

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19061

研究課題名（和文）インプラント周囲炎に対するプロバイオティクス・アプローチの確立

研究課題名（英文）Probiotic preventative approach for peri-implantitis

研究代表者

蓮池 聡 (HASUIKE, Akira)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：60636413

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：インプラント周囲炎は生物学的合併症に分類され、インプラントの予後に大きな影響を与える。本研究の目的はインプラント周囲炎の細菌学的要因と生体異物反応の両方に同時にアプローチできる治療法を開発することである。本研究結果より、インプラント周囲の微小チタン顆粒が炎症を惹起し、骨芽細胞におけるCol1aの遺伝子発現を低下させ、IL-1aの遺伝子発現を増加させた。またデータベースの解析により、IL6、TLR4、FN1、IL1、CXCL8、MMP9、SPP1の関与が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インプラント周囲炎に対するアプローチは未だ確立しておらず、従来の歯周病治療と同様な非外科・外科治療および予防処置が行われている。これらは細菌学的要因に対するアプローチである。しかしながら、インプラント周囲炎は細菌感染症という側面に加え、生体異物反応という側面も有することから、細菌学的要因と生体異物反応の両方に対するアプローチの開発が急務である。本研究結果より、骨芽細胞のチタン顆粒への反応が検証され、骨代謝に影響を与えることが示された。このことは今後のインプラント周囲炎の予防・治療に大きな影響を与えるであろう。

研究成果の概要（英文）：Peri-implantitis is classified as a biological complication and has a significant impact on implant prognosis. The purpose of this study was to develop a treatment that can simultaneously approach both bacteriological factors and biological foreign body reactions of peri-implantitis. The results of this study showed that peri-implant microtitanium granules induced inflammation, decreased gene expression of Col1a in osteoblasts, and increased gene expression of IL-1a. Database analysis also confirmed the involvement of IL6, TLR4, FN1, IL1, CXCL8, MMP9, and SPP1.

研究分野：歯科インプラント学

キーワード：インプラント周囲炎 骨代謝 骨芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インプラント周囲炎は生物学的合併症に分類され、インプラントの予後に大きな影響を与える。歯科インプラント治療の普及に伴い、有病者は急増しているものの治療法は確立されていない。インプラント周囲炎は歯周病同様な細菌感染症であると考えられてきた。近年では、これに加え、生体異物反応の関与も着目されている。チタンは不動態を纏うため、高い生物学的安定性を有する。しかし「インプラント-アバットメント界面において、チタン磨耗粉が発生する。」(Stimmelmayer M et al. Dent Mater, 2012)、「インプラント周囲炎罹患軟組織においてチタン成分が高頻度で検出される。」(Wilson TG Jr et al. J periodontol, 2015)といった報告が近年散見されるようになり、「細かい顆粒状となったチタンを宿主マクロファージが貪食することを発端として、炎症反応がスタートする」という仮説は否定できない(図1)。整形外科領域では、この現象は骨溶解現象(オステオライシス)として問題視されており、人工関節置換術後の周囲骨溶解を引き起こすことが知られている。

