

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592895

研究課題名(和文) オッセオインテグレーション阻害因子の解明と臨床応用への展開

研究課題名(英文) Investigation of the inhibitory factors in osseointegration for the clinical application.

研究代表者

堀内 留美(Horiuchi, Rumi)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：10374274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、デンタルインプラントの微小動揺によるオッセオインテグレーションの阻害機構を、遺伝子発現パターンの解析および遺伝子翻訳産物の添加実験から解明することを目的としている。DNAマイクロアレイ法を用いた網羅的検索から、オッセオインテグレーション獲得および非獲得ラットモデルそれぞれに特徴的な遺伝子の発現パターンが存在することが明らかとなった。また、その遺伝子をもととしたオッセオインテグレーション関連タンパク質を、GRP-tagアフィニティ精製システムを用いて簡便かつ純度良く精製することができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have set up the hypothesis that micro-movement by loose fit implant induces the expression of genes involved in preventing osseointegration. In order to identify the genes involved in micro-movement, we performed whole genome microarray analysis of the tissues around the titanium implants in a model rat of acquired and non-acquired osseointegration. The microarray data suggested the existence of the group of genes involved in bone formation induced from the success of osseointegration, while that of the group of genes involved in failure of osseointegration. To investigate the relationship between those gene products and success/failure of osseointegration, we produced proteins as the factors to ensure success of osseointegration and proteins as one of the factors to prevent osseointegration, by using GRP-tag affinity purification system.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：オッセオインテグレーション マイクロアレイ チタンインプラント

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラント治療は、欠損補綴に対する有効な治療法の選択肢の一つであり、現在では 90%以上の成功率を収めている。しかし、数%のインプラント症例において、オッセオインテグレーションが獲得されずしかもその原因が判明しない場合がある。初期治癒期間にインプラントと周囲骨の間に結合組織が侵入しオッセオインテグレーションが獲得されないと、最終的にインプラント体が骨と結合し難くなり、インプラントを除去しなければならない事態となる。

オッセオインテグレーションを左右する因子には様々なものがあり、複雑に絡み合っているとされる。その中には、不十分な初期固定により引き起こされる微小動揺がオッセオインテグレーションの獲得を阻害しているという報告があるが、一方である程度の微小な動きはオッセオインテグレーションをむしろ促進するとの報告もある。しかし、未だにその分子レベルでのメカニズムの詳細は明らかではない。

我々は、インプラントの微小動揺時に発現する特定の遺伝子セットが、オッセオインテグレーション獲得を阻害する要因になっていると考え、ラット大腿骨に埋入したチタンインプラントモデルについて、DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子解析を行い、21 年度より科研費(基盤研究(C)研究課題番号: 21592488)において、次のようなプレリミナリーな結果を得ている。

- (1) *in vivo* におけるオッセオインテグレーション獲得・非獲得に関するインプラントモデルの作製条件を決定した。そして、モデルそれぞれの組織学的差異を見出すことに成功した。
- (2) インプラント埋入 1 週後の発現遺伝子の網羅的検索において、オッセオインテグレーションが獲得されたモデルでは、数種の骨形成に関与する遺伝子が特異的に発現していた。また、非獲得モデルにおいても特異的に発現している数種の遺伝子を見出した。

今回、我々は、ラット大腿骨に埋入したチタンインプラントモデルを用いて、より初期治癒過程においてインプラント周囲に発現する遺伝子を DNA マイクロアレイにより検索し、これまでのデータとあわせ、主要な発現遺伝子を絞り込み、さらに *in vitro* におけるインプラントモデル実験系を構築して、それらの遺伝子の骨形成への関与についての検証を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯科インプラント治療におけるオッセオインテグレーションの獲得に影響する遺伝子の解明を、*in vitro* および *in vivo* において推し進め、その遺伝子情報を臨床応用に展開することにより、インプラント初期治癒過程におけるより確実なオッ

セオインテグレーションを獲得することである。

3. 研究の方法

(1) インプラントモデルの製作

材料: 99.5%チタン線 (1.0mm & 0.8mm)

方法: 雄性 Fisher 系ラット(22 週齢)左側大腿骨に 1.0mm のインプラント窩を形成

- ・オッセオインテグレーション獲得モデル
O1 群: 1.0mm チタン線を埋入
- ・オッセオインテグレーション非獲得モデル
D1 群: 0.8mm チタン線を埋入
- ・control 群: 大腿骨骨膜剥離のみ

