

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11818

研究課題名(和文) 糖尿病患者のインプラント周囲炎を見据えた先制歯科医療戦略の構築

研究課題名(英文) Strategy Foundation of Preemptive medicine for peri-implantitis of patients with diabetes mellitus

研究代表者

梅田 誠 (UMEDA, Makoto)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：90193937

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)：申請者らはインプラント周囲組織の再生を見据え、LED照射のヒト骨髄間葉細胞(BMMC)の増殖能や硬組織分化能への影響を検討した。高出力赤色LEDはBMMCの増殖と硬組織分化を促進しWnt/beta-catenin経路を介することが認められ、骨再生の新たな医療デバイスとして有効と示唆される。抗酸化剤のビタミンE(VE)は様々な代謝システムに参与しているが、2型糖尿病(DM)由来BMMCへのVEの影響の報告は少ない。異なるVE濃度でBMMCの増殖、H2O2活性および炎症性サイトカイン産生について測定し、alpha-トコフェロールの欠乏はDM患者などの硬組織修復に役立つ可能性について示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の骨結合型インプラントは初めての症例が行われて約50年が経過している。そのなかで糖尿病を中心とした生活習慣病も今般の食生活の変化に応じて多くの患者が罹患されている。そのような患者がインプラントを過去に埋入されて悪化した症例や、その全身疾患のためにインプラント補綴が不可能な症例が散見されている。申請者らは双方向的な関係を有するペリオドンタルメディシンの一つである糖尿病において硬組織再生治療に及ぼす影響について調べた。その結果、糖尿病患者に対する悪影響を最小限にしオッセオインテグレーションの獲得がより堅固なものとなり、インプラント治療の適応範囲が拡大されることを期待する。

研究成果の概要(英文)：Patients with Diabetes mellitus (DM) have an increased risk of losing their teeth compared with other individuals. Dental implants are a standard of care for treating partial or full edentulism, and various implant surface treatments have recently been developed to increase dental implant stability. However, some studies have reported that DM reduces osseointegration and the success rate of dental implants. The purpose of this study was to determine the effects of high glucose levels for hard tissue formation on a nano-scale modified titanium surface. High glucose concentration increased hard tissue formation, but the quality of the mineralized tissue decreased. Furthermore, the nano-scale modified titanium surface increased mineralized tissue formation and anti-inflammatory, but the quality of hard tissue was dependent on glucose concentration.

研究分野：歯周病学

キーワード：糖尿病 インプラント周囲炎 ペリオドンタルメディシン 硬組織再生

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

1. 研究開始当初の背景

インプラント補綴治療における良好な予後を維持するには、Osseointegration の安定、最近ではインプラント周囲炎への対応が重要である。Osseointegration の早期化とメンテナンス (Supportive Implant Therapy) が必須で、糖尿病などの全身疾患患者でも管理が良好な場合インプラント手術を実施する傾向にあり、その対策が重要である。申請者らは高出力 LED を用いた光線力学療法が歯周病原細菌に対して有効で、また硬組織分化にも有効であることを証明し、また今般純チタン表面に新たなナノ構造を析出させ骨分化誘導に有用であることを解明した。そこで開発した rough surface と LED による光線力学療法を用いて早期の Osseointegration と安定的な Supportive Implant Therapy を *in vitro*, *in vivo* において検討し臨床応用につなげることを目標としている。

2. 研究の目的

申請者らは、間葉系幹細胞の培養系で TNS 構造が無処理表面と比較して、有意に硬組織分化を促進し、TNS 構造が骨の分化・誘導に影響すると報告した(Komasa S, Taguchi Y et al, *J Prosthodont Res*, 2012)。これは、従来と比べて Osseointegration 期間を短縮させる可能性を示唆し、さらに TNS 構造を 600 の焼結処理を加え XPS と XRD で評価したところ、表面に存在する酸化膜が水酸化ナトリウム中のナトリウムイオンと結合し、チタネート構造を形成し酸化層において "Rutile 層"と呼ばれる硬い結晶化相を形成したものと考えられる。他の報告(T.Kasuga et.al, *Lanmuir.*, 3160-3, 14, 1998.)にもあるようにチタネート構造が骨分化誘導に関与していることが示唆される。