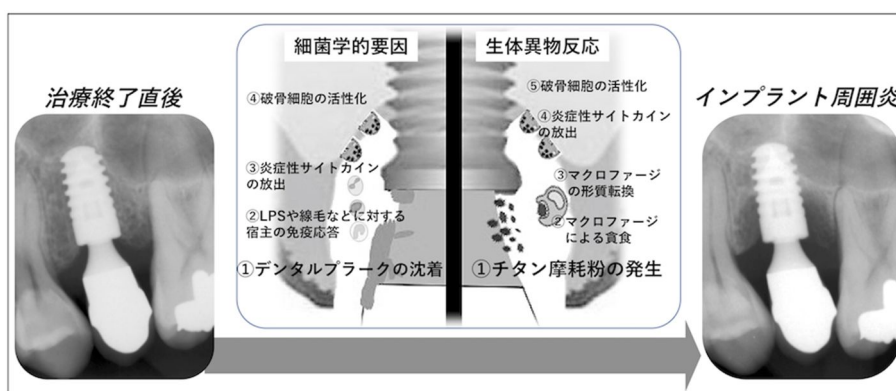


図1. インプラント周囲炎の病因論における生体異物反応

申請者はこの点に着目し、ラット実験モデルを用いて、チタンの微細顆粒がインプラント周囲骨吸収に及ぼす影響を検証した(若手研究(B)16K21408、2016-2017年度、チタン顆粒オステオライシスによるインプラント周囲骨吸収メカニズムの解析(研究代表者: 蓮池 聡)。ラットの上顎臼歯を抜去し、そこにチタン製インプラントを埋入し、インプラントプラットフォーム周囲にチタン顆粒を散布した。その結果、マイクロCTならびに硬組織研磨標本において、インプラント周囲に骨吸収像が確認された。すなわち、インプラント周囲炎の病因にチタン顆粒オステオライシスが関与していることが示された。インプラント周囲炎に対するアプローチは未だ確立しておらず、従来の歯周病治療と同様な非外科・外科治療および予防処置が行われている。これらは細菌学的要因に対するアプローチである。我々の研究結果が示すとおり、インプラント周囲炎は細菌感染症という側面に加え、生体異物反応という側面も有することから、細菌学的要因と生体異物反応の両方に対するアプローチの開発が急務である。

2. 研究の目的

本研究の目的はインプラント周囲炎の細菌学的要因と生体異物反応の両方に同時にアプローチできる治療法を開発することである。本研究では“乳酸菌によるプロバイオティクス”に着目する。プロバイオティクスとは、「宿主に有益に働く生きた細菌によって構成される添加物」と定義され、歯周病治療において臨床応用されている。口腔内フローラを改善し、歯周病に罹患しにくい口腔内環境を形成する。インプラント周囲炎治療においても、細菌学的病因論に基づいてプロバイオティクス応用の試みが始まっている (Tada H et al. J Prosthodont Res、2018)。

一方、整形外科学研究では、様々な骨関連疾患におけるプロバイオティクスの有効性が報告されている。閉経後骨粗鬆症や糖尿病性骨粗鬆症では、骨量減少の抑制効果が示されている。また、人工関節周囲オステオライシスに関する研究では、「ポリエチレン顆粒を貪食したマクロファージの炎症反応を乳酸菌は消退させる。」(Esvaran M et al. BMC Res Notes、2018) という報告や「マウス頭蓋骨に CoCrMO 顆粒を散布し、オステオライシスを引き起こした際、乳酸菌の全身投与は骨溶解を抑制した。」(Wang Z et al. Int J Nanomedicine、2017) という報告がみられ、骨の生体異物反応の抑制に対する乳酸菌プロバイオティクスの有効性が示されている。このメカニズムとして、骨芽細胞の遺伝子発現変化、微細チタン顆粒を貪食した単球系細胞の M1 マクロファージへの形質転換を乳酸菌は抑制し、M2 マクロファージの存在比を高めることで TNF- α や IL-6、IL-1 などの炎症性サイトカインの放出が抑制され、破骨細胞分化抑制・骨芽細胞成熟化が進むとされる。

乳酸菌によるプロバイオティクスによって、インプラント周囲炎の 2 つの異なる病因に同時にアプローチするという点において、本研究の学術的創造性は極めて高い。また、インプラント周囲炎に対する治療方法の開発は急がれるため、本研究の社会的意義は極めて高い。