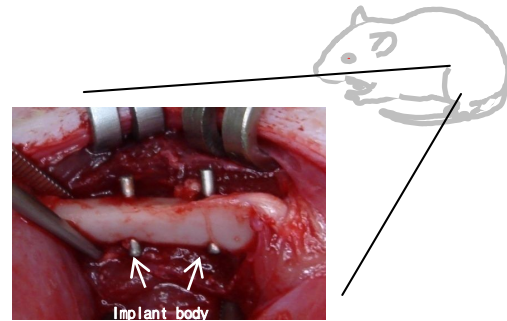


Fig.1 In vivo image after insertion of implant

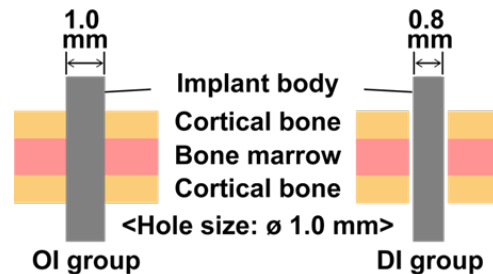


Fig.2 Ti implant model O1 and D1 group

埋入 3 日後および 1 週後にインプラント周囲組織を取り出し、顕微鏡による観察を行い、インプラント体および周囲の骨髄組織を total RNA 用として採取した。

(2) DNA マイクロアレイ解析

RNeasy Micro Kit (QIAGEN 社製) を用いて、インプラント周囲組織から精製した total RNA を、バイオアナライザー (Agilent 社製)、ND-1000 分光光度計 (Nano Drop 社製) を用いてサンプルの精度、濃度を確認した。

それぞれの cRNA を、Whole Rat Genome オリゴ DNA マイクロアレイ (4×44K) (Agilent 社製) に対してハイブリダイズし、蛍光スキャナーにより蛍光強度の測定を行った。得られた結果を Gene Spring GX (Agilent 社製) を用いて、オッセオインテグレーション成立初期に発現する遺伝子について解析を行った。

両群それぞれについて control 群に対し高い発現率を示した遺伝子については、多重比較補正 (Benjamini Hochberg FDR) ($p < 0.05$) を行った。

4. 研究成果

マイクロアレイ解析

1 週後のサンプルでは以下の結果を得た。

多重比較補正 (Benjamini Hochberg FDR) により OI 群特有発現遺伝子: 638 種、DI 群特有発現遺伝子: 381 種 が確認された。

このうち高発現の遺伝子は以下であった。

・ OI 群特有発現遺伝子

Spp1, Thbs2, Lox, Mamdc2, Aldh1l2, Dmp1, Dkk1, Dkk1, Vit, Prss35, Smpd3, Serpinf1, Col5a2, Mmp2, Bglap, Pdpn, Pla2g5, Enpp6 (7-fold, P-value:0.05)

・ DI 群特有発現遺伝子

C1qtnf3, Gabre, Olr1352, Myh1 (7-fold, P-value:0.05)

一方、3 日後のサンプルの解析結果では、発現率のばらつきが大きく、OI 群および DI 群ともに有意差をもって特異に発現している遺伝子は認められなかった。そこで、1 週後に認められた遺伝子について、骨形成に参与する遺伝子とし、今後の検証をするためのタンパク質生産を行った。

タンパク質生産

DNA マイクロアレイ解析で変化量の大きかった 2 種類の遺伝子 (Thbs2 および C1qtnf3) について、それらの翻訳産物の直接的な投与実験に向け、昆虫細胞を用いた組換えタンパク質の生産を行った。

・ Thbs2 : OI 群特有発現遺伝子

・ C1qtnf3 : DI 群特有発現遺伝子

(1) 組換えタンパク質のデザイン

遺伝子配列情報より、Thbs2 および C1qtnf3 はいずれも分泌シグナルをアミノ末端に含む。そこでアミノ末端側の精製用アフィニータグには、分泌シグナルを有する secGRP-tag を選択した。

Intact secretion signal of β GRP
-16 MYKTCVWVLLFKIVLC -1

1 YEAPPATLEA	11 IHPKGLRVSV	21 PDEGFSLFAF
31 HGKLNEMEG	41 LEAGHWSRDI	51 TKPKNGRWIF
61 RDRNAALKIG	71 DKIYFWTFVI	81 KDGLGYRQDN
91 GEWTVEGFVD	101 EAGNPVNTTEG	111 SEITPGVEF
β GRP(1-119)		

