

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10125

研究課題名（和文）歯周組織再生療法・インプラント治療に血糖コントロールが与える影響

研究課題名（英文）Impact of blood glucose control on periodontal regenerative therapy and implant treatment.

研究代表者

水谷 幸嗣（Mizutani, Koji）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60451910

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、高血糖によるインスリンシグナル経路のAktの活性化阻害が及ぼすメカニズムをin vitroにて歯肉線維芽細胞および骨髄由来幹細胞で検索した。そのin vitro実験の結果に基づき、糖尿病モデル動物の高血糖ならびにその血糖コントロールが歯肉の創傷治癒の改善、および歯周組織再生療法後の治癒ならびにインプラントのオッセオインテグレーションに關与していることを示した。この研究成果は、糖尿病患者への安全性と予知性の高い歯科治療の確立に貢献できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、糖尿病はわが国において増加傾向にあることが指摘されており、糖尿病患者の歯周炎は進行しやすいことから、今後、歯科医療の現場において糖尿病患者に対する歯周組織再生療法、およびインプラント治療の安全性や予知性を高めることは喫緊の課題と考えられる。本研究で得られた知見が内科および歯科の臨床現場に与える意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the mechanism by which hyperglycemia inhibits Akt activation of the insulin signaling pathway in vitro using gingival fibroblasts and bone marrow-derived stem cells. Based on the results of the in vitro experiments, it was shown that hyperglycemia and its glycemic control in diabetic animal models are involved in the improvement of gingival wound healing, healing after periodontal tissue regeneration therapy, and osseointegration of implants. The results of this study may contribute to the establishment of safe and predictable dental treatment for diabetic patients.

研究分野：歯周病

キーワード：歯周病 糖尿病 酸化ストレス インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

歯周病と糖尿病が相互に影響を及ぼし合うことは、疫学的調査や介入研究により広く認識されており、様々なメカニズムが示されてきているが、糖尿病患者への歯周組織再生療法についての報告はほとんど無い。また、近年では歯科領域における糖尿病の影響として、インプラントのオッセオインテグレーションの不良や遅延をもたらすことが疫学的な解析で示され始めている。糖尿病が骨代謝に関与することは報告されているが、そのメカニズムは明らかになっていない点はまだ多く存在する。そのため、糖尿病状態で歯周組織の再生や、インプラントのオッセオインテグレーションを促進するための解決策はほとんど確立していない。糖尿病の定義である「慢性的な高血糖状態」が歯周組織の創傷治癒や歯周炎の発症・進行など様々な影響を及ぼすメカニズムとして、プロテインキナーゼ C (PKC) 活性や酸化ストレスにより血管内皮細胞で生じている潜在的な炎症状態に起因している可能性 (Mizutani et al. J Dent Res. 2014) を申請者らは報告している。また、糖尿病モデルラットの歯周組織局所において高血糖により生じた酸化ストレスを介して創傷治癒の遅延が起きていること (Kido, Mizutani et al. PLoS One 2017) さらに同様の機能低下がヒト歯肉線維芽細胞でも持続的な高血糖状態により生じること (Buranasin, Mizutani et al. PLoS One 2018) を報告している。この機序は、歯槽骨における骨代謝にも当てはまりうると考えられ、本研究課題の核心をなす学問的問いは「酸化ストレスや PKC 活性を惹起する高血糖状態をコントロールすることで、糖尿病患者への歯周組織再生療法および歯科インプラントの治療成績は改善するのか」というものであり、その仮説を検証する。

2. 研究の目的

本研究は、高血糖によるシグナル経路の阻害から生じる増殖能および骨代謝能への影響を培養骨芽細胞で検索し、糖尿病モデル動物の血糖コントロールが、歯周組織再生療法の治癒、歯科用インプラントのオッセオインテグレーションにもたらす効果を検討することを目的としている。

3. 研究の方法

・ 高血糖が培養骨芽細胞の細胞機能およびチタン付着へ与える影響の検討

1) Slc:Wistar ラット大腿骨より BMMSCs を採取し、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への分化誘導を行い、多分化能を確認した。BMMSCs をグルコース濃度 5.5 mM の骨芽細胞誘導培地 (10% FBS 含有 -MEM 培養液に 50 mg/ml アスコルビン酸、10 mM グリセロフォスフェート、10 nM デキサメタゾン) を添加) で培養し (対照群) 同培養液のグルコース濃度を 30-50 mM に調節して高血糖状態を想定した高グルコース条件下での培養をテスト群とする。

