

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25253103

研究課題名(和文)ロコモティブシンドロームに対応した口腔インプラントの分子医学的治療戦略

研究課題名(英文)Molecularr Biological Approach to Oral Implant Treatment for Aged and Metabolically Compromized Patients

研究代表者

細川 隆司 (Hosokawa, Ryuji)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60211546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,700,000円

研究成果の概要(和文)：老化による非生理的コラーゲン架橋の増加によって易骨折性になると言われ、歯科インプラント治療におけるリスク因子となっている可能性に着目した。我々は、高ホモシステイン血症動物モデルを用いて、顎骨の脆性破壊強度に及ぼす影響を明らかにした。下顎骨に対するナノインデンテーション試験の結果、貯蔵弾性率および粘弾性は実験群が有意に低い値を示した。さらに異なる速度で負荷試験を行い、応力緩和評価をしたところ、実験群では形態回復による応力緩和の低下が認められた。以上より、AGEsは非生理的コラーゲン架橋として長管骨だけでなく顎骨の微小破壊に対する強度を低下させ、歯科インプラント治療に影響を及ぼす可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrate an impaired bone toughening mechanism caused by mimicking aging in a methionine-rich diet rabbit, which enabled an enhanced non-enzymatically cross-linked bone matrix. Although the corrected elastic moduli from each dynamic test did not vary in the Met-diet group, the storage moduli of the Norm-diet group at higher strain rates (1.0 and 10 Hz) were significantly larger than those obtained from the lower strain-rate nanoindentation tests (0.1 Hz). The Met-diet group allowed faster and larger force reduction (stress relaxation) against the slower load indentation (20 nm/s) during the constant strain displacement-controlled indentation test than those of the Norm-diet group, whereas the Norm-diet group showed a more substantial reduction in time-dependent force against the rapid-load indentation (40 nm/s) than that of the Met-diet group. In conclusion, the primary bone toughening mechanism comprised of the enzymatically cross-linked collagen network may be affected by AGEs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨質 AGE コラーゲン架橋 老化 歯科インプラント ナノインデンテーション 放射光 応力緩和

1. 研究開始当初の背景

インプラント補綴治療において骨質は臨床的に極めて重要なリスク因子と考えられているにもかかわらず、その客観的評価方法さえ確立されていない。近年、骨折しやすい骨としにくい骨の違いを明らかにする研究が進み、骨強度に影響を及ぼす因子として骨の細構造とともに、コラーゲン架橋(クロスリンク)が注目されている。コラーゲン架橋は形成機序や機能の差により二つに分類される。いわゆる生理的架橋と、酵素反応を介さずに形成される「非生理的架橋」である。非生理的架橋は、老化や糖尿病、腎障害の病態にも関わりのある AGEs (advanced glycation end products) と呼ばれるものであり、中でもペントシジンはコラーゲン架橋の代表的な AGEs である。これまでの研究から「生理的架橋」はコラーゲン線維の強度を高める「善玉架橋」であるのに対し、AGEs 架橋はコラーゲン線維を脆弱化させる「悪玉架橋」と考えられるようになってきた。このことから血中のペントシジン測定が、骨密度のみでは評価できない易骨折性を予測できる骨質劣化マーカーとなる可能性が極めて高いと考えられるものの、これらの全身的な骨質の劣化を示すマーカー値が歯科インプラントを支持する顎骨の骨質にどのように影響を与えているのかについては、全く判っていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨質に密接に関わっているコラーゲン架橋とナノストラクチャーに焦点を当て、骨質の劣化した患者に対する非侵襲的顎骨骨質検査法の確立を目指すとともに、メカノバイオロジーと分子モジュレーションを駆使した研究デザインングにより骨質自体の局所的改質を狙い安全確実なインプラント治療を目指すものである。

3. 研究の方法

骨質に関する物理学的性質を明らかにするための動物実験には 17-18 週齢ニュージランド白色種雌性ウサギを用いた。実験群と対照群それぞれに対して全身麻酔下にて卵巣摘出手術 (OVX) を行った。手術後、実験群に対して 1% L-メチオニン混合固形試料を 1 日あたり 100g、16 週間給餌させ、高ホモシステイン血症を誘発した (Met-diet 群)。対照群には通常の実験動物用固形試料 (オリエンタル酵母工業) を同じく 16 週間給餌した (Norm-diet 群)。投与開始から 16 週経過後の剖検時に右側大

