

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17151

研究課題名（和文）インプラント周囲骨組織の荷重応答性カップリング因子誘発型骨質制御機構の解明

研究課題名（英文）Effect of mechanical stimulation on bone quality around implant based on coupling factors

研究代表者

右藤 友督（Uto, Yusuke）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・助教

研究者番号：10816680

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：失った歯を補う治療法として歯科インプラントは広く普及し、患者の生活の質を向上させているが、咀嚼などによりインプラントにかかる荷重が顎骨に与える影響は不明な点が多い。当研究室では過去に、インプラントを介した荷重がインプラント周囲骨組織の骨質を改変することを報告した。骨質とは骨構造や石灰化、コラーゲン線維の配向などにより構成される骨の状態である。本研究では更に、荷重が骨細胞の変化に関与する複数の遺伝子発現を促進し、骨組織の代謝に関わる遺伝子の発現も増大することを突き止めた。また2週間と5週間の荷重付与期間によっても骨質が異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科インプラント研究は臨床での成功が先行しており、インプラント周囲骨組織の分子生物学的な動態は今だ不明な点が多い。インプラント治療の合併症であるインプラント周囲炎への対応も種々に検討されているが、基礎研究的な裏付けは慢性的に不足している。この現状を鑑み、本研究のようなインプラントと生体の反応、荷重への応答性を解明することは今後のインプラント治療をより盤石なものへ改良するうえで必要不可欠である。顎骨における荷重応答性遺伝子を明らかにしたことは治療法開発への有益な成果報告であり、ラットを使用したインプラントの動物実験プラットフォームを確立したことは今後の研究にとって大きな進展である。

研究成果の概要（英文）：Dental implant treatment is effective solution to missing teeth, and widely used. But the effect of mechanical load like occlusal force on bone around implants is still unclear. we have reported that mechanical load via implant modify the bone quality around implants in rat maxillae. Bone quality comprises bone architecture, bone mineralization and characteristics of collagen fibers. But how bone quality change under loaded condition is not revealed. In this study, we demonstrated that mechanical load increases the relative gene expression of podoplanin and MEPE, osteocyte related gene. Bone turnover related cbfa1 and RANKL gene expression were enhanced by mechanical load. It was also clarified that the bone quality differs depending on the loading period of 2 weeks and 5 weeks.

研究分野：インプラント歯学

キーワード：インプラント 骨質

### 1. 研究開始当初の背景

喪失した歯牙や歯列を補う治療手段のひとつとして、インプラント治療が広く適応され臨床的成功を収めている。オッセオインテグレーションの向上を求めて多くのインプラント研究が行われ、その結果としてインプラント歯学は発展してきた。一方、2000年に米国国立衛生研究所が提唱した新規概念の「骨質」は、骨の基礎研究領域に大きなパラダイムシフトをもたらした<sup>1)</sup>、骨の力学的機能を解明するには、骨量や骨密度に加え、それらとは完全に独立した「骨質」の評価が必要不可欠なことが明らかとなった<sup>2)</sup>。ところがインプラント研究では新規概念の「骨質」に対する理解と受容がなされず、インプラント周囲骨組織の骨質についてはほとんど解明されていない。

一方、インプラント研究以外の骨に関する基礎研究では骨質研究が進んでおり、荷重環境下ではコラーゲン線維と生体アパタイト結晶複合体の向き(=配向性)が主応力方向へと優先配向し、見た目は同じでも骨微細構造は大きく変化して力学的機能を向上させることが報告されている<sup>3,4)</sup>。近年では、骨細胞が荷重に応答して細胞の極性を変化させることも証明されているが<sup>5)</sup>、荷重環境下でなぜこのようなダイナミックな骨質の変化が起こるかは不明である。

### 2. 研究の目的

骨関連細胞とカップリング因子に着目し、顎骨に埋入されたインプラント周囲骨組織における荷重応答性骨質制御分子を探索してその分子メカニズムを解明し、歯科インプラント研究における骨質研究を開拓してその基盤を構築することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

9週齢 Wistar 系ラットの上顎両側第一臼歯を抜歯し、4週間後にチタン製インプラント<sup>6)</sup>を埋入した。埋入の3週間後よりインプラントへの機械的繰返し荷重(10N, 3Hz, 1800回/2回/週)を付与した(図1)。荷重付与2週間と5週間の群を作成し、それぞれ荷重期間終了後に屠殺してマイクロCTを使用した3次元的骨構造解析、脱灰薄切切片を用いた組織形態学的解析と免疫組織化学的解析を行った。更に荷重付与後30分でラットを屠殺し、得られたインプラント周囲骨組織から抽出した遺伝子を用いて定量qPCR解析を行った。

