

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462988

研究課題名(和文) 機能性食品による骨強化作用の生物学的検討～骨粗鬆症患者へのインプラント治療～

研究課題名(英文) biological evaluation of curcumin contributions for the bone formation

研究代表者

秋葉 奈美 (Akiba, Nami)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：00584591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症はインプラント治療の危険因子と考えられている。機能性食品としてのクミンは活性酸素種の除去機能を有し、骨粗鬆症予防、症状改善に寄与する可能性が考えられる。本研究はクミンの骨粗鬆状態への奏功機序確認を目的としている。上顎骨骨欠損モデルを作成し円筒形骨欠損治癒を通常食とクミン混入食を与えたラットにおいて比較した。クミン投与群、通常食群に有意な差は見られなかった。また、水溶性クミンを飲水中に混和して投与した。頭蓋骨欠損モデル、上顎骨欠損モデル、卵巣摘出モデルにおいて有意な差は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Osteoporosis is one of the risk factor for implant therapy. Curcumin is known as a functional healthy food and able to remove active oxygen species. Curcumin thought to be contributed to help bone formation and save people from osteoporosis. The aim of this study is to elucidate the mechanisms of acceleration for bone formation by curcumin. We fed curcumin to the normal rat and OVX rat, then observed maxillary cylindrical cavity healing, calvarias defect and femoral defect. Among these all samples, there are no significant difference could be seen.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：健康食品 骨粗鬆症 インプラント クミン

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症はインプラント治療の危険因子とインプラント治療の成功率は高く、補綴治療における有効な選択肢として一般に広く受け入れられ、今後ますます多くの患者がインプラント治療を受けるものと思われる。他方、国内で女性男性合わせて500-1000万人が罹患しているともいわれる骨粗鬆症はインプラント治療の危険因子の一つと考えられており、重度であればインプラント治療適応外となり、適応となっても骨粗鬆症患者の骨量減少と骨強度低下は治療期間やインプラント治療自体の成否に大きく影響する。

NIHの定義(2000年)によれば、骨粗鬆症は「骨折リスクを増すような骨強度上の問題をすでに持っている人に起こる骨格の疾患」とされ、骨強度 = 骨密度 + 骨質と定義されていることから単に骨量および骨密度の低下ばかりでなく、骨組織中のコラーゲンの架橋構造によって制御される骨質 (bone quality) も骨粗鬆症の重要な評価指標となっている。現在では、骨粗鬆症は遺伝、性別、加齢などの内的要因と生活習慣などの外的要因による骨量・骨強度制御の破綻によっておこると考えられている。

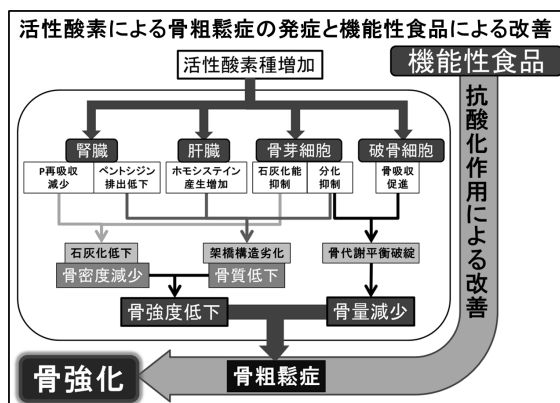
活性酸素種は好気性生物の生命維持に必要不可欠であり、殺菌等の生体に有利な機能を有するが同時に細胞傷害性を有するため、生体内には余分な活性酸素種を無害化する抗酸化酵素が存在する。細胞内で分解しきれない活性酸素種は癌や生活習慣病、老化等の疾患の原因であると言われているが、因果関係が明確でないものも多い。この活性酸素種は、骨芽細胞の分化阻害および石灰化阻害、破骨細胞活性の上昇による骨吸収の促進 (J. bone Mineral Res., 2006)、ホモシステインとペントシジンによるコラーゲン架橋構造の劣化(骨折のリスクを高める)、腎機能障害に伴うミネラル再吸収低下による骨の石灰化阻害などの作用が報告されており、これらは、いずれも活性酸素種の骨粗鬆症発症への関与を強く疑わせるものである。機能性食品とは1980年代半ばに提唱された概

