

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18642

研究課題名（和文）材料学的及び生物学的因子によるインプラント周囲炎の病態機序の解明と治療法の模索

研究課題名（英文）Elucidation of pathomechanisms of peri-implantitis by material and biological factors and search for treatment methods

研究代表者

菅原 志帆（Sugawara, Shiho）

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：20804363

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）：インプラント周囲炎の増悪因子を探索するため、ナノチタニアとPgLPS添加による歯肉上皮細胞（Ca9-22）の炎症応答性について検討を行った。PCRおよびELISA法により、IL-6、IL-8は、ナノチタニア添加で有意に増加し、PgLPSによってさらに増加した。IL-11も、ナノチタニア添加で有意に増加した。また、免疫蛍光染色により、IL-13 2受容体の発現が増加し、IL-13の刺激によりTGF- $\beta$ 1の発現が増強されることが確認された。以上より、ナノチタニアはインプラント周囲の骨吸収の進行を促進する可能性があり、歯周病原性細菌の存在により病態を悪化させる可能性があることが示唆された。

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関して、生物学的因子の観点から考察した論文は非常に多く報告されているが、材料学的因子から考察したものは少なく、インプラント周囲に炎症を引き起こす伝達回路の詳細も解明されていない。それ故に、インプラント周囲炎に対する確立させた診断法と治療法は無いのが現状である。もし、この伝達経路の詳細が明らかとなれば、その遮断方法の検討も現実的なものとなり、阻害薬/遮断薬の開発に資し、インプラント周囲炎の治療法の確立につながり、インプラント周囲炎で苦しむ多くの患者に対する治療の一助となり得る。また、インプラント治療の長期安定性に寄与することができ、社会的貢献度は大きい。

研究成果の概要（英文）：In order to search for aggravating factors of peri-implantitis, the inflammatory responsiveness of gingival epithelial cells (Ca9-22) to titanium nanoparticles and PgLPS was investigated.

PCR and ELISA assays showed that IL-6 and IL-8 were significantly increased by the addition of titanium nanoparticles and further increased by PgLPS. Immunofluorescence staining confirmed that IL-13 2 receptor expression was increased and TGF- $\beta$ 1 expression was enhanced by IL-13 stimulation. These results suggest that titanium nanoparticles, may accelerate the progression of bone resorption around implants, and that the presence of periodontopathogenic bacteria may exacerbate the condition.

研究分野：補綴系歯学関連

キーワード：インプラント周囲炎 ナノチタニア LPS 細胞内シグナル伝達 炎症性サイトカイン

### 1. 研究開始当初の背景

インプラント治療における合併症で多く見られるものとして、インプラント周囲炎があり、その病態および治療法について様々な検討がなされている。しかし、その発症メカニズムや治療法に関して確固たるコンセンサスを得られたものはない。インプラント周囲炎罹患率は、28～56 % (Jan Linde. J Clin Periodontol 2008) にものぼり、看過できない事態となっている。

インプラント周囲炎が、歯周炎と同様に口腔内のプラーク細菌叢が原因となり引き起こされているのは周知の事実である。しかしながら、近年、チタンインプラントの腐食や変色、チタンアレルギー (Sammy Noumbissi. Materials 2019) などの報告が増えてきており、インプラント周囲炎との関連が報告されている (M. Noronha Oliveira. J Periodont Res 2018)。歯科用インプラント材料とし優れた実績を有しているチタンは、表面に厚さ約 4 nm の強固な不動態膜である酸化チタン層を形成しており、イオン化されにくく耐食性に非常に優れ、欠損補綴材料として

幅広く使用されている。しかし、インプラントが置かれている口腔内の環境は、唾液の存在や咬合力の負荷など様々な要因が複雑に絡み合い極めて過酷である。また、バイオフィーム存在下は強酸性となり、炎症に伴って浸潤してきた好中球は活性酸素を出すことが知られている。特に、インプラントアバットメント部では、歯科用金属(チタン)と生体との接触が密接で物理的及び化学的な反応が生じ、チタンから脱落物(埋入時破片、咬合時脱落片、溶出後析出物)を生じさせる可能性がある。インプラント周囲炎は口腔細菌が主因ではあるが、これまで検討されてこなかったこれらの脱落物、特に、溶出後析出物に対して、生体防御に関わる細胞による生体反応(例、マクロファージによる炎症性サイトカイン産生)が生じ、顎骨を含む歯周組織の破壊に関与している可能性がある (Fig.1)。