### 4. 研究成果

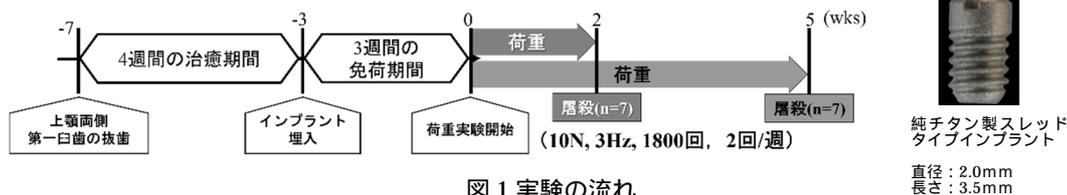


図1 実験の流れ

#### (1) 研究の主な成果

##### 荷重がインプラント周囲骨組織の骨量と骨密度に与える影響

ラット上顎骨における荷重応答性を解明するうえで、骨組織が改変される速度と期間を明らかにする必要がある。よって本研究では2週間の荷重と5週間の荷重を付与した実験群を作成して解析することで、ラット上顎骨の荷重応答に必要な期間を検索した。その結果、マイクロCTによるインプラント周囲骨組織の3次元的構造解析では、荷重開始から2週間では骨量、骨密度ともに対照群と有意な差は認めなかったが、荷重開始から5週間では骨密度の有意な上昇を認めた。一方骨量は5週間荷重群と対照群で有意差は示さなかった(図2)。このことから、インプラントを介した荷重は周囲骨組織の骨量変化を伴わない骨密度の上昇をもたらすことが明らかとなり、この骨改造には2週間~5週間の期間を要することが分かった。過去の研究<sup>6)</sup>では、長管骨において荷重は骨量を増大させることが報告されており、本研究は顎骨の特異的な荷重応答を証明したと考えられる。

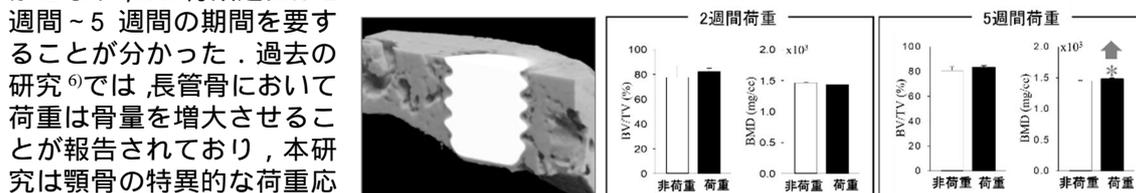


図2. 荷重が骨量と骨密度に与える影響

##### 荷重が「骨質」の構成要素である骨関連細胞とコラーゲン線維に与える影響

「骨質」は骨の力学的機能を構成する重要な要素であり、骨密度とは全く別の評価対象である。骨質は更に、石灰化、損傷の蓄積、骨代謝回転、骨構造によって構成され、このうち骨構造は更

に骨関連細胞とコラーゲン線維，生体アパタイト結晶に細分化されている<sup>1)</sup>。本研究では骨質の構成要素である「骨関連細胞」と「コラーゲン線維」について解析するため，インプラント周囲骨組織の脱灰薄切片から組織形態科学的解析，免疫組織化学的解析を行った。H-E染色による骨細胞の定量解析では，5週間の荷重がインプラントスレッド内部の骨細胞数を有意に増大した。一方2週間の荷重は骨細胞数に影響を与えなかった。TRAP染色による破骨細胞の定量解析では，2週間の荷重はスレッド内部の破骨細胞数を有意に増大したが，5週間では対照群と有意な差は認められなかった。特異抗体を用いたRunx2免疫染色では，2週間，5週間の荷重はともにスレッド内部の骨芽細胞数を増大していた(図3)。

次に，Picrosirius Red染色を行い，偏光顕微鏡像からコラーゲン線維の定量解析を行った。偏光顕微鏡像では，型コラーゲン線維が黄色から橙色，型コラーゲン線維は緑色に識別することができる。定量解析の結果，2週間の荷重では型，型ともにコラーゲン線維面積率に有意な差は認められなかったが，5週間の荷重は型，型両方のコラーゲン線維面積率を有意に増大していた(図4)。

2週間荷重の影響度と5週間荷重の影響度を比較した結果，2週荷重における破骨細胞数の増大は5週と比較して有意な変化であった。一方5週間荷重では型ならびに型コラーゲン線維の増加は，2週間荷重による影響と比較して有意な変化をもたらしていた。型コラーゲン線維は骨に強さと柔軟性を与え，型コラーゲン線維は骨の成熟や型コラーゲン線維の成長を補助する機能をもつ。荷重に適応する変化として，型コラーゲン線維が骨の力学的機能を増強し，型コラーゲン線維は恒常的なリモデリングの結果増加が認められたと考えられる。