念で、食品に見られる機能のうち「生理機能を調節し、健康維持や健康回復効果の働きを有する」食品のことである。多くの機能性食品が抗酸化作用を有し、これらの機能性食品は抗酸化作用を介した骨粗鬆症改善効果が十分に期待できると信じられてきた。しかし、これまでの動物実験結果では、この考えを必ずしも裏付けていない。すなわち、機能性食品のうち、セラクルミン、スルフォラファン、ユビキノールの正常投与した動物実験(ラット)では、骨の破断試験で機械的強度の上昇を示すが、骨梁構造に変化がみられず、骨粗鬆症改善効果については因果関係不明瞭とされたが、これまでの実験方法では、

骨粗鬆症の指標として、骨量が用いられており、骨質の評価がないこと、疾患モデル動物での未検討、in vitro 実験データの不足、

機能性食品の投与方法、投与条件の曖昧さ、などの点が実験上の不備が多々指摘される。従って、機能性食品による抗酸化作用と骨粗鬆症の改善効果の関係は未だ十分に理解されているとは言いがたい。

近年、申請者のグループは、ローヤルゼリーを骨粗鬆症モデル動物に投与すると、骨量を変化させることなく、コラーゲン架橋構造を変化させることにより、骨強度を増すことを発見した。このことは機能性食品の投与が骨粗鬆症の改善に有効である可能性を示している



2. 研究の目的

本研究の目的は、モデル動物および培養細胞を用いて、抗酸化力を介し骨強化作用を示す機能性食品の骨粗鬆症患者への有効性を明らか

にすることであり、研究の最終ゴールはインプラント治療の適応症拡大と成功率のさらなる向上である。本研究は3つの具体的な研究課題から構成される。基礎的課題の解決を図り、得られた研究成果をインプラント植立モデル、骨欠損治癒モデルに応用し、研究を進めることで、研究目的を達成する。

3. 研究の方法

【研究目標(1)] 機能性食品による骨強度変化解析 仮説の検討と現象の分析

モデル動物への機能性食品投与実験(秋葉(奈)、魚島)

骨粗鬆症モデル動物作成:

4週齢雌性ラットの両側卵巣を摘出し、吸収促進型骨粗鬆症モデルを作成する。

・予防型投与群の設定:機能性食品を卵巣摘出直後より投与

・改善型投与群の設定:機能性食品を骨粗鬆症状態が獲得された後に投与

機能性食品の投与:機能性食品には以下の3種類を用いる。

・セラクルミン:(株)セラバリューズが開発、高血中濃度維持型クルクミン。

・スルフォラファン:スプラウト中にスルフォラファングルコシノレート状態で存在、

・ユビキノール:(株)カネカにより製造、体内作用型の還元型 CoQ1。

機能性食品投与動物の骨強度解析

骨強度解析:以下の項目による骨強度の評価

骨質:コラーゲン架橋構造の質によって評価

骨密度: Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA)法を用いて測定

骨梁構造: μ CT装置を使用し3次元骨梁構造計測。

機械的強度:大腿骨、脛骨における3点曲げ試験による骨力学解析

骨成分:FTIR解析により骨のCa/Pを測定

【研究目標(2)] 骨強度変化のメカニズム解析 現象の機序解明と検証

機能性食品投与動物より採取した各種臓器、

組織の解析(骨、骨髄、腎臓、肝臓)

遺伝子発現解析:

DNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を実施

組織学的解析、骨組織、骨髄、腎臓、肝臓等、骨代謝関連臓器の組織学的解析

骨代謝マーカー解析(血中および尿中)、溶出ミネラル測定:破骨細胞活動性:TRACP-5b、NTX、CTX測定、骨芽細胞活動性:BAP、P1NP測定

機能性食品投与動物より採取単離した細胞の機能解析

骨芽細胞活性解析:

石灰化試験、ALP活性、細胞外基質産生能解析、破骨細胞活性解析:ピットフォーメーションアッセイによる骨吸収能解析試験

【研究目標(3)] インプラント患者への機能性食品投与効果解析 臨床応用・展望

インプラント埋入モデルにおける組織学的解析

除去トルクによる力学的オッセオインテグレーション解析

欠損治癒モデルにおける治癒促進解析

これらの検討のために以下の2種の実験モデルを作製する。

インプラント埋入モデル:

ラット第1,2臼歯を部抜、治癒を待ち第一臼歯相当部に1.7mmピーソリーマでインプラント窩洞形成、同部位に直径2mmスクリュータイプカスタムインプラントを埋入、4週間オッセオインテグレーション獲得を待って組織学的、力学的に評価する。

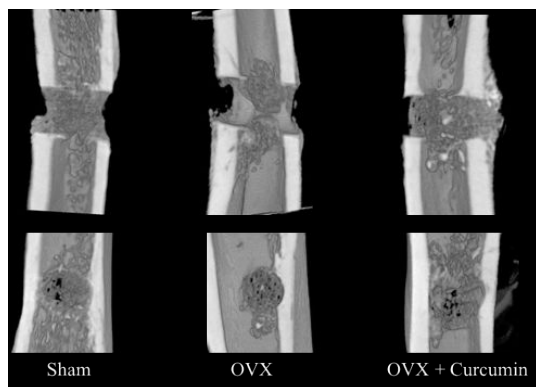
骨欠損治癒モデル:

ラット第1,2臼歯を部抜、治癒を待ち第一臼歯相当部に1.7mmピーソリーマで円筒形骨欠損形成、縫合。経時的にサンプル採取し欠損治癒像を組織的に評価する。

4. 研究成果

骨芽細胞に分化刺激を加え、さらに培養液中にクルクミン、水溶性クミンを加えた群において、

非添加の対照群と比較して、骨分化関連遺伝子マーカー(Runx2,Osteocalcin, Osteopontin,Alp)の遺伝子発現に関して有意な発現上昇は観察されなかった。石灰化、ALP活性の上昇に関する有意差は見られなかった。クルクミン、水溶性クミンを分餌に混入し、ペレット化した餌を与え飼育したラットにおいて、飼育期間における体重変化は対照群と比較して有意差がなく、毒性、生体為害性は見られないものと思われる。通常ラットに対してクミン、水溶性クミン混入ペレットを与えた動物群において、標本採取後に大腿骨をマイクロCTで解析したところ、骨密度、微細骨構造に関してやはり有意な差は見られなかった。卵巣摘出による骨粗鬆症状態形成モデル(OVX)において、通常ラットと比較して骨密度低下、骨微細構造消失が見られるが、クミン、水溶性クミン投与群において、大將軍との有意な差は見られず、骨粗鬆症状態の改善効果は見られなかった。頭蓋骨に円筒形欠損を形成し、骨形成、欠損治癒を観察する頭蓋骨欠損モデルにおいて、通常ラット、OVXに対して通常食、クミン、水溶性クミンを投与した群において、投与の有無によって治癒に変化は見ら



れなかった。クルクミン、水溶性クミン、通常食を投与した、OVXラット、通常ラットにおいて、各種実験結果において有意な差が見られなかった。ゆいゆいづたい骨欠損部において、水溶性クミン摂取群において骨欠損修復の有意な上昇が観察された

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 13 件)

1. Akiba Y, Eguchi K, Akiba N, Uoshima K.

Biological Evaluation of Implant Drill made from Zirconium Dioxid. Clinical Imp. Dent. Related Res. 19(2):306-315 2016 (査読有)