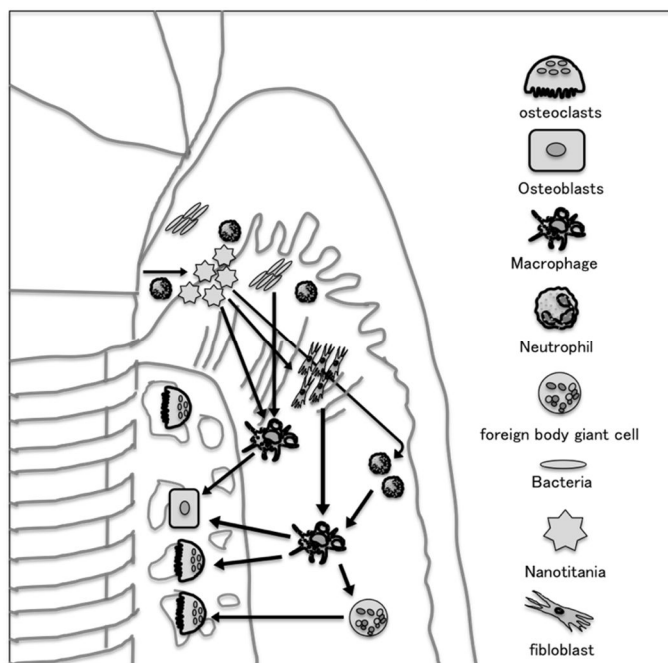


Fig.1

### 2. 研究の目的

インプラント周囲炎の増悪因子を探索するため、ナノチタニアと *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS (PgLPS) 添加による歯肉上皮細胞の炎症応答性について検討した。

### 3. 研究の方法

歯肉上皮細胞モデルとして Ca9-22 細胞を用い、ナノチタニア単独または PgLPS と共培養した。サイトカインの発現について、逆転写定量的 PCR および ELISA 法を用いて検討した。また、ナノチタニアの細胞内への取り込みは、走査型電子顕微鏡で観察した。

IL-13 2 受容体と TGF- 1 の mRNA 発現について、免疫蛍光染色および RT-qPCR を用いて検討した。

### 4. 研究成果

Ca9-22 細胞において、IL-6 および IL-8 の発現は、ナノチタニア単独処理で有意に増加し、PgLPS の存在下でさらに増加した (Figure 2)。ナノチタニアは、用量および時間依存的に Ca9-22 細胞に取り込まれることが観察された (Figure 3)。さらに、骨吸収に関わる IL-11 の発現を調べたところ、ナノチタニア単独での刺激で有意な上昇が確認された (Figure 4)。

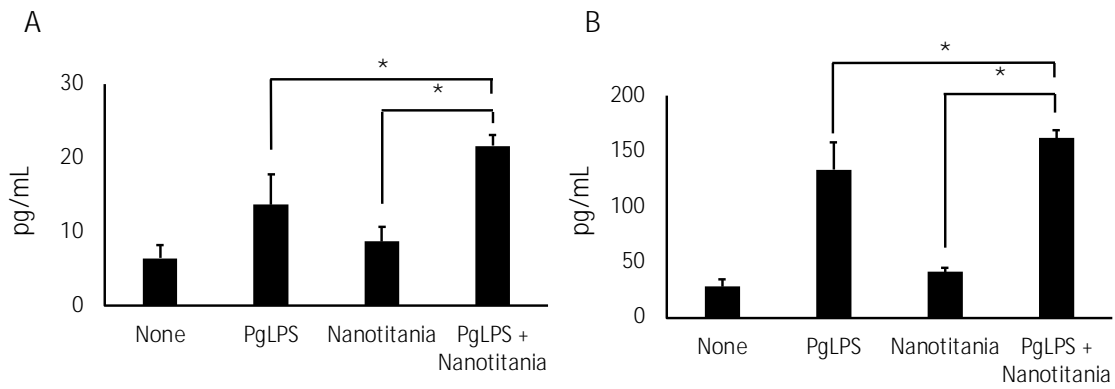


Fig.2 Protein levels of IL-6 (A) and IL-8 (B) were measured by ELISA after incubation with 10g/mL PgLPS,10g/mL nanotitania and both stimulants together. Each data point indicates the average of six gene expression quantification results (n = 6). Bars indicate standard deviation, and asterisks indicate p < 0.05.