骨細胞が産生する荷重応答性分子として知られるSclerostin<sup>7)</sup>の免疫染色では，荷重の有無にかかわらずインプラントのスレッド内部において産生を認めず，特殊環境において骨細胞の挙動が変化する可能性を示唆した。

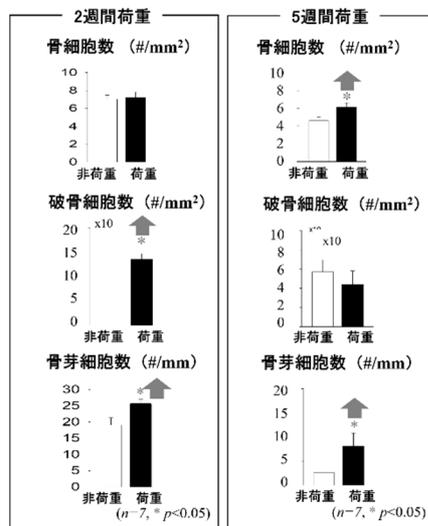


図3. 荷重と骨関連細胞

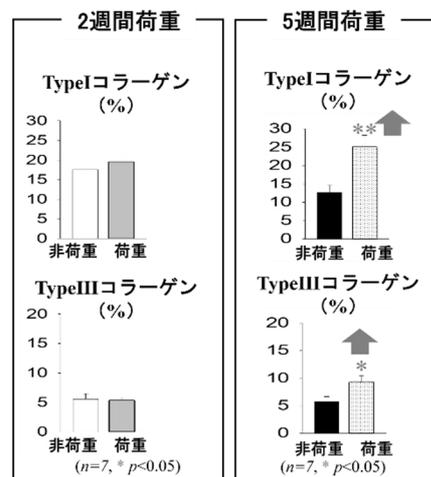


図4. 荷重とコラーゲン線維産生

### 荷重が骨関連遺伝子発現に与える影響

荷重付与30分後に屠殺したラットの上顎骨からDNAを抽出し<sup>8)</sup>，定量qPCRによる骨関連遺伝子発現解析を行った。骨細胞関連遺伝子では，骨細胞の細胞突起形成や極性に関わるPodoplaninとMEPEの相対発現量が荷重により増大していた。また破骨細胞関連遺伝子であるRANKLと，骨芽細胞関連遺伝子であるcbfa1の相対発現量が荷重により有意に増大していた(図5)。

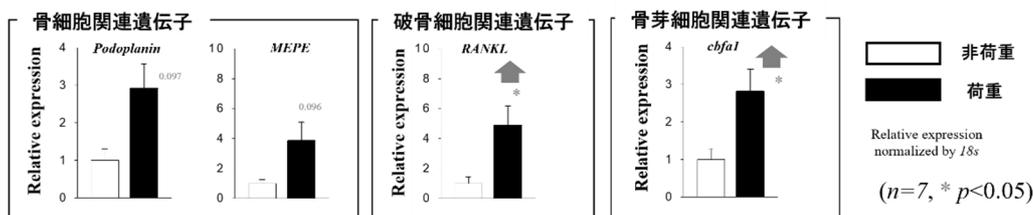


図5. 荷重と骨関連遺伝子発現

### 結論

ラット上顎骨においてインプラントを介した荷重は，直ちに周囲骨組織の荷重応答性遺伝子発現を惹起し，骨芽細胞と破骨細胞によるリモデリングの促進が始まる。荷重開始から2週間まで活発な細胞増殖を認め，骨改造が開始されている。更に荷重開始から5週間後では，コラーゲン線維の増加と骨細胞ネットワークの拡大による骨質向上，ならびに骨密度の増大に起因する骨の力学的機能強化が進行すると考えられた。

### (2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究により明らかとなったインプラント周囲骨組織の「骨質」と，その制御に関連する遺伝

子発現は、インプラント周囲骨組織の長期的な安定を目指すうえで重要な知見である。また荷重による骨量の増加を伴わない骨密度の上昇は、顎骨に特異的な荷重応答と考えられる。

研究開始当初は、ラットを使用したインプラント研究のほとんどが大腿骨などの長管骨を用いるものであったが、近年は上下顎骨を使用した研究も国内外で行われ始めている。本研究におけるインプラント周囲骨組織と荷重に関する時系列的解釈は、今後ラットインプラント埋入モデルを用いた骨研究の条件設定と解析に貢献する要素である。