また、カルボキシル末端側には二段階精製のポリヒスチジンタグ (His-tag) を付加した。secGRP-tag の直後には配列特異的プロテアーゼの切断配列を含み、HRV3C プロテアーゼを作用させることで、secGRP-tag を除去することができる (Fig.3)。

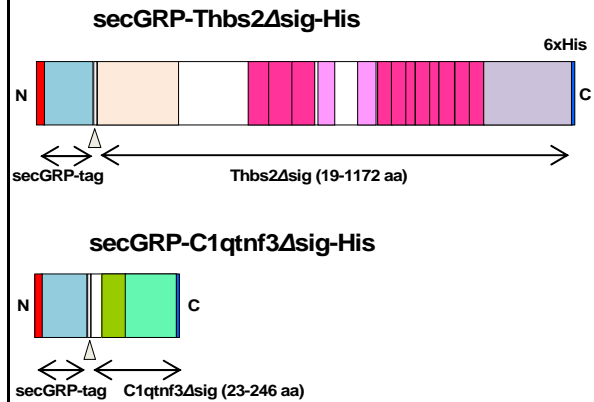


Fig.3 Schematic representation of the secGRP-Thbs2-His and secGRP-C1qtnf3-His proteins

(2) 発現およびアフィニティ精製

それぞれの組換えタンパク質の遺伝子を、Bac to Bac システム (Invitrogen 社) を用いてバキュロウイルスに組込んだ。この組換えバキュロウイルスを HighFive 細胞に感染させ、目的の組換えタンパク質の発現および培地中への分泌を行った。培地中からの組換えタンパク質のアフィニティ精製は次の流れで進めた (Fig.4)。

培地中に分泌された secGRP 融合タンパク質をカードランビーズに吸着させ、夾雑物を洗浄除去。

HRV3C プロテアーゼにより、目的タンパク質をビーズから切断。

目的タンパク質のカルボキシル末端のポリヒスチジンタグを利用して、Ni-NTA ビーズで 2 段階目のアフィニティ精製。

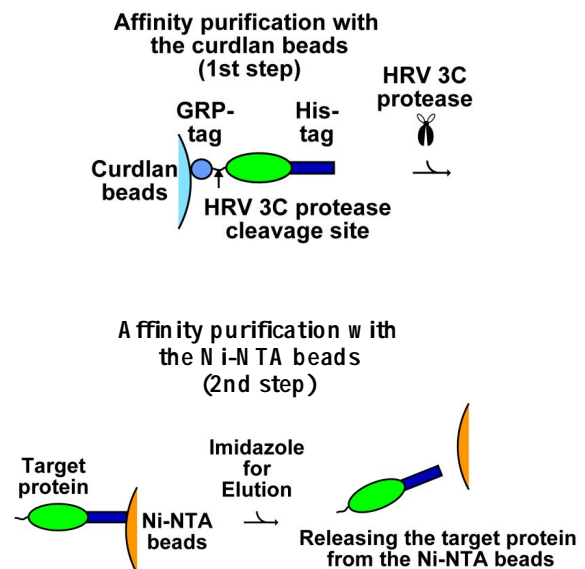


Fig.4 Two-step affinity purification for the fusion proteins containing both the secGRP-tag at the amino-terminal and the His-tag at the carboxyl terminal