歯周病はグラム陰性嫌気性細菌を中心とする感染症と位置づけられ、インプラント周囲炎の細菌叢も類似している。Infection Control という観点から全身疾患とインプラント周囲炎の関連性 (Peri-implantitis medicine) も注目された問題点であり、対応が急務である。前述のインプラント表面のナノ構造化における表面の酸化チタンすなわち Rutile 層が抗菌作用を及ぼすかはこれからのインプラント周囲炎の予防戦略構築上、重要な注目点である。

3. 研究の方法

まず純チタン板表面への TNS 構造を作製し、細胞と構造の相関を精査する。インプラント材料と主に使用されている純チタン板を 10 M 水酸化ナトリウム水溶液に加え、室温条件下で 24 時間攪拌させて反応を進行し、大気圧下と共に反応を活性化させるために室温圧力下 (0.1-15MPa)での合成を行う。合成後に超純水で洗浄を繰り返し、溶存イオンの除去を行う。洗浄の進行は液導電率によりモニターする。この後、真空乾燥することで試料を得る。

材料の表面構造を SEM, SPM 電子顕微鏡で観察し、構造を X 線回析で組成を EDX にて解析評価し、試料を作製する。

高グルコース培養下で β -glycerophosphate と ascorbin acid と dexamethasone 含有培養液にて細胞増殖能・ALP 活性について検索する。DNA マイクロアレイでの網羅的解析を行い、顕著な増加・減少している因子の mRNA に関してリアルタイム PCR での解析を予定している。また、同時に培養上清に含まれる骨分化誘導を示すタンパクの ELISA 法による検索を行う。

実験動物には 2 型糖尿病モデルラット (GK ラット), コントロールには Sprague-Dawley 系ラットを用いて行い、*in vivo* での組織反応の観察の際に過去の標本と比較できるように行う。

4. 研究成果

申請者はナノレベルでの表面改質を行うことで、硬組織誘導能を付与したナノシート析出チタン (NSx) が糖尿病患者のインプラント治療に有効ではないかと考え、高血糖モデル培地を用いて、チタン平板上における硬組織形成能について評価を行った。

ALP 活性はグルコース濃度が上昇するにつれて抑制されていくが、OCN 産生量と Ca 析出量はグルコース濃度が 8.0mM の時に急激に減少し、その後はグルコース濃度の上昇とともに増加に転じる傾向にあった。またカルシウムとリン比はグルコース濃度が 8.0 mM では減少し、グルコース濃度の上昇とともに増加に転じることが明らかになった。

加熱ナノ表面処理を行うことで、表面粗さとぬれ性を獲得し不純物が除去でき細胞にとって良好な環境となり、ALP, OCN, Ca, P とともに上昇したと考えられる。高グルコース環境では細胞内情報伝達が阻害され ALP, OCN, Ca, P が低下することが予想されるとの報告もあり、また LPS 存在下で形成される硬組織と同様な幼弱な硬組織が多量に形成されるとも過去に報告されている。本研究でも 8.0mM のグルコース濃度で OCN, Ca, P が大きく変化しており、この時点で何かのスイッチがはいたのではないかと示唆される。骨粗鬆症の治療とモニタリングにおいて高い Ca/P 比は病状進行の重要な基準であるとの報告も含め、Ca/P 比が高くなると骨質の低下が疑われる。リンは、リン酸エステルを ALP が無機りんとアルコールに分解することで生じるが、高グルコース状態では ALP 活性が低下し、P の量が低下する。その結果として Ca/P 比が高くなり、骨粗鬆症と同様な脆弱な骨が形成されることになると示唆される。

これらの結果から、グルコース濃度はチタン表面上の骨量と骨質に大きく関与しており、高グルコース状態であっても、ナノシート析出チタンを用いることで、通常グルコース濃度と同等の骨質と骨量を獲得できる可能性が明らかになった。したがって、このナノシート析出処理を施したインプラント体を適切に調製し使用することによって、糖尿病患者のインプラント治療における Osseointegration の獲得がより堅固なものとなり、糖尿病患者におけるインプラント治療の適応範囲が拡大されていくのではないかと考えられる。しかし、ナノシート析出チタンの詳細な作用機序の検討やイヌなどの大型動物による臨床モデル試験による検証が必須であり、今後の臨床応用に向けての課題として、検討していく必要があると考えている。

