント治療における確実なオッセオインテグレーションを獲得するために、遺伝子発現情報に基づいた革新的な治療法を開発することである。

申請者らは、これまでにインプラント埋入初期の微小動揺によって変動する遺伝子を複数同定している。本研究では、これら変動の大きい遺伝子それぞれの翻訳産物の骨形成への影響を *in vitro* および *in vivo* にて検証する。そして、オッセオインテグレーション阻害因子を抑制する薬剤等を探索し、患部に投与することによって、インプラント周囲炎の進行により喪失したオッセオインテグレーションを再獲得し、インプラント周囲骨の再生を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 組換えオッセオインテグレーション関連タンパク質の生産系の開発
- (2) 培養細胞を用いた *in vitro* 実験系における、オッセオインテグレーション関連タンパク質による骨形成能への影響評価
- (3) ラットインプラントモデルを用いた *in vivo* 実験(下図)における、オッセオインテグレーション関連タンパク質による骨形成能への影響評価

まず本研究では、これら変動の大きい遺伝子それぞれの翻訳産物が骨形成に及ぼす影響を *in vitro* にて検証することを目的とした。



4. 研究成果

インプラントモデルの製作

材料：99.5%チタン線(φ1.0mm & φ0.8mm)

方法：雄性 Fisher 系ラット(22週齢)左側大腿骨にφ1.0mmのインプラント窩を形成

- ・オッセオインテグレーション獲得モデル OI群：φ1.0mmチタン線を埋入
- ・オッセオインテグレーション非獲得モデル DI群：φ0.8mmチタン線を埋入
- ・control群：大腿骨骨膜剥離のみ

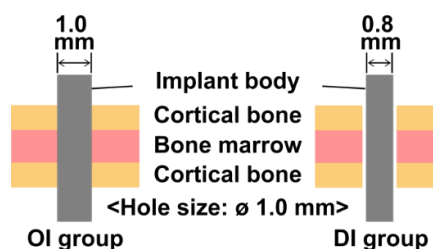
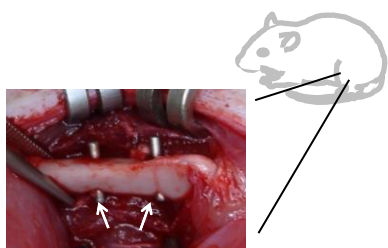


Fig.1 Image after insertion of implant

Fig.2 Ti implant model OI group and DI group

埋入1週後にインプラント周囲組織を取り出し、顕微鏡による観察 (Fig. 3) を行い、インプラント体および周囲の骨髄組織を total RNA 用として回収した。

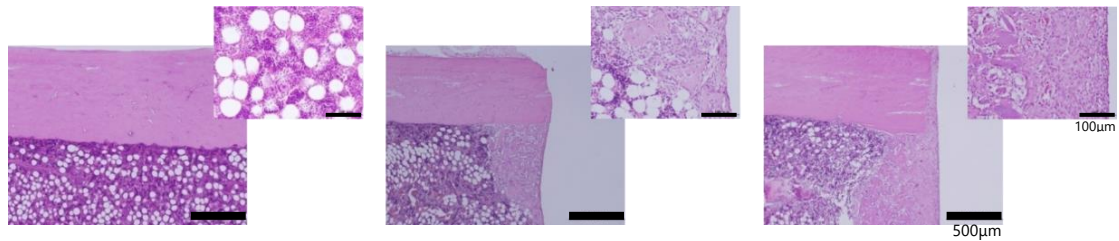


Fig.3 Control group(1w)

OI group(1w)

DI group(1w)

DNA マイクロアレイ解析

RNeasy Micro Kit (QIAGEN) を用いて、インプラント周囲組織から精製した total RNA を、バイオアナライザー (Agilent), ND-1000 分光光度計 (Nano Drop) を用いてサンプルの精度、濃度を確認した。

それぞれの cRNA を、Whole Rat Genome オリゴ DNA マイクロアレイ (4×44K) (Agilent) 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。得られた結果は、NIMES 分子・物質プラットフォームに委託し、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以下に示す。(Table. 1 および 2)

