

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02995

研究課題名(和文) 宇宙医学的アプローチによる微小重力環境を用いたインプラント周囲骨吸収制御戦略

研究課題名(英文) Strategies to control peri-implant bone resorption using a space-medical approach in a microgravity environment

研究代表者

細川 隆司 (Hosokawa, Ryuji)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60211546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では骨細胞におけるメカノセンサーとしてのTrpv4の役割に注目し、株化骨細胞(IDG-SW3)の微小重力環境での3D培養と、通常(1G)環境下での培養において発現量に差が認められる分子の探索を目指して研究を行った。微小重力環境での3D培養では複数の発現遺伝子において通常(1G)環境下での培養と比較して差が認められた。また近年骨細胞とHMGB-1との関連が指摘されていることから、ウサギ下顎骨を用いてHMGB-1が骨再生に及ぼす影響についても調査したところ、HMGB-1を適応した群ではマクロファージの遊走を伴う高い骨再生能が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抜歯後の歯槽骨の吸収やインプラント治療における術前処置としての骨移植において、移植後の経時的な骨吸収は臨床上大きな問題となることが多い。「破骨細胞」と「骨芽細胞」に比べてこれまで骨組織中の「骨細胞」がメカニカルストレスに及ぼす影響については不明であった。本研究によりHMGB-1の高い骨再生能が示されたことから、今後骨吸収の新たなメカニズムの解明とその予防や治療法の開発に向けて前進したと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the role of Trpv4 as a mechano-sensor in osteocytes. We aimed to find the differentially expressed molecules in the 3D culture of IDG-SW3 osteocytes under microgravity and normal (1G) conditions. In the 3D culture under the microgravity environment, we found differences in the expression of several genes compared to that under the regular (1G) environment. In addition, since the relationship between osteocytes and HMGB-1 has been recently pointed out, we investigated the effect of HMGB-1 on bone regeneration using a rabbit mandible and found that the HMGB-1-treated group showed high bone regeneration ability with the migration of macrophages.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：Trpv4 骨細胞 IDG-SW3 メカノセンサー 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

抜歯後の歯槽骨の吸収やインプラント治療における術前処置としての骨移植において、移植後の経時的な骨吸収は臨床で大きな問題となることが多い。これまで骨組織における研究では「破骨細胞」と「骨芽細胞」が主な研究対象となってきた。これらの細胞は、比較的培養も容易であることから、多くの研究成果が得られてきたのも事実である。しかし、Ikedaらにより DMP-1 をターゲットとしてジフテリア毒素レプター遺伝子を組み込み骨細胞を特異的に死滅させたマウスを使用した研究により、骨細胞を死滅させたマウスではほぼ完全に抑制されることが明らかにされた⁽¹⁾ことなどから、骨細胞が生理的骨吸収の司令塔になっている可能性が出てきている。一方で骨細胞の超微細構造に着目した場合、骨細胞における機械的刺激のメカノセンサーとして一次繊毛 (primary cilium) が存在しており、そのセンサー機能の本体が細胞膜カルシウムチャネルの Trpv4 (Transient Receptor Potential Vanilloid 4) である可能性が示唆されている⁽²⁾。さらに Trpv4 ノックアウトマウスを尾部懸垂により大腿骨を非荷重状態に置くと、ワイルドタイプマウスに比べて骨量および骨梁数の減少が有意に抑制されることが示されている⁽³⁾。これらの先行研究から我々は骨細胞におけるメカノセンサーとしての Trpv4 の役割に注目し、1) 株化骨細胞 (IDG-SW3) の微小重力環境での 3D 培養と、通常 (1G) 環境下での培養において発現量に差が認められる分子の網羅的探索を行った。微小重力環境での 3D 培養では培養プロトコルの確立に予想以上に時間がかかったものの、研究のターゲットとしている複数の発現遺伝子において通常 (1G) 環境下での培養と比較して差が認められた。また近年骨細胞と HMGB-1 との関連が指摘されていることから、ウサギ下顎骨を用いて HMGB-1 が骨再生に及ぼす影響についても調査した。

2. 研究の目的

微小無重力空間が骨細胞の増殖、分化に与える影響を分子マーカーの発現量を元に調査すること。また骨欠損の治癒を促進する可能性のあるタンパク rhBMP-2 (recombinant human Bone Morphogenetic Proteins)、および HMGB1 (High Mobility Group Box1) に着目し、下顎骨を部分欠損させたウサギに対する分子生物学的アプローチにより治癒期間の短縮を目指すこと。