解析として、インスリン刺激後の Akt、Erk 活性化にてインスリン抵抗性を評価する。Akt によって上方制御される増殖能を WST-8 assay、EdU assay、また Erk によって制御される細胞遊走能を in vitro wound healing assay にて評価する。培養 7 日目の ALP 活性試験にて骨芽細胞分化、28 日目にアリザリン染色にての細胞外基質の石灰化の評価をし、高血糖が骨芽細胞の機能におよぼす影響を検索する。その影響のメカニズムとして、これまでの研究から酸化ストレスの関与が想定されるため、酸化ストレスマーカーの mRNA 発現の定量、Reactive oxygen species (ROS) の定量、抗酸化剤 (N-acetyl-L-cysteine: NAC) での前述解析の変化を評価する。

2) インプラントのオッセオインテグレーションへの高血糖の影響を検討するため、マイクロストラクチャーを付与する表面処理済みチタンディスク上で培養骨芽細胞を培養し、1) と同様の解析を行う。

・ 糖尿病モデル動物への歯周組織再生療法の応用とインプラント埋入

1) 実験動物

ストレプトゾトシン (STZ) にて高血糖を誘発し、糖尿病状態を 2 か月維持した糖尿病モデルラットと、同一週齢の対照ラットを用いる。

2) 糖尿病ラットの全身状態の評価

空腹時血糖値、血中インスリンの測定と、腹腔内耐糖能テストにより耐糖能を評価。血清中の CRP、IL-6、TNF- α 、尿中の 8OHdG を測定し、全身的な慢性炎症や酸化ストレスレベルを評価。

3-1) 外科的歯周炎モデルへの再生療法

全身麻酔下で両側上顎第一臼歯近心に右図のような骨欠損 (2×2×1mm) を作製し、露出根面のセメント質も除去。片側にはエナメルマトリックスデリバティブ (エムドゲイン®ゲル) を塗布、片側は何も入れずに縫合閉鎖。

3-2) 上顎抜歯部へのインプラント埋入

全身麻酔下で両側上顎第一臼歯を分割抜歯し、4週間後に抜歯窩治癒部位に、手用ファイル(#25-#100)を用いて直径1mmでチタン製インプラントの窩洞を形成し、インプラント埋入を行う。

4-1) 歯周組織再生の観察と血管新生・骨代謝マーカーの定量

4週間の観察期間中、マイクロCTにより欠損部の治癒状態を3次元画像にて観察する。

また、1、2週目に各群6頭安楽死を行い、治癒過程にある欠損部組織でのeNOS、血管内皮成長因子(VEGF)などの血管新生関連マーカー、TGF- β 、PDGFなどの成長因子や、 α 1型コラーゲン、Runx2、OCN、Osxなどの骨代謝マーカーのmRNA発現レベルをリアルタイムPCR法にて計測する。

4週目に安楽死を行った個体では、連続組織切片によるセメント質の再生量の計測を行い、また新生血管や新生骨に関して上記のマーカーにより免疫染色を行う。

4-2) インプラント周囲組織の観察とオッセオインテグレーション強度の評価

抜歯窩の骨形成量の確認を抜歯後の4週目に、右図のように、マイクロCTにより3次元画像にて観察し、bone volume (BV), cancellous bone volume (CBV), bone mineral density (BMD)などの定量値を比較する。

インプラント治療後1か月に同部位の各群6頭の組織切片を作製し、Bone-Implant contactを計測、また別の各群6頭のインプラントを用いてpush-out試験を行い、力学的なインテグレーション強度の測定を行う。

なお本研究は東京医科歯科大学動物実験委員会に「糖尿病モデルラットにおいてインスリンが抜歯窩治癒と歯科用インプラントのオッセオインテグレーションに及ぼす影響の検討」(承認番号A2018-331A)として承認を得ており、同委員会の規定に則り実験を行った。

4. 研究成果

本研究は、高血糖状態が酸化ストレスを介して糖尿病ラットの口腔内インプラントのオッセオインテグレーション障害を引き起こす可能性を示した初めての研究である。近年、ROSの過剰発現による酸化ストレスの亢進が骨量の減少や骨質の劣化を招くことがわかってきた。in vivo実験では、DM群のインプラント周囲骨において炎症マーカーや酸化ストレスマーカーが有意に増加した。この結果から糖尿病状態ではSOD1による酸化ストレスからの保護作用が減少するために、インプラント埋入後の骨代謝に影響を及ぼし、オッセオインテグレーションを阻害する可能性が示唆された。in vitro実験において、HG条件下でROSの発現が増加し、細胞増殖能が低下した。また石灰化結節形成が有意に低下した。一方で抗酸化剤のNACを投与すると、HG条件により阻害された細胞増殖能と石灰化能が促進された。この結果から、HG条件によるBMMSCsの増殖能および石灰化能の抑制はROSを介して行われ、糖尿病状態におけるオッセオインテグレーションの障害に関与することが示唆された。