腿骨、下顎骨を採取し試料をレジン包埋後、大型放射光施設 SPring-8 にて X 線撮影を行った。

大腿骨に関しては三点曲げ試験 (支点間距離: 80mm, 計測速度: 5mm/min) により右大腿骨の骨幹部 (骨中央) における骨強度 (最大荷重, 剛性および破断エネルギー) を測定した。一方、下顎骨に関してはナノインデンテーション試験として三角錐状のダイヤモンド微小圧子で試料に対する荷重-除荷試験を行うことで、剛性、弾性率および応力緩和についての検討を行った。試料表面に最大荷重 500 μ N インデンテーションを行い、ホールディングしながら 0.1, 1, 10Hz までの振動を与えることで、ひずみ速度に対する物性変化を測定し (貯蔵) 弾性率を計測することで、骨の硬さを比較した。さらに、皮質骨表面に深さ 200nm の一定の変形を与え、約 60 秒の時間経過に対するエネルギー吸収 (応力緩和) を測定した。

また、AGEs 架橋が増加し劣化した骨に対し、低出力超音波パルスによってインプラントの治癒を促進させる試みについても併せて検討した。

4. 研究成果

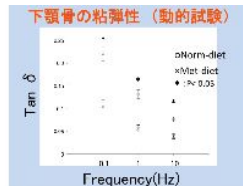
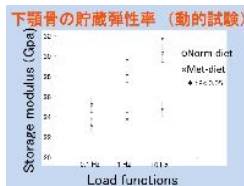
(1) 単色放射光 CT による微細構造解析

SPring-8 における単色放射光 CT による微細構造解析を行った結果、Met-diet 群の方が Norm-diet 群より骨梁形態が粗鬆化している傾向が見られたが、形態計測学的に有意な差は検出できなかった。

(2) 力学的試験

三点曲げ試験の結果より、最大荷重と破断力は Met-diet 群 (287.26 \pm 24.10 N, 254.09 \pm 43.88 N) の方が Norm-diet 群 (262.23 \pm 22.8 N, 208.11 \pm 27.74 N) よりも有意に高い値を示し、Fracture resistance においては Met-diet 群 (33.17 \pm 9.29 N) の方が Norm-diet 群 (54.12 \pm 10.66 N) よりも有意に低い値を示した。

一方、下顎骨に対するナノインデンテーション試験の結果、1 および 10Hz の周波数において貯蔵弾性率および粘弾性を表す Tan は Met-diet 群の方が Norm-diet 群に比べて有意に低い値を示したことから、Met-diet 群は下顎骨の剛性が低下している可能性が示唆された。さらに異なる速度 (40 nm/秒, 20 nm/秒) で除荷試験を行い、応力緩和評価をしたところ、Met-diet 群では Norm-diet 群と比較し形態回復による応力緩和の低下が認められた。



以上の結果から, AGEs などの非生理的コーゲン架橋の増加は下顎骨の骨強度に影響を及ぼし, インプラント治療における臨床的な問題を引き起こす可能性が示唆された。

また, 低出力超音波パルスの局所照射実験の結果から, インプラントの骨治癒だけでなく軟組織の治癒も促進させる効果が示された。

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 12 件)

Yoshida T, Masaki C, Komai H, Misumi S, Mukaibo T, Kondo Y, Nakamoto T, Hosokawa R. Changes in oral health-related quality of life during implant treatment in partially edentulous patients: A prospective study. J Prosthodont Res. 2016 Oct; 60(4):258-264.

Iwanabe Y, Masaki C, Tamura A, Tsuka S, Mukaibo T, Kondo Y, Hosokawa R. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on wound healing using scratch assay in epithelial cells. J Prosthodont Res. 2016 Oct; 60(4):308-314.

Ganeko K, Masaki C, Shibata Y, Mukaibo T, Kondo Y, Nakamoto T, Miyazaki T, Hosokawa R. Bone Aging by Advanced Glycation End Products: A Multiscale Mechanical Analysis. J Dent Res. 2015 Dec; 94(12):1684-90.

Goto S, Masaki C, Mukaibo T, Takahashi H, Kondo Y, Nakamoto T, Hosokawa R. The effects of nighttime electromyogram biofeedback on sleep quality and psychological stress. International Journal of Stomatology and Occlusion Medicine. 8:63-69, 2015.

Masaki C, Nakamoto T, Mukaibo T, Kondo Y, Hosokawa R. Strategies for alveolar ridge reconstruction and preservation for implant therapy. J Prosthodont Res. 59:220-228. 2015.

Peña-Münzenmayer G, Catalán MA, Kondo Y, Jaramillo Y, Liu F, Shull GE, Melvin JE. AE4 (SLC4a9) Anion Exchangers Drive Cl⁻ Uptake-dependent Fluid Secretion by Mouse Submandibular Gland Acinar Cells. J Biol Chem. 290: 10677-88, 2015.