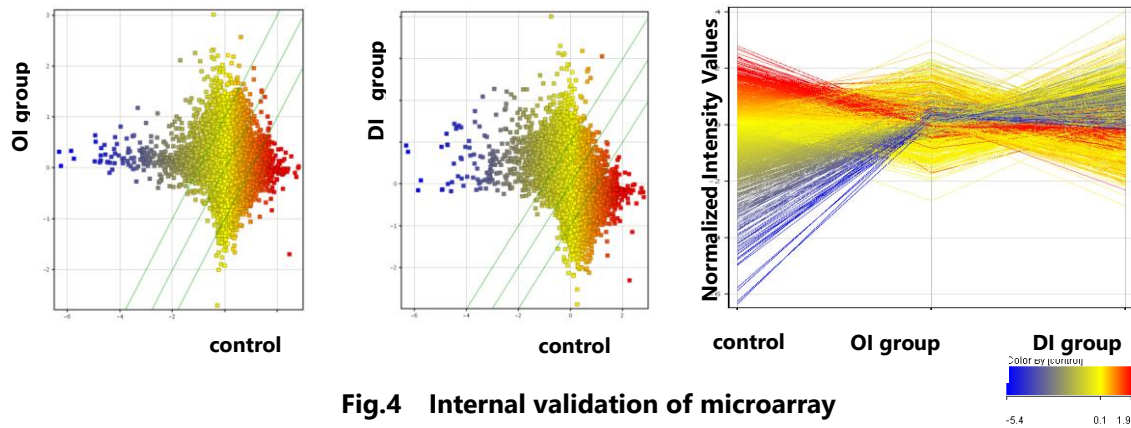


Fig.4 Internal validation of microarray

Table.1 Upregulated genes in OI group vs control

: Extracellular region or secreted

* : Bone formation or resorption-related genes

GeneName	OI/control	Description
Dmp1 *	3.662	dentin matrix acidic phosphoprotein 1
Plekhh1	3.247	pleckstrin homology domain containing, family H member 1
Serpina3c	3.234	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 3C
Omd *	3.182	osteomodulin
Gpnmb	3.078	glycoprotein (transmembrane) nmb

Table.2 Upregulated genes in DI group vs control

: Extracellular region or secreted

GeneName	DI/control	Description
Slc27a5	3.503	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 5
Bpifa5	3.456	BPI fold containing family A, member 5
Nov	3.216	nephroblastoma overexpressed
Thbs3	3.190	thrombospondin 3
Tpbp	3.071	trophoblast glycoprotein

本研究では、将来の臨床での使用を考慮して、解析結果から得たオッセオインテグレーション関連遺伝子群のうち、外部からの投与あるいは薬剤による阻害が容易と考えられる分泌型タンパク質に着目し、これらのタンパク質によるオッセオインテグレーションへの効果を検証することとした。今回は特に OI/control 値の高い Dmp1 と DI/control 値の高い Bpifa5 について、*in vitro* における検証を行うこととした。

RT-PCR

OI および DI ラットにおいて、実際に Dmp1 および Bpifa5 が発現しているかどうか確認するために、それぞれの特異的プライマーを使用して、RT-PCR を行った。その結果、Dmp1 および Bpifa5 を示す増幅バンドを確認することができた。(Fig. 5)

Lane M : DNA mass ladder
 Lane 1 : rDmp1 (* 1470 bp) amplified from the OI total RNA
 Lane 2 : rBpifa5 (** 813 bp) amplified from the DI total RNA

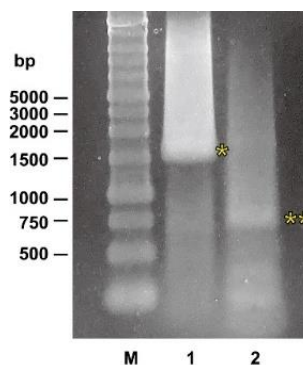


Fig.5 RT-PCR products of rDmp1 and rBpifa5

タンパク質生産系の構築

in vitro および *in vivo* における添加実験に向け、ラット Dmp1 組換えタンパク質の分泌生産系を構築した。

(1) 組換えタンパク質のデザイン

遺伝子配列情報より、ラット Dmp1 は野生型の分泌シグナルをアミノ末端に含んでいた。組換えタンパク質の生産にあたり、分泌効率向上のために、人工分泌シグナル配列である Secrecon-AA (Güler-Gane et al., 2016) を野生型の分泌シグナルと入れ替えた。また、C 末端には、金属アフィニティークロマトグラフィー精製のポリヒスチジンタグ (His-tag) を付加した。このコンストラクトを、プラスミド pcDNA6.1 の CMV プロモーターの下流に挿入し、動物細胞用の発現プラスミドを構築した。(Fig. 6)

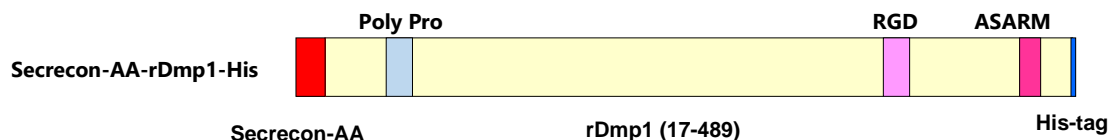


Fig.6 Schematic representation of Secrecon-AA-rDmp1-His protein

(2) rDmp1-His の発現およびアフィニティー精製

発現プラスミド pcDNA6.1-Screcon-AA-rDmp1-His を、ExpiFectamine™293 Transfection Kit (Gibco) を用いてヒト Expi293F 細胞にトランスフェクションし、37°C, 8%CO₂, 115rpm で 7 日間培養した。この培養上清に金属アフィニティークロマトグラフィー担体 TALON (Clontech) を添加し、目的の rDmp1-His タンパク質をアフィニティー精製した。得られた rDmp1-His タンパク質は、遠心限外ろ過フィルターを用いて Hank's 平衡塩溶液 (HBSS) へバッファー交換し、0.2µm フィルターにより滅菌後、4°C で保存した。(Fig. 7)