3. 研究の方法

(1) 疫学的検証

2003 年 6 月から 2018 年 5 月までに歯周病専門医に埋入されたインプラント 77 本におけるインプラント周囲炎罹患への関与因子の検証をおこなった。35 名の患者に合計 77 本のインプラントが検証された。組み入れ基準は以下の通りであった。 歯科埋入当日の年齢が 50 歳以上、陽極酸化インプラントによる 2 段階歯科インプラント埋入、上部構造装着後 6 カ月以上の SPT を行った。インプラントは臨床的および放射線学的にフォローアップされ、インプラント周囲の軟組織パラメータのプロビングポケットの深さ、プロビング時の出血、modified plaque index、およびマージナルインプラント周囲の骨レベルの安定性を検証した。

(2) 遺伝子データベースによる検証

遺伝子発現データベースである NCBI GEO(Gene Expression Omnibus)を用いて、インプラント周囲炎罹患患者および健常対照者の口腔内組織 サンプルのトランスクリプトーム解析遺伝子発現データセットの抽出を行った。

(3) 細胞生物学的検証

細胞生物学的検証ではマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いる。市販のチタン微小顆粒 (平均直径 3.23 μm) を PBS に希釈し、滅菌した。チタン微小顆粒濃度が 0.1mg/ml となるように細胞培養液を調整し、この培養液にて細胞を 12 時間通常培養条件にてインキュベートする。そこに乳酸菌(*Lactobacillus paracasei*) から生成された培養上清から超遠心分離法により EV 画分を精製したものを作用させた。Real-time PCR 法を用い、遺伝子の発現を検証する。

4. 研究成果

(1) 疫学的検証

インプラント周囲炎アウトカムに対しては、疫学的検証では全身疾患の影響が大きく、上部構造に関係する因子、チタン顆粒との関連性を疑う要因は見当たらなかった。

(2) 遺伝子データベースによる検証

バイオインフォマティクス解析により、インプラント周囲炎の遺伝子バイオマーカーおよびインプラント周囲炎の治療標的遺伝子の可能性を検討した。Gene Expression Omnibus (GEO)より GSE33774 マイクロアレイデータセットをダウンロードし、GEO2R ツールにてインプラント周囲炎と健常歯肉組織間の差次的発現遺伝子 (DEG) を同定した。その結果、インプラント周囲炎群と健常群との間で 205 の DEG を認めた。IL6、TLR4、FN1、IL1、CXCL8、MMP9、SPP1 などがインプラント周囲炎の遺伝子バイオマーカーおよび標的遺伝子として期待できることが明らかとなった。

(3) 細胞生物学的検証

MC3T3-E1 細胞に Ti 顆粒、Ti 顆粒 + LPS を作用させた。その結果、qPCR による遺伝子発現に変化が認められた。特に Col1a の遺伝子発現は 1 日目において、Ti 顆粒の添加により有意に減少した(図 2)。一方、炎症性サイトカインである IL-1a は Ti 顆粒の添加にて有意に増加した(図 2)。

この実験系に *Lactobacillus paracasei* から生成された培養上清から超遠心分離法により EV 画分を精製したものを作用させた。結果、骨形成阻害作用の減弱傾向が認められたものの、統計学的有意差は認められなかった。この検証においては、濃度などの条件設定を見直し、継続的な研究が必要である。