Catalán MA, Kondo Y, Peña-Munzenmayer G, Jaramillo Y, Liu F, Choi S, Crandall E, Borok Z, Flodby P, Shull GE, Melvin JE. A fluid secretion pathway unmasked by acinar-specific Tmem16A gene ablation in the adult mouse salivary gland. Proc Natl Acad Sci USA. 112: 2263-68, 2015.

Hosokawa R. Minimally invasive interventions for replacing missing teeth with implants: current status and future perspective. J Prosthodont Res. 2015 Apr;59(2):79-80.

Yamasaki T, Ariyoshi W, Okinaga T, Adachi Y, Hosokawa R, Mochizuki S, Sakurai K, Nishihara T. The dectin 1 agonist curdlan regulates osteoclastogenesis by inhibiting nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1 (NFATc1) through Syk kinase. J Biol Chem. 2014 Jul 4;289(27):19191-203.

Kajiwarra N, Masaki C, Mukaibo T, Kondo Y, Nakamoto T, Hosokawa R. Soft tissue biological response to zirconia and metal implant abutments compared with natural tooth: microcirculation monitoring as a novel bioindicator. Implant Dent. 2015 Feb;24(1):37-41.

Imamura A, Nakamoto T, Mukaibo T, Munemasa T, Kondo Y, Kidokoro M, Masaki C, Hosokawa R. Effects of beverage

ingredients on salivary fluid secretion with an ex vivo submandibular gland perfusion system: Tannic acid as a key component for the inhibition of saliva secretion. *Open Journal of Stomatology*, 2015, 5, 12-18.

Tsuka S, Aonuma F, Higashi S, Ohsumi T, Nagano K, Mizokami A, Kawakubo-Yasukochi T, Masaki C, Hosokawa R, Hirata M, Takeuchi H. Promotion of insulin-induced glucose uptake in C2C12 myotubes by osteocalcin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Apr 10;459(3):437-42.

[学会発表](計 32 件)

K.Ganeko, C.Masaki, Y.Seo, C.Mukai, T.Mukaibo, Y.Kondo, T.Nakamoto and R.Hosokawa. Microstructural analysis of bone strength in rabbits with hyperhomocysteinemia, IADR general session & exhibition, CAPE TOWN, SOUTH AFRICA, June 25-28, 2014.

Shintaro Tsuka, Fumiko Aonuma, Masato Hirata, Ryuji Hosokawa, Hiroshi Takeuchi. Effect of Osteocalcin on Skeletal Muscle Cells, The 92th General Session & Exhibition of the IADR, Cape Town, Jun 25-28, 2014.

Akiko Tamura, Chihiro Masaki, Yoshinori Seo, Chisato Mukai, Taro Mukaibo, Yusuke Kondo, Tetsuji Nakamoto, Ryuji Hosokawa. Microgravity Might Affect Peri-implant Mucosal Epithelial Cells During Space Flight, The 92th General Session & Exhibition of the IADR, Cape Town, Jun 25-28, 2014.

Chihiro Masaki, Tetsuji Nakamoto, Taro Mukaibo, Norihiro Kajiwara, Chisato Mukai, Yusuke Kondo, Ryuji Hosokawa. Scenario-based simulation training on oral implantology for undergraduate dental students, The 9th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration, Sapporo, Jul 4-5, 2014.

Norihiro Kajiwara, Tetsuji Nakamoto, Chihiro Masaki, Taro Mukaibo, Chisato Mukai, Yusuke Kondo, Ryuji Hosokawa.

The effect of zirconia abutment on microcirculation dynamics in soft tissue, The 9th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration, Sapporo, Jul 4-5, 2014.

Taro Mukaibo, Tetsuji Nakamoto, Chihiro Masaki, Yusuke Kondo, Norihiro Kajiwara, Akiko Tamura, Ryuji Hosokawa. Comparative Evaluation of Plaque Removal Efficacy of Three Electric Cleaning Devices in Edentulous Patients with Implant-supported Full-arch Fixed Prosthesis, The 9th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration, Sapporo, Jul 4-5, 2014.

Chihiro Masaki, Norihiro Kajiwara, Taro Mukaibo, Chisato Mukai, Yusuke Kondo, Tetsuji Nakamoto, Ryuji Hosokawa. Soft tissue biological response to zirconia and metal implant abutments compared with natural tooth, Indonesia Japan Prosthodontic Society Joint Meeting 2014, Bali, Oct 28-Nov 1, 2014.