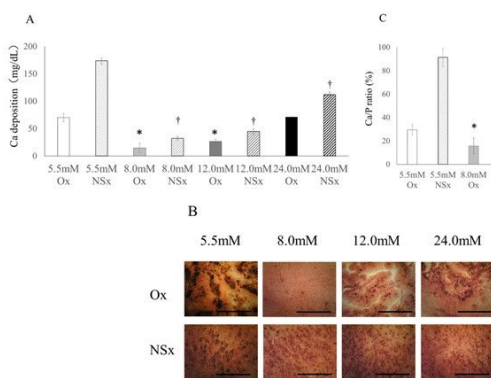


図1
純チタン金属上にII型糖尿病ラット骨髄細胞に播種して各グルコース濃度 (5.5, 8, 12, 24mM) で硬組織分化誘導を行った際の(A)カルシウム析出量 (B)Ca/P比 (C)アリザリンレッド染色像
高グルコース濃度で硬組織分化を行うと**正常でない幼弱な骨形成**が起き、いわゆる**"Soft Bone"**の形成が起きてしまう。

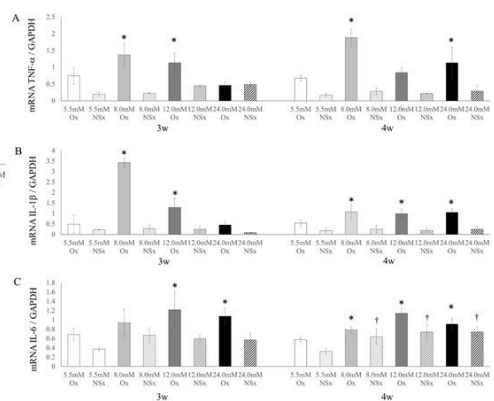


図2
図1と同条件培養下における炎症性サイトカインの発現(A)TNF- α (B)IL-1 β (C)IL-6
高グルコース濃度で硬組織分化を行うということは炎症惹起下で硬組織分化が行われているのと同じ現象である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nobuhiro Yamauchi, Yoichiro Taguchi, Hirohito Kato, Makoto Umeda.	4. 巻 89
2. 論文標題 High-power, red-light-emitting diode irradiation enhances proliferation, osteogenic differentiation, and mineralization of human periodontal ligament stem cells via ERK signaling pathway.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 351-360.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/JPER.17-0365.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masahiro Noguchi, Isao Yamawaki, Saitatsu Takahashi, Yoichiro Taguchi, Makoto Umeda.	4. 巻 60
2. 論文標題 Effects of -tocopherol on bone marrow mesenchymal cells derived from type II diabetes mellitus rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal Oral Science	6. 最初と最後の頁 579-587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.17-0422.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamawaki I, Taguchi Y, Komasa S, Tanaka A, Umeda M.	4. 巻 52
2. 論文標題 Effects of glucose concentration on osteogenic differentiation of rat BMMCs on a nano-scale modified titanium.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 761-771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12446	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koichiro Nakajima, Yoichiro Taguchi, Isao Yamawaki, Nobuhiro Yamauchi and Makoto Umeda.	4. 巻 53
2. 論文標題 Effects of photosensitizers in a high-power, red light-emitting diode irradiation on human gingival epithelial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Osaka Dental University	6. 最初と最後の頁 109-113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naoki Hashimoto, Isao Yamawaki, Yoichiro Taguchi, Hitoshi Azuma, Makoto Umeda.	4. 巻 53
2. 論文標題 Effects of Porphyromonas gingivalis on oxidant stress of human bone marrow cells in vitamin E.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Osaka Dental University	6. 最初と最後の頁 133-139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kenjiro Kobuchi, Kosuke Kataoka, Yoichiro Taguchi, Tatsuro Miyake, Makoto Umeda.	4. 巻 19
2. 論文標題 Nasal double DNA adjuvant induces salivary FimA-specific secretory IgA antibodies in young and aging mice and blocks Porphyromonas gingivalis binding to a salivary protein.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12903-019-0886-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazutaka Imai, Hirohito Kato, Yoichiro Taguchi, Makoto Umeda.	4. 巻 24