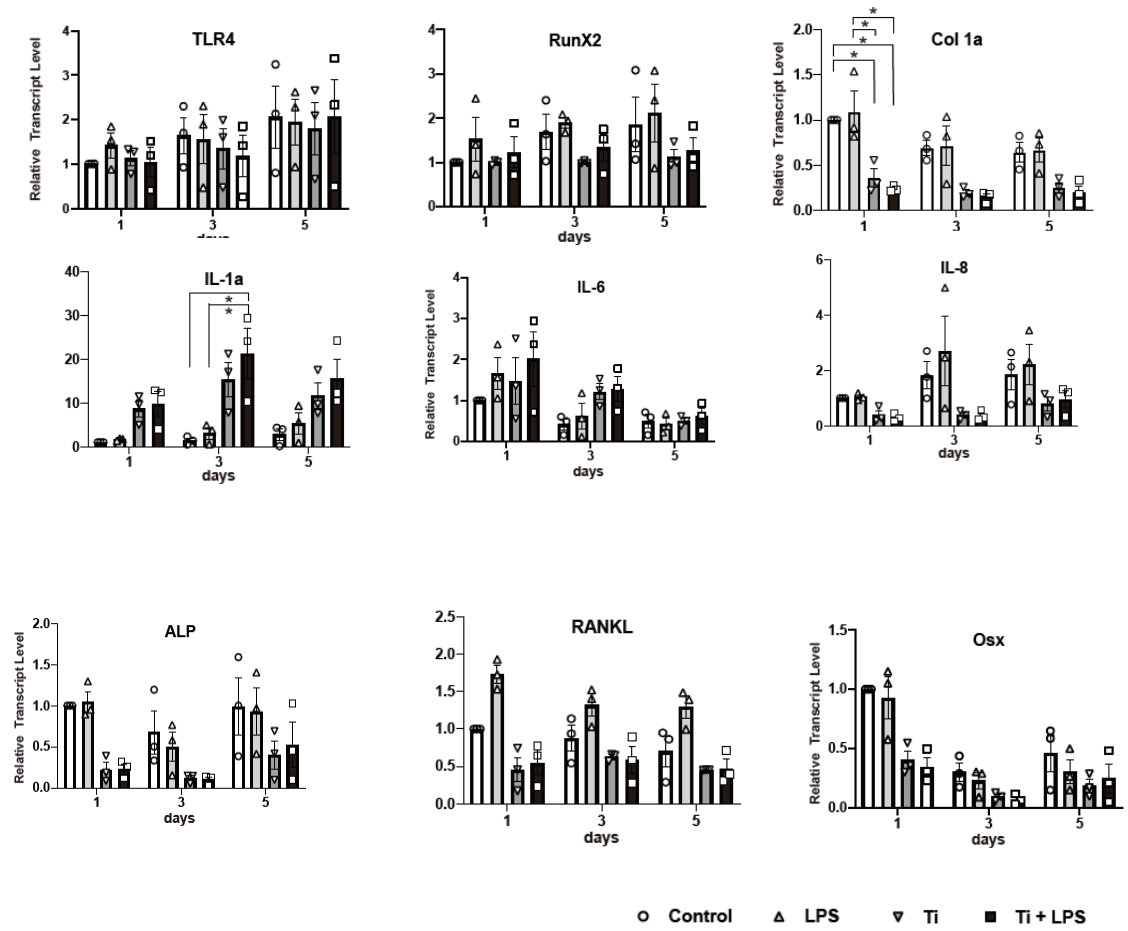


図 2. MC3T3-E1 に Ti 顆粒を作用させた場合の q-PCR 遺伝子発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Keisuke Seki, Akira Hasuike, Yoshihiro Iwano, Yoshiyuki Hagiwara	4. 巻 6(1)
2. 論文標題 Influence of antihypertensive medications on the clinical parameters of anodized dental implants: a retrospective cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Implant Dentistry	6. 最初と最後の頁 32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40729-020-00231-9	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 Yoshino H, Hasuike A, Sanjo N, Sato D, Kubota T, Nagashima H, Sato S	4. 巻 34
2. 論文標題 CO2 Laser De-epithelization Technique for Subepithelial Connective Tissue Graft: A Study of 21 Recessions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 869-875
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.11851	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 MOTOKI SENOO, AKIRA HASUIKE, TAKANOBU YAMAMOTO, YASUMASA OZAWA, NORIHISA WATANABE, MITSUAKI FURUHATA, SHUICHI SATO	4. 巻 36
2. 論文標題 Comparison of Macro-and Micro-porosity of a Titanium Mesh for Guided Bone Regeneration: An In Vivo Experimental Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 76-85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.12678	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0件

〔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
---------	---------