糖尿病による酸化ストレスがBMMSCsの細胞増殖能と石灰化能を減少させ、インプラントの顎骨へのオッセオインテグレーションを阻害し、インプラントの予後悪化につながる可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saito Natsumi, Mikami Risako, Mizutani Koji, Takeda Kohei, Kominato Hiromi, Kido Daisuke, Ikeda Yuichi, Buranasin Prima, Nakagawa Keita, Takemura Shu, Ueno Takeshi, Hosaka Keiichi, Hanawa Takao, Shinomura Tamayuki, Iwata Takanori	4. 巻 57
2. 論文標題 Impaired dental implant osseointegration in rat with streptozotocin induced diabetes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 412 ~ 424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12972	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 該当する

1. 著者名 Mizutani Koji, Buranasin Prima, Mikami Risako, Takeda Kohei, Kido Daisuke, Watanabe Kazuki, Takemura Shu, Nakagawa Keita, Kominato Hiromi, Saito Natsumi, Hattori Atsuhiko, Iwata Takanori	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of Antioxidant in Adjunct with Periodontal Therapy in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1304 ~ 1304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10081304	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 該当する

1. 著者名 Takeda Kohei, Mizutani Koji, Matsuura Takanori, Kido Daisuke, Mikami Risako, Buranasin Prima, Saito Natsumi, Kominato Hiromi, Takemura Shu, Nakagawa Keita, Iwata Takanori	4. 巻 -
2. 論文標題 Antioxidant effect of enamel matrix derivative for early phase of periodontal tissue regeneration in diabetes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	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) 10.1002/JPER.21-0413	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 該当する

1. 著者名 Mizutani Koji, Shioyama Hidehiro, Matsuura Takanori, Mikami Risako, Takeda Kohei, Izumi Yuichi, Aoki Akira, Iwata Takanori	4. 巻 online ahead
2. 論文標題 Periodontal regenerative therapy in patients with type 2 diabetes using minimally invasive surgical technique with enamel matrix derivative under 3 year observation: A prospective cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 online ahead
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JPER.20-0590	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 Kominato Hiromi, Takeda Kohei, Mizutani Koji, Mikami Risako, Kido Daisuke, Buranasin Prima, Saito Natsumi, Takemura Shu, Nakagawa Keita, Nagasawa Toshiyuki, Iwata Takanori	4. 巻 93
2. 論文標題 Metformin accelerates wound healing by Akt phosphorylation of gingival fibroblasts in insulin resistant prediabetes mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 258 ~ 270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JPER.21-0362	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 齋藤 夏実, 三上 理沙子, 水谷 幸嗣, 武田 浩平, 小湊 広美, 城戸 大輔, 池田 裕一, 中川 佳太, 竹村 修, 上野 剛史, 保坂 啓一, 埴 隆夫, 篠村 多摩之, 岩田 隆紀
2. 発表標題 糖尿病による歯科用インプラントのオッセオインテグレーションの低下
3. 学会等名 第64回 春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Risako Mikami, Koji Mizutani, Takanori Matsuura, Daisuke Kido, Yoshiyuki Sasaki, Takanori Iwata
2. 発表標題 The impact of diabetes on periodontal parameters in Japanese hemodialysis patients: A cross-sectional study
3. 学会等名 105th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Kido, Koji Mizutani, Yuichi Izumi, Hiroshi Nitta
2. 発表標題 INSULIN RESISTANCE IMPROVEMENT WITH PERIODONTAL TREATMENT IN TYPE - 2 DIABETIC PATIENTS WITH LOCALIZED, SEVERE CHRONIC PERIODONTITIS
3. 学会等名 American Academy of Periodontology 105th ANNUAL MEETING (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小湊広美, 水谷幸嗣, 武田浩平, 城戸大輔, 三上理沙子, 齋藤夏実, 竹村 修, 中川佳太, 岩田隆紀
2. 発表標題 高脂肪食誘発型糖尿病マウスにおける歯肉創傷治癒に対するメトホルミン投与の効果
3. 学会等名 第154回日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Mizutani
2. 発表標題 nnovations in Periodontics: Minimally Invasive Approach for Periodontal Tissue Regeneration in Patients with Diabetes.
3. 学会等名 The 106th Annual meeting American Academy of Periodontology. (国際学会)
4. 発表年 2022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	上野 剛史 (Ueno Takeshi) (30359674)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授 (12602)	

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		
タイ	シーナカリンウィロート大学		