3. 研究の方法

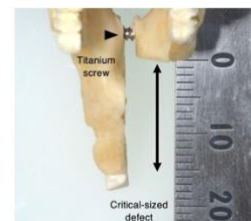
骨細胞株 (IDG-DW3) を使用した in-vitro 実験

骨細胞を 12well プレートに播種し、細胞分化培地に交換した後、規定の培養条件 (37°C 8% CO₂) にて培養を行った。一方のプレートは重力制御装置である Gravite (Space Bio-Laboratories Co., Ltd) に設置し、360 度回転させることにより模擬微小重力環境を再現した。もう一方のプレートは通常通りインキュベーターで培養し、コントロール群とした。培地交換後 3, 7, 9 日後にそれぞれ細胞を採取し、定量 PCR 法にて骨細胞マーカー群と Trpv4 の発現を比較した。

ウサギを使用した HMGB-1 の骨形性能に関する in-vivo 実験

麻酔下にて実験動物の身体を保定器具を用いて固定し、下顎角～下顎下縁にかけて剃毛し、下顎下縁～下顎枝辺縁にかけて外科用メスにて切開を加えた。下顎骨体を露出させ、外科用ブレードを使用して左側下顎枝に幅 5mm の欠損を作り、下顎体半側を分離した (図 1)。その後チタン製マイクロプレートおよび 1mm ミニスクリューを用いて分離した下顎体を固定し、β-TCP ブロック (20×10×10mm) に生理食塩水 (100μl) を浸漬させる群 (g コントロール群: n=4)、rhBMP-2 (総量 10μg: 濃度 0.1mg/ml in PBS) (group B/rhBMP-2 群: n=5)、HMGB-1 (総量 50μg: 濃度 0.1mg/ml in PBS) (group C/HMGB-1 群: n=5) をそれぞれ浸透させたものを欠損部に固定し、縫合した。術後 12 週後の骨欠損部の治癒をマイクロ CT および組織学的検査 (Villanueva-Goldner 染色) により骨治癒状態を評価した。

図1. ウサギ下顎骨における下顎骨欠損モデルの作製



ウサギ左側下顎骨を 15mm 長で切断除去し、チタン製スクリューにより両側下顎骨を固定した。

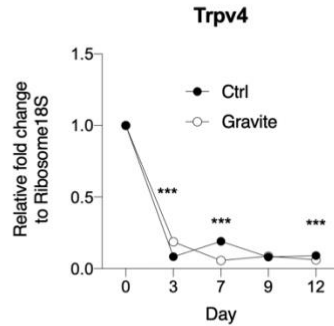
4. 研究成果

【骨細胞株 (IDG-DW3) を使用した in-vitro 実験】

(1) 骨細胞株 (IDG-DW3) の骨細胞マーカーの変化

分化培地へ交換した日を Day.0 として、コントロール群と Gravite 群とで骨細胞マーカーの Trpv4 の発現を比較したところ、3, 7, 12 日目の発現パターンに両群で差を認めた。

図2. 骨細胞IDG-SW3中Trpv4の両群における発現の経時的変化



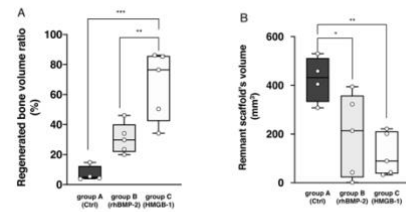
Trpv4は株化骨細胞IDG-SW3に発現しており、分化初期に発現が低下。コントロール群とGravitite群で3,7,12日目の発現量に有意差を認める。

【ウサギを使用した HMGB-1 の骨形性能に関する in-vivo 実験】

(1) 骨再生量と残留 β -TCP ブロック体積の比較

術後 12 週のそれぞれの群の骨再生量をマイクロ CTs 三次元構築像から算出したところ、コントロール群に比較して groupB(rhBMP-2 群) と groupC(HMGB-1)群で有意に再生骨量が増加していた。一方で残留 β -TCP ブロック体積は groupC(HMGB-1)群が最も低く、groupC(HMGB-1)群、groupA (コントロール群) の順で有意に大きかった。