2. 論文標題 Biological Effects of Shikonin in Human Gingival Fibroblasts via ERK 1/2 Signaling Pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 E3542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24193542.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mariko Nishizaki, Satoshi Komasa, Yoichiro Taguchi, Hiroshi Nishizaki, Joji Okazaki.	4. 巻 18
2. 論文標題 Bioactivity of NANOZR Induced by Alkali Treatment.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 E780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18092009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 嘉藤 弘仁, 田口 洋一郎, 今井 一貴, 野口 正皓, 山内 伸浩, 山脇 勲, 富永 和也, Ruan Yaru, 田中 昭男, 梅田 誠
2. 発表標題 エムドゲイン由来合成ペプチドがヒト歯髄幹細胞の石灰化物形成能に及ぼす影響
3. 学会等名 日本歯科保存学会2017年秋季学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野口 正皓, 田口 洋一郎, 山脇 勲, 片山 暢仁, 高橋 宰達, 梅田 誠
2. 発表標題 高グルコース環境とPorphyromonas gingivalis刺激におけるヒト骨髄間葉系細胞に対するvitamin Eの影響
3. 学会等名 日本歯科保存学会2017年春季学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田口 洋一郎
2. 発表標題 歯周病学の未来を担う 高血糖状態が再生治療やインプラント埋入手術における硬組織形成に及ぼす影響
3. 学会等名 日本歯周病学会2017年春季学術大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小淵健二郎, 片岡宏介, 田口洋一郎, 三宅達郎, 梅田誠.
2. 発表標題 ダブルDNAアジュバント経鼻投与による若・老齢マウス唾液抗原特異的IgA抗体はPorphyromonas gingivalisの唾液タンパクへの結合を阻害する
3. 学会等名 日本歯周病学会2019年秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井一貴, 嘉藤弘仁, 田口洋一郎, 梅田誠.
2. 発表標題 抗炎症作用を有するShikoninのヒト歯肉線維芽細胞に対する生物学的影響
3. 学会等名 日本歯周病学会2019年秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阮垂茹, 嘉藤弘仁, 田口洋一郎, 山内伸浩, 梅田誠.
2. 発表標題 高出力赤色LED照射はWnt/ β -catenin経路を介してヒト骨髄間葉系細胞の硬組織分化および石灰化形成を促進する.
3. 学会等名 日本歯周病学会2019年秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩見慧, 山脇勲, 田口洋一郎, 武慶超, 彭一豪, 李潤伯, 東仁, 中田貴也, 津守紀昌, 梅田誠.
2. 発表標題 ヒト骨髄間葉系細胞の硬組織分化におけるP.gingivalis LPS存在下での高グルコース環境の影響
3. 学会等名 日本歯周病学会2019年秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ruan Yaru, 嘉藤弘仁, 田口洋一郎, 山内伸浩, 中田貴也, 緒方智壽子, 木村大輔, 梅田誠.
2. 発表標題 高出力赤色LED照射はヒト骨髄間葉系細胞の硬組織分化および石灰化形成を促進する
3. 学会等名 日本歯周病学会2018年秋季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩見慧, 山脇勲, 田口洋一郎, 野口正皓, 中垣直毅, 山岸信博, 那須誉, 本城佳明, 梅田誠.
2. 発表標題 P. gingivalis LPS存在下における高グルコース環境がヒト骨髄間葉系細胞の硬組織分化に及ぼす影響.
3. 学会等名 日本歯周病学会2018年秋季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島幸市朗, 田口洋一郎, 山脇勲, 山内伸浩, 梅田誠.
2. 発表標題 高出力赤色LED照射における光増感剤がヒト歯肉上皮細胞に及ぼす影響.
3. 学会等名 日本歯周病学会2018年秋季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田口洋一郎
2. 発表標題 LEDが慢性歯周炎やインプラント周囲炎予防のための医療デバイスとして活躍する!
3. 学会等名 日本歯周病学会2018年秋季学術大会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoichiro Taguchi, Nobuhiro Yamauchi, Hirohito Kato, Makoto Umeda.
2. 発表標題 High-Power, red-light-emitting diode irradiation enhances proliferation, osteogenic differentiation and mineralization of human periodontal stem cells via ERK signaling pathway.
3. 学会等名 EuroPerio9(国際学会)
4. 発表年 2018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	田口 洋一郎 (TAGUCHI Yoichiro) (60434792)	大阪歯科大学・歯学部・准教授 (34408)	
研究 分担者	楠本 哲次 (KUSUMOTO Tetsuji) (70186394)	大阪歯科大学・医療保健学部・教授 (34408)	