### (3) 今後の展望

本研究で作成したラット上顎骨インプラント埋入モデルは、上顎第一臼歯抜歯からインプラント埋入、荷重付与までの一連の手技が確立しており、条件設定を細分化することでより詳細なインプラント周囲骨組織の反応を解明することが可能と考えられる。特に大型動物を使用したインプラント埋入研究と比較して、ラットを使用することで多種多様な解析方法を適用可能となった点は今後の研究基盤構築に大きく貢献した。一方ラット用インプラントを高確率で骨結合させるための表面処理改良にも既に成功しており、より再現性の高い研究が可能となった。今後はインプラント臨床を想定した即時埋入や骨増生における顎骨の分子生物学的な反応を解析し、インプラント歯学における基礎科学的な基盤構築と臨床への応用を展開する。また、現在でも国内外における「骨質」研究は歯学領域で不足しており、本研究で解析した骨関連細胞とコラーゲン線維以外の要素（骨代謝回転、損傷の蓄積、生体アパタイト結晶）も詳細に解明する必要がある。

<引用文献> 1) Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. NIH consensus statement 2000, 2) Seeman E et al. *J Bone Miner Metab.* 2008, 3) Nakano T et al. *Bone.* 2002, 4) Noyama Y et al. *Bone.* 2013, 5) Sekita A et al. *J Struct Biol.* 2017, 6) Uto Y et al. *PLoS One.*2017. 7) Galea GL et al. *Bone.*2017, 8) Kuroshima S et al. *Calcif Tissue Int.* 2013

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yusuke Uto , Shinichiro Kuroshima , Yusuke Uchida , Masayoshi Suzue , Takashi Sawase
2. 発表標題 Effects of mechanical loads on osseous tissue around implant in rat maxillae.
3. 学会等名 30th ANNUAL CONGRESS OF THE EUROPEAN COLLEGE OF GERODONTOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 右藤友督, 黒嶋伸一郎, 内田悠介, 叶井里歩, 鈴江正義, 澤瀬 隆
2. 発表標題 規則的な繰返し荷重は顎骨に埋入されたインプラント周囲骨組織の荷重応答性適応変化を誘導する
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Uto , Shinichiro Kuroshima, Yusuke Uchida, Riho Kanai, Masayoshi Suzue, Takashi Sawase
2. 発表標題 Mechanical repetitive loads regulate bone related cells around the osseointegrated implants in rat maxillae.
3. 学会等名 29th Australian and New Zealand Bone and Mineral Society Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 右藤友督, 黒嶋伸一郎, 内田悠介, 叶井里歩, 鈴江正義, 澤瀬 隆
2. 発表標題 ラット上顎骨に埋入したインプラントへの繰返し荷重がインプラント周囲骨組織のリモデリングに与える影響
3. 学会等名 第49回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Uto, Shinichiro Kuroshima, Nao Inaba, Yusuke Uchida, Riho Kanai, Takashi Sawase
2. 発表標題 Effect of mechanical loading on bone around threaded implants in rat maxillae
3. 学会等名 The 28th annual scientific meeting of the ANZBMS (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 右藤友督, 黒嶋伸一郎, 内田悠介, 叶井里歩, 澤瀬 隆
2. 発表標題 インプラント周囲骨組織における荷重応答性の骨質変化
3. 学会等名 平成30年度公益社団法人日本補綴歯科学会 九州支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 右藤友督, 黒嶋伸一郎, 石本卓也, 内田悠介, 叶井里歩, 中野貴由, 澤瀬 隆
2. 発表標題 インプラントを介した規則的な繰返し荷重が骨関連細胞とコラーゲンの配向性に与える影響
3. 学会等名 第38回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 右藤友督, 黒嶋伸一郎, 石本卓也, 中野貴由, 澤瀬 隆
2. 発表標題 規則的な繰返し荷重がインプラント周囲の骨関連細胞とコラーゲンの配向性に与える影響
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Uto Y, Kuroshima S, Inaba N, Uchida Y, Kanai R, Sawase T
2. 発表標題 Mechanical repetitive load on implant enhances bone quality around implant.
3. 学会等名 The11th AAO CONGRESS MEETS ITI KOREA AND KASFO (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 右藤友督, 黒嶋伸一郎, 石本卓也, 中野貴由, 澤瀬 隆
2. 発表標題 規則的な繰返し荷重がインプラント周囲の骨関連細胞とコラーゲンの配向性に与える影響
3. 学会等名 第4回日本骨免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 右藤友督, 黒嶋伸一郎, 内田悠介, 叶井里歩, 鈴江正義, 澤瀬 隆
2. 発表標題 規則的な繰返し荷重は顎骨に埋入されたインプラント周囲骨組織の荷重応答性適応変化を誘導する
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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