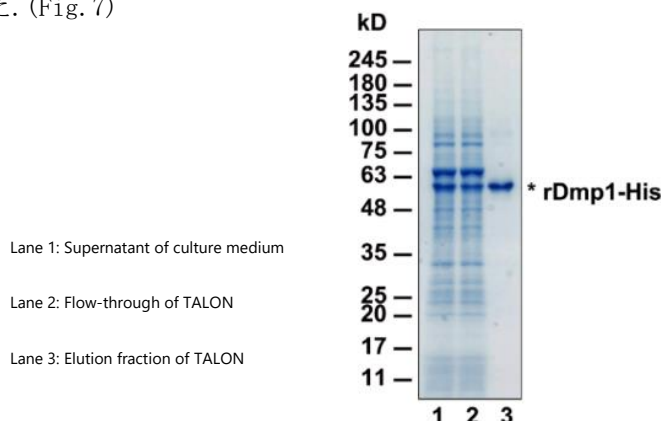


Fig.7 SDS-PAGE analysis of Metal-chelate affinity purification for rDmp1-His protein

チタン上の細胞に Dmp1 が及ぼす影響

チタンディスク上に播種したラット骨肉腫細胞 UMR-106 に rDmp1-His を添加した際の、細胞増殖および細胞形態に及ぼす影響を観察した。

まず、直径 9 mm のチタンディスク 1 枚あたり 6.4×10^2 個の UMR-106 細胞を播種し、rDmp1-His を 0, 0.1 および $1 \mu\text{M}$ となるように培地に添加した。37°C, 5% CO_2 で 3 日間培養したところで、同濃度の rDmp1-His を含む新たな培地にそれぞれ交換し、さらに 2 日間培養した。各濃度のチタンディスクをトリプシン処理し、細胞数を計測した。(Table. 3)

また、チタンディスクに付着したままの UMR-106 細胞に対し、0.1% パラホルムアミドによる細胞の固定および 0.1% Triton X-100 による透過処理を行い、Alexa Fluor™ 568-Phalloidin および DAPI でアクチンと核をそれぞれ染色し、蛍光顕微鏡を用い細胞形態を観察した。(Fig. 8)

(1) Dmp1 の各濃度におけるチタンディスク上の細胞数

Dmp1 濃度の違いによるチタンディスク上の細胞数は、0. $1 \mu\text{M}$ で一旦増加したが、 $1 \mu\text{M}$ では減少することがわかった。

Table.3 Average number of cells on titanium surface

rDmp1-His濃度 (μM)	0	0.1	1
チタンディスク1枚あたりの平均細胞数 (n=3)	180	285	175

(2) Dmp1 の各濃度におけるチタンディスク上の細胞形態の変化

Dmp1 の添加濃度が 0. $1 \mu\text{M}$ では、細胞は上方に盛り上がり増殖した。Dmp1 濃度が $1 \mu\text{M}$ では、細胞は扁平化し、付着面積が広がった。

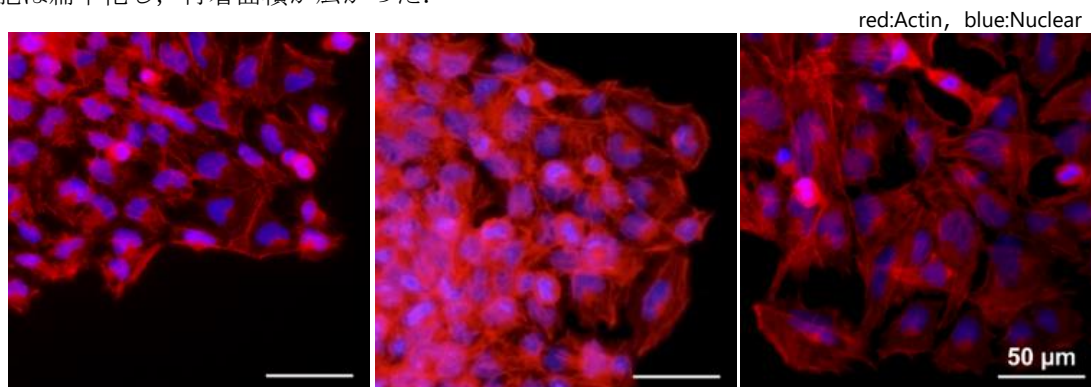


Fig.8 0 μM Dmp1

0.1 μM Dmp1

1 μM Dmp1

結論

Dmp1 の添加は、骨芽細胞様細胞の増殖および細胞形態に影響を与えることが示された。このことが、チタンディスクへの付着を向上させる可能性を示した。今後は、Bpifa5 による影響について、検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀内留美、堀内正隆、横山敦郎
2. 発表標題 オッセオインテグレーション関連因子を用いた新規インプラント周囲骨再生治療の開発
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	横山 敦郎 (Yokoyama Atsuro) (20210627)	北海道大学・歯学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	堀内 正隆 (Horiuchi Masataka) (90322825)	北海道医療大学・薬学部・准教授 (30110)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------