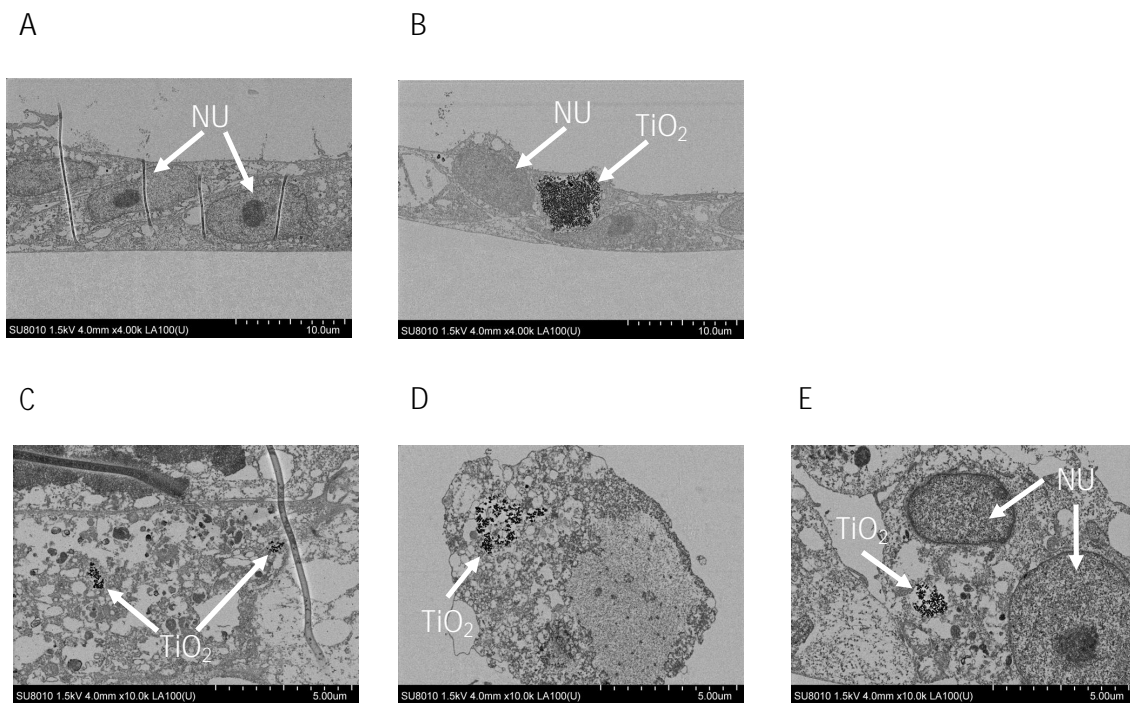


Fig.3 Scanning electron microscopy (SEM) images of Ca9-22 cells. (A) Control, (B) incubation with 100g/mL nanotitania for 1h, (C) incubation with 10g/mL nanotitania for 1h, (D) incubation with 10g/mL nanotitania for 12h, (E) incubation with 10g/mL nanotitania for 24h. NU, nucleus;TiO<sub>2</sub>, nanotitania.