Shintaro Tsuka, Fumiko Aonuma, Sen Higashi, Tomoko Ohsumi, Ryuji Hosokawa, Masato Hirata, Hiroshi Takeuchi. Osteocalcin modifies insulin-induced glucose-uptake in cultured myotube, Asia-Pacific conference in Fukuoka 2015, Kitakyushu, Jan 24, 2015.

Tetsuji Nakamoto, Taro Mukaibo, Chihiro Masaki, Yusuke Kondo, Ikuya Miyamoto, Yasuhiro Morimoto, Eijiro Jimi, Keisuke Nakashima, Michihiko Usui, Ryuji Hosokawa. The educational effect of "Oral Implantology" -Evaluation for three school years-, Asia-Pacific conference in Fukuoka 2015, Kitakyushu, Jan 24, 2015.

我如古清太, 正木千尋, 妹尾吉訓, 向井知理, 向坊太郎, 近藤祐介, 中本哲自, 細川隆司: インプラント治療における骨質の術前診断は可能か? -Advanced glycation end products (AGEs)による骨質劣化の検討, 日本補綴歯科学会第123回学術大会 仙台 2014年5月23-25日

我如古清太, 正木千尋, 駒井英基, 岡本耕造, 細川隆司: 非酵素的コラーゲン架橋によって骨強度の劣化は起こるか?, 第44回日本口腔インプラント学会学術大会 東京 2014年9月12日-14日

我如古清太, 正木千尋, 柴田陽, 向坊太郎, 近藤祐介, 中本哲白, 宮崎隆, 細川隆司: 骨質劣化におけるコラーゲン架橋構造の及ぼす影響, 日本補綴歯科学会第124回学術大会 埼玉 2015年5月30日-31日

岩鍋裕次郎, 正木千尋, 田村暁子, 柄慎太郎, 我如古清太, 向坊太郎, 近藤祐介, 細川隆司: 低出力超音波パルスは歯肉創傷治癒モデルの創閉鎖を促進する 平成27年度公益社団法人日本補綴歯科学会九州支部学術大会 北九州 平成27年8月23日

岩鍋裕次郎, 正木千尋, 田村暁子, 近藤祐介, 細川隆司: 歯肉創傷治癒に対する低出力超音波パルスの影響について 日本口腔インプラント学会 第33回九州支部学術大会 佐賀 平成28年1月30-31日

岩鍋裕次郎, 田村暁子, 三隅沙緒理, 柄慎太郎, 向坊太郎, 近藤祐介, 正木千尋, 細川隆司: 物理療法を用いたインプラント周囲軟組織に対する治癒促進効果 低出力超音波パルスが歯肉上皮細胞に与える影響 - 第46回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会 名古屋 平成28年9月16-18日

Mukaibo T, Nakamoto T, Masaki C, Takahashi H, Kondo Y, Misumi S, Hosokawa R. Nighttime Electromyogram Biofeedback Affects Physical Stress, 2015 Biennial Joint Congress of JPS-CPS-KAP, Hakone, Apr 10-12, 2015.

Hokama H, Masaki C, Hosokawa R: The effects of nighttime biofeedback therapy on sleep bruxism and physical stress, 32nd Year of the ICP & Biennial Meeting of the International College of Prosthodontists, Seoul, Sep 17-20, 2015.

Masaki C, Mukaibo T, Kondo Y, Terada M, Murakami T, Takahashi A, Hosokawa R. A 9-year retrospective study of immediate loading implants in the fully edentulous maxilla, The 24th European Association for

Osseointegration Annual Scientific Meeting, Stockholm, Sep 24-26, 2015.

Munemasa T, Mukaibo T, Kondo Y, Kusuda Y, Miyagi Y, Tsuka S, Masaki C, Hosokawa R. Salivary dysfunction in diabetic KK-Ay mouse model, Interdisciplinary Medical, Dental and Soft-material Researches on the move, Kitakyushu, Jan 22-23, 2016.

Yujiro Iwanabe, Akiko Tamura, Saori Misumi, Shintaro Tsuka, Taro Mukaibo, Yusuke Kondo, Chihiro Masaki, Ryuji Hosokawa. The effects of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on soft tissue healing - an in vitro study, The 11th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration, Thailand, June 3-4, 2016.

②① Yujiro Iwanabe, Chihiro Masaki, Akiko Tamura, Shintaro Tsuka, Taro Mukaibo, Yusuke Kondo, Ryuji Hosokawa. The Effect of LIPUS against Wound Healing in Epithelial Cells, The 94th General Session & Exhibition of the IADR, Seoul, June 22-25, 2016.