図3. 12週後の各群の再生骨量と残留 β -TCPブロック体積

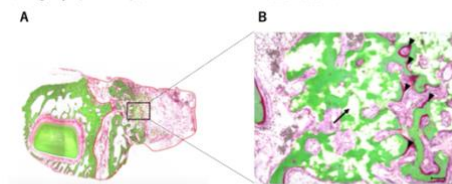


(A)骨再生量はコントロール群に比較してgroupB(rhBMP-2群) と groupC(HMGB-1)群で有意に再生骨量が増加 (B)逆に残留 β -TCPブロック体積はgroupC(HMGB-1)群が最も低く、groupC(HMGB-1)群、groupA (コントロール群) の順で有意に大きい

(2) Villanueva-Goldner 染色による類骨(osteoid)形成の観察

groupC(HMGB-1)群の骨組織切片に対し類骨を染色できる Villanueva-Goldner 染色を行ったところ、反側切除を行った部位に骨再生が認められ、強拡大像において β -TCP を取り囲むように類骨が赤色に染色されている像が観察された (図 3) . このことは β -TCP をスキャフォールドとして骨様組織が再生している可能性について示唆するものであった。

図4. groupC(HMGB-1)群のVillanueva-Goldner染色組織切片

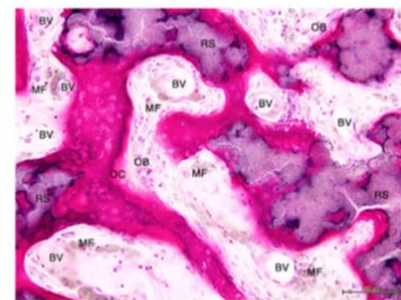


(A) groupC(HMGB-1)群では左側半側切除部 (点線囲い) に骨形成が認められる。(B)強拡大像では残留 β -TCPブロック (矢印) を囲むように新生骨 (緑) が見られ、そのさらに外側に類骨 (赤) が認められる (スケールバー: 100 μ m)

(3) HE 染色による類骨(osteoid)形成の観察

次にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、再生骨周辺の構造についてより詳細に観察したところ、顆粒状の β -TCP を取り囲む石灰化構造物と、多数のマクロファージが観察された (図 4) . さらにマクロファージ (MS) が血管上皮細胞 (BV) から遊走し、細胞内部に β -TCP を貪食したと考えられる像を認めた。

図5. groupC(HMGB-1)群のHE染色組織切片



groupC(HMGB-1)群では残留 β -TCP (RS)を取り囲む形で石灰化した骨構造が認められる
RS: 残留 β -TCP, MF: マクロファージ, BV: 血管, OB: 骨芽細胞, (スケールバー: 100 μ m)

上記 1),2),3)の結果は HMGB-1 がマクロファージの遊走能を高めることにより β -TCP 顆粒を貪食させ、そのスペースに骨芽細胞が集積し、石灰化組織を構築していることが示唆された。