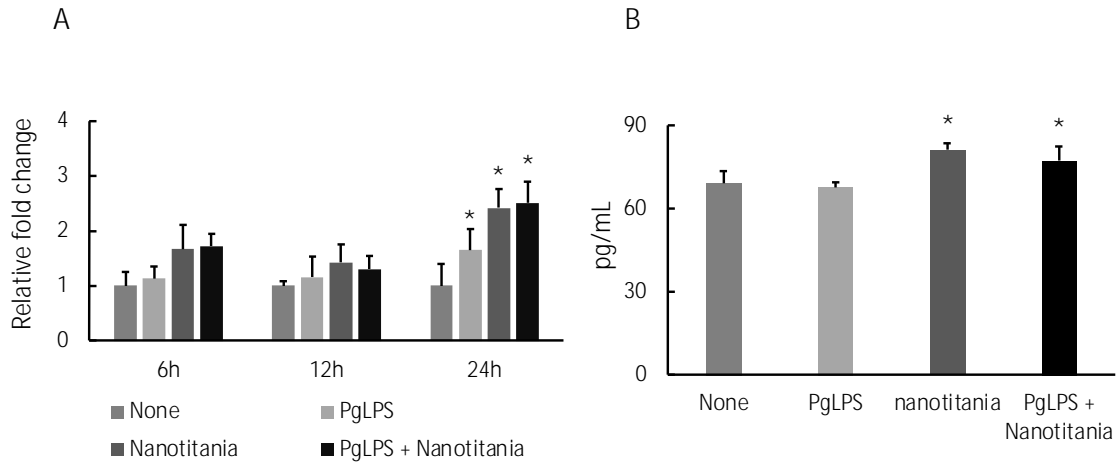


Fig.4 Expression levels of IL-11 mRNA (A) and protein levels (B) of IL-11 were measured by qPCR or ELISA, respectively, after incubation with 10g/mL PgLPS, 10g/mL nanotitania and both stimulants together. Each data point indicates the average of six gene expression quantification results (n = 6). Bars indicate standard deviation, and asterisks indicate p < 0.05.

160 個の遺伝子発現のうち、IL-13 2 受容体をコードする *IL-13RA2* の発現が最も高かった (Fig.5)。また、免疫蛍光染色により、IL-13 2 受容体の発現が増加し、IL-13 の刺激により TGF-1 の発現が増強されることが確認された (Fig.6)。したがって、ナノチタニアがインプラント周囲の歯肉上皮に接触すると、IL-13 2 受容体の発現が増加する可能性があり、その結果として骨吸収に関与する破骨細胞の分化を促進することが知られている TGF-1 の分泌を促進し、歯周組織に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。

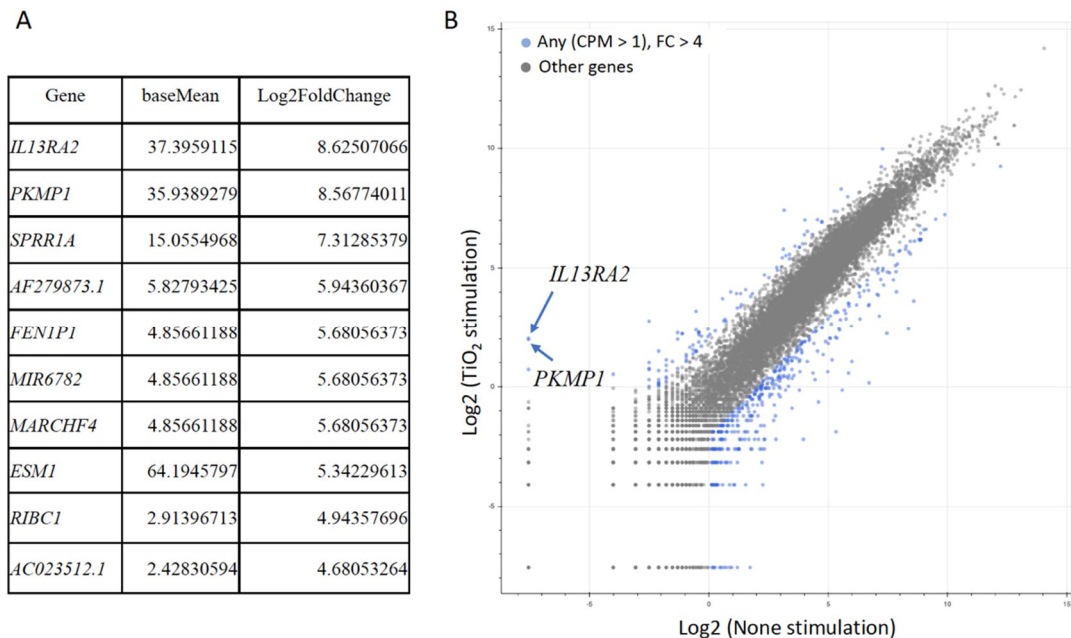


Fig.5 Gene and promoter expression induced by titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanomaterials. Top 10 upregulated genes in Ca9-22 cells cocultured with TiO<sub>2</sub> nanomaterials (A). Bokeh scatter plot of gene expression (B); X-axis showing the log2 fold change of gene expression in the control and the Y-axis showing the log2 fold change of gene expression in cells cocultured with TiO<sub>2</sub> nanomaterials. CPM, count per million; FC, fold change