②② Yujiro Iwanabe, Shintaro Tsuka, Akiko Tamura, Saori Misumi, Taro Mukaibo, Yusuke Kondo, Chihiro Masaki, Ryuji Hosokawa. Low-intensity pulsed ultrasound enhanced wound healing in gingival epithelial cells, 25th annual scientific meeting of the european association for osseointegration, Paris, September 29-October 1, 2016.

②③ Hiroaki Tada, Chihiro Masaki, Saori Misumi, Akiko Tamura, Shintaro Tsuka, Taro Mukaibo, Yusuke Kondo, Ryuji Hosokawa. Can probiotics prevent peri-implantitis? -The effect of probiotics approach on bacterial flora in implant maintenance-, The 11th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration, Thailand, June 3-4, 2016.

②④ Saori Misumi, Akiko Tamura, Shintaro Tsuka, Taro Mukaibo, Yusuke Kondo, Chihiro Masaki, Ryuji Hosokawa. Chronological change in oral health-related quality of life with

- implant prosthodontic intervention for partially edentulous patients, The 11th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration, Thailand, June 3-4, 2016.
- ②⑤ Yujiro Iwanabe, Akiko Tamura, Saori Misumi, Shintaro Tsuka, Taro Mukaibo, Yusuke Kondo, Chihiro Masaki, Ryuji Hosokawa. The effects of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on soft tissue healing - an in vitro study, The 11th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration, Thailand, June 3-4, 2016.
- ②⑥ Fumiko Aonuma, Shintaro Tsuka, Chihiro Masaki, Ryuji Hosokawa, Hiroshi Takeuchi. Effect of Complement C1q on Osteoclast Differentiation, The 94th General Session & Exhibition of the IADR, Seoul, June 22-25, 2016.
- ②⑦ Takashi Munemasa, Taro Mukaibo, Yusuke Kondo, Yuichiro Kusuda, Yuta Miyagi, Shintaro Tsuka, Chihiro Masaki, Ryuji Hosokawa. Diminished [Ca²⁺]_i Increase Induces Salivary Dysfunction in Diabetic Mouse Model, The 94th General Session & Exhibition of the IADR, Seoul, June 22-25, 2016.
- ②⑧ Yujiro Iwanabe, Chihiro Masaki, Akiko Tamura, Shintaro Tsuka, Taro Mukaibo, Yusuke Kondo, Ryuji Hosokawa. The Effect of LIPUS against Wound Healing in Epithelial Cells, The 94th General Session & Exhibition of the IADR, Seoul, June 22-25, 2016.
- ②⑨ Tomotaka Nodai, Kentaro Ono, Suzuro Hitomi, Misa Ito, Chihiro Masaki, Ryuji Hosokawa, Kiyotoshi Inenaga. Pain-associated mediators and genes in acetic acid-induced oral ulcerative mucositis, The 16th World Congress on Pain, Yokohama, September 26-30, 2016.
- ③⑩ Yujiro Iwanabe, Shintaro Tsuka, Akiko Tamura, Saori Misumi, Taro Mukaibo, Yusuke Kondo, Chihiro Masaki, Ryuji Hosokawa. Low-intensity pulsed ultrasound enhanced wound healing in gingival epithelial cells, 25th annual scientific meeting of the european association for osseointegration, Paris, September 29-October 1, 2016.
- ③⑪ Tomotaka Nodai, Suzuro Hitomi, Kentaro Ono, Chihiro Masaki, Ryuji Hosokawa. Endothelin receptor is the key for prevention of mucositis pain, The 95th General Session & Exhibition of the IADR, San Francisco, March 22-25, 2017.
- ③⑫ Yuki Hirata, Takashi Toyono, Ryuji Hosokawa, Yuji Seta. Promoter analysis for the mouse amino acids receptor T1R1 gene, The 95th General Session & Exhibition of the IADR, San Francisco, March 22-25, 2017.
- 〔図書〕(計 2 件)
細川隆司 他編, 医歯薬出版,
クラウンブリッジ補綴学 第5版, 2014
細川隆司 他, 医歯薬出版,
よくわかる口腔インプラント学 第3版 2017
6. 研究組織
(1)研究代表者
細川 隆司 (HOSOKAWA, Ryuji)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 60211546
(2)研究分担者
正木 千尋 (MASAKI, Chihiro)
九州歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 60397940
近藤 祐介 (KONDO, Yusuke)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 00611287
向坊 太郎 (MUKAIBO, Taro)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 50635117
(3)連携研究者
我如古 清太 (GANEKO, Kiyota)
九州歯科大学・歯学部・特別研究員
研究者番号: 80759382
岩鍋 裕次郎 (IWANABE, Yujiro)
九州歯科大学・歯学部・特別研究員
研究者番号: 40781711