<引用文献>

1. Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, et al. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. Cell Metab. 2007;5(6):464-75.
2. Lee KL, Guevarra MD, Nguyen AM, Chua MC, Wang Y, Jacobs CR. The primary cilium functions as a mechanical and calcium signaling nexus. Cilia. 2015;4:7.
3. Mizoguchi F, Mizuno A, Hayata T, Nakashima K, Heller S, Ushida T, et al. Transient receptor potential vanilloid 4 deficiency suppresses unloading-induced bone loss. Journal of cellular physiology. 2008;216(1):47-53.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kobayakawa Miki, Matsubara Takuma, Mizokami Akiko, Hiura Fumitaka, Takakura Nana, Kokabu Shoichiro, Matsuda Miho, Yasuda Hisataka, Nakamura Ichiro, Takei Yosuke, Honda Hiroaki, Hosokawa Ryuji, Jimi Eijiro	4. 巻 38
2. 論文標題 Kif1c regulates osteoclastic bone resorption as a downstream molecule of p130Cas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Biochemistry and Function	6. 最初と最後の頁 300-308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbf.3476	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 Senoo Soichiro, Iwasaki Masanori, Kimura Yumi, Kakuta Satoko, Masaki Chihiro, Wada Taizo, Sakamoto Ryota, Ishimoto Yasuko, Fujisawa Michiko, Okumiya Kiyohito, Ansai Toshihiro, Matsubayashi Kozo, Hosokawa Ryuji	4. 巻 -
2. 論文標題 Combined effect of poor appetite and low masticatory function on sarcopenia in community dwelling Japanese adults aged>75 years: A 3 year cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Rehabilitation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/joor.12949	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 Yamazaki Seiya, Masaki Chihiro, Nodai Tomotaka, Tsuka Shintaro, Tamura Akiko, Mukaibo Taro, Kondo Yusuke, Ono Kentaro, Hosokawa Ryuji	4. 巻 64
2. 論文標題 The effects of hyperglycaemia on peri-implant tissues after osseointegration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 217 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpor.2019.07.007	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 Kawamura Michihiko, Masaki Chihiro, Shibata Yo, Kondo Yusuke, Mukaibo Taro, Miyazaki Takashi, Hosokawa Ryuji	4. 巻 98
2. 論文標題 Pentosidine correlates with nanomechanical properties of human jaw bone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 20 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmbbm.2019.06.002	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 Fukahori Shinji, Kondo Yusuke, Nodai Tomotaka, Aonuma Fumiko, Tamura Akiko, Tsuka Shintaro, Mukaibo Taro, Masaki Chihiro, Hosokawa Ryuji	4. 巻 63
2. 論文標題 Implant-supported fixed prosthesis improves nutrient intake in patients with partial edentulous posterior regions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 411 ~ 414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpor.2019.03.007	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 Fukahori Shinji, Kondo Yusuke, Nodai Tomotaka, Aonuma Fumiko, Tamura Akiko, Tsuka Shintaro, Mukaibo Taro, Masaki Chihiro, Hosokawa Ryuji	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Implant-supported fixed prosthesis improves nutrient intake in patients with partial edentulous posterior regions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpor.2019.03.007	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 HIRATA Yuki, TOYONO Takashi, KOKABU Shoichiro, OBIKANE Yui, KATAOKA Shinji, NAKATOMI Mitsushiro, MASAKI Chihiro, HOSOKAWA Ryuji, SETA Yuji	4. 巻 40
2. 論文標題 Kruppel-like factor 5 (Klf5) regulates expression of mouse T1R1 amino acid receptor gene (Tas1r1) in C2C12 myoblast cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 67 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.40.67	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 Nagao Mitsuharu, Masaki Chihiro, Nakao Mihoko, Ito Yoshinori, Tsuka Shintaro, Mukaibo Taro, Kondo Yusuke, Hosokawa Ryuji	4. 巻 45
2. 論文標題 Is Anterior Guidance a Key Factor on Planning Implant Treatment for Free-End Missing in the Posterior Mandible?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Implantology	6. 最初と最後の頁 100 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1563/aaid-joi-D-17-00237	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 Monir Ahmed, Mukaibo Taro, Abd El-Aal Abdel Basit M., Nodai Tomotaka, Munemasa Takashi, Kondo Yusuke, Masaki Chihiro, El-Shair Mahasen A., Matsuo Kou, Hosokawa Ryuji	4. 巻 11
2. 論文標題 Local administration of HMGB-1 promotes bone regeneration on the critical-sized mandibular defects in rabbits	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88195-7	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 該当する

[学会発表] 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Chihiro Masaki, Seiya Yamazaki, Tomotaka Nodai, Yusuke Kondo, Kentaro Ono, Ryuji Hosokawa
2. 発表標題 Effects of post-osseointegration hyperglycemia on peri-implant tissues
3. 学会等名 97th general session and exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年~2020年

1. 発表者名 Hosokawa R
2. 発表標題 Dental Implant Treatment for Aged and Metabolically Compromised Patients: A New Biomedical Approach
3. 学会等名 China Prosthodontic Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年~2019年

1. 発表者名 T. Mukaibo, A. Monir, T. Nodai, T. Munemasa, Y. Kondo, C. Masaki, R. Hosokawa
2. 発表標題 rhHMGB-1 as a potential bioactive molecule for the bone regeneration
3. 学会等名 The 7th Biennial Joint Congress of JPS-CPS-KAP Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向坊太郎, アーメドモニア, 野代知孝, 宗政 翔, 近藤祐介, 正木千尋, 細川隆司
2. 発表標題 HMGB-1の歯槽骨増生に対する新規生理活性物質としての可能性
3. 学会等名 第130回日本補綴歯科学会記念学術大会
4. 発表年 2021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	近藤 祐介 (Kondo Yusuke) (00611287)	九州歯科大学・歯学部・講師 (27102)	
研究分担者	柄 慎太郎 (Tsuka Shintaro) (20759386)	九州歯科大学・歯学部・特別研修員 (27102)	
研究分担者	向坊 太郎 (Mukaibo Taro) (50635117)	九州歯科大学・歯学部・助教 (27102)	
研究分担者	正木 千尋 (Masaki Chihiro) (60397940)	九州歯科大学・歯学部・准教授 (27102)	

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
---------	---------