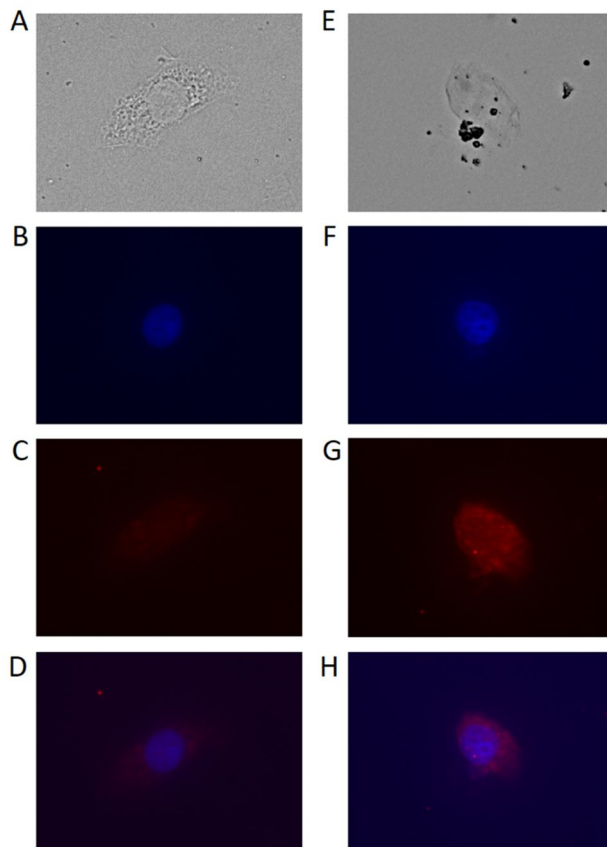


Fig. 6 Immunofluorescence staining for the expression of IL-13 receptor. Control Ca9-22 cells (A-D) and Ca9-22 cells under coculture with 10 µg/mL of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanomaterials (E-H) for 24h. Phase contrast microscopy (A and E), immunofluorescence staining (B and F), nuclear counterstaining (C and G), and combined immunofluorescence staining and nuclear counterstaining (D and H) images. Scale bar: 20 µm

より、ナノチタニアはインプラント周囲の骨吸収の進行を促進する可能性があり、歯周病原性細菌 *P. gingivalis* の存在により病態を悪化させる可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Ishikawa Taichi, Sugawara Shiho, Kihara Hidemichi, Hanasaka Tomohito, Hatakeyama Wataru, Sasaki Minoru, Kondo Hisatomo	4. 巻 63
2. 論文標題 Titanium nanoparticles potentially affect gingival tissue through IL-13 2 receptor expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 263-266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.21-0130	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 Sugawara Shiho, Ishikawa Taichi, Sato Shu, Kihara Hidemichi, Taira Masayuki, Sasaki Minoru, Kondo Hisatomo	4. 巻 22
2. 論文標題 Uptake of Nanotitania by Gingival Epithelial Cells Promotes Inflammatory Response and Is Accelerated by Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide: An In Vitro Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8084 ~ 8084
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22158084	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅原志帆、石河太知、武本真治、近藤尚知
2. 発表標題 歯肉上皮細胞培養系におけるLPS刺激時の時間依存性炎症応答
3. 学会等名 日本補綴歯科学会 第129回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅原 志帆, 鬼原 英道, 吉田 大地, 星 美貴, 西尾 俊彦, 間瀬 慎一郎, 平 雅之, 近藤 尚知
2. 発表標題 LPSとチタン粒子を作用させた歯肉上皮細胞の時間依存性炎症応答
3. 学会等名 第50回日本口腔インプラント学会記念学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅原 志帆
2. 発表標題 LPSとチタン粒子を作用させた歯肉上皮細胞の生化学的応答
3. 学会等名 第46回岩手医科大学歯学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------