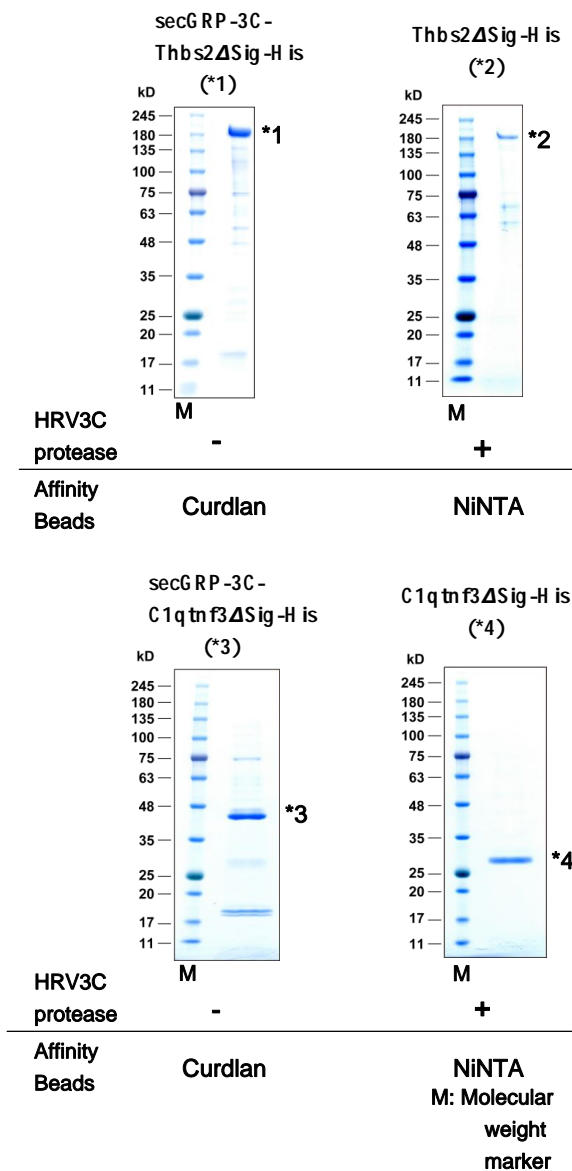


Fig.5 SDS-PAGE of Thbs2 and C1qtnf3 proteins purified by curd lan and NiNTA beads(Coomassie Brilliant Blue R250 staining)

(参考) カードランビーズについて

培地中に分泌された secGRP タグ融合タンパク質は、カードランビーズを用いてアフィニティー精製できる。

カードランビーズは直径 50 μm の中空の球状で、市販されている他のアフィニティービーズに比べて安価で、使い捨て可能という特徴を有する (Fig.6)。

カードランビーズは、カードランのアルカリ水溶液を、激しく攪拌された 1-ブタノールを含む酢酸水溶液に滴下することにより調製した。

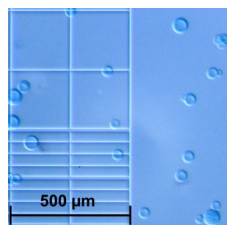


Fig.6 Curdlan beads

Fig.5 に示すように、Thbs2 および C1qtnf3 どちらにおいても、分泌された目的タンパク質は SDS-PAGE で高分子量側へシフトしており、糖鎖等の十分な修飾を受けていることが示唆された。

結論

- ・オッセオインテグレーションが獲得される場合には骨形成に関与する遺伝子が発現するが、オッセオインテグレーションを獲得できない場合には、多様な遺伝子が複雑に発現していることが示唆された。
- ・secGRP-tag を融合したオッセオインテグレーション関連タンパク質は昆虫細胞から培地中へ分泌され、その培地中にカードランビーズを直接加えることで、簡便かつ純度良く精製することができた。

今回探索をすすめたオッセオインテグレーションに関連する遺伝子の作用機序を解明するために、今後は *in vivo* 実験と整合性のある培養細胞による *in vitro* 実験系の開発も進めていく予定である。

この研究により、*in vivo* および *in vitro* の実験を通じて、インプラントを成功させるのに有効なオッセオインテグレーション関連因子を生物学的根拠に基づいて同定することができ、この因子を臨床のインプラント治療に応用することが可能になる。つまり、この因子のインプラント表面への応用や埋入手術時の使用により、安全で確実なインプラント治療をおこなうことにつながる。また、臨床的に厳しい状況においても、確実な初期固定が達成されるため、インプラント治療の予知性は向上するであろう。これまで困難とされていた症例や即時負荷を要する症例、オッセオインテグレーションを失って再度オッセオインテグレーションを図る症例などに応用することも考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計2件)

1. 堀内留美、堀内正隆、横山敦郎、オッセオインテグレーション獲得に関わるタンパク質の昆虫細胞を用いた生産、平成26年度日本補綴歯科学会東北北海道支部学術大会、2014年10月25日 - 2014年10月26日、市民交流プラザ(郡山市)

2. Masataka Horiuchi, Rumi Horiuchi,
Masanori Ochiai, Atsuro Yokoyama.
Investigation of the inhibitory factors
for osseointegration in the early stage
of the implantation. The 28th Annual
Symposium of The Protein Society.
2014.7.27 - 2014.7.30, Manchester Grand
Hyatt (San Diego, USA)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

堀内 留美 (HORIUCHI RUMI)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号：10374274

(2) 研究分担者

堀内 正隆 (HORIUCHI MSASATAKA)
北海道医療大学・薬学部・講師
研究者番号：90322825

横山 敦郎 (YOKOYAMA ATSURO)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：20210627