2. Akiba Y, Watanabe M, Mine A, Ikedo I, Nikawa H. With the Aim of Treatment Guideline Development For Dental Metal Allergy and Rerated Disease. Ann. Jpn. Prosthodont Soc. 8(4) 2016 (査読有)

3. Akiba Y, Mizuta A, Kakihara Y, Nakata J, Nihara J, Saito I, Egusa H, The inhibitors of cyclin-dependent kinases and GSK-3 enhance osteoclastogenesis. B2iochemistry and Biophysics Reports (5):253-258. 2016(査読有)

4. Akiba Y, Eguchi K, Akiba N, Uoshima K. Bone regeneration with Functional specialized priming cell cocktail. 日補綴会誌 (8):151. 2016(査読有)

5. Kitami M, Kaku M, Rosales M, Ida T, Akiba N, Uoshima K. Prolonged Survival of Transplanted Osteoblastic Cells Does Not Directly Accelerate the Healing of Calvarial Bone Defects. Journal of Cellular Physiology 231(9):1974-1982, 2016(査読有)

6. Kaku M, Akiba Y, Akiyama K, Akita D, Nishimura M: Cell-based bone regeneration for alveolar ridge augmentation - Cell source, endogenous cell recruitment and immunomodulatory function. J Prosthodont Res 59(2):96-112, 2015. (査読有)

7. 秋葉陽介, 江口香里, 秋葉奈美, Rashid MD Mamunur, 加来 賢, 魚島勝美:ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACI)を用いたエピジェネティクス制御による細胞分化制御を利用した新規骨増成法に関する研究. 日歯医学会誌 33:44-48, 2014. (査読有)

8. 秋葉陽介, 江口香織, 秋葉奈美, 北見恩美, Rocabado JMR, 加来 賢, 魚島勝美:多機能性エピジェネティクス化合物による骨増成法への多面的アプローチ. 日補綴誌(8):264, 2014. (査読有)

9. Akiba N, Mamunur RM, Akiba Y, Kaku M, Uoshima K: Effect of Valproic Acid on Bone Healing in Rat. . Dent Res.92(A) 2996, 2013(査読有)
10. Banerjee K, Akiba Y, Baker H and Cave JW.: Epigenetic control of neurotransmitter expression in olfactory bulb interneurons. International journal of developmental neuroscience 31(6):415-423.2013 (査読有)
11. 秋葉奈美, 秋葉陽介, ラシッド = マムヌール, 加来賢, 魚島勝美: ラットにおける HDACI 全身投与による骨再生. 日本補綴学会雑誌 121:198 頁, 2012(査読有)
12. Akiba Y. Potentialities of Histone Deacetylase Inhibitors for New Bone Augmentation Therapy. Japanese Association for Dental Research, 14-15, 2012. (査読有)
13. Akiba Y, Mamunur RM, Nagasawa M, Nozawa M, Uoshima K: Biological evaluation of zirconium - dioxide dental implant drill. 8th BMPPA, Conference program 14-15, 2012. (査読有)
- [学会発表] (計 18 件)
- 1) 江口香里, 秋葉陽介, 秋葉奈美, 魚島勝美: IGFBP-3 による骨芽細胞分化制御機構の解析. 第 6 回補綴若手研究会, 萩本陣(山口県・萩市), 2017 年 3 月 11 日, 同研究会プログラム:8 頁, 2017.
 - 2) 河村篤志, 秋葉陽介, 長澤麻沙子, Kaori Eguchi: IGFBP3 effects osteoblast differentiation independent of IGF signaling, International Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment. Samui, (Thailand), Feb 11, 2017.
 - 3) Takaoka Y, Akiba Y, Nagasawa M, Aoyagi Y, Uoshima K: Analysis of metal allergy patients visited Niigata University Medical and Dental Hospital. International Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment. Samui, (Thailand), Feb 12, 2017.
 - 4) Akiba Y: Acceleration of osteogenesis through cell recruitment and angiogenesis. International Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment. Samui, (Thailand), Feb 11, 2017.
 - 5) 河村篤志, 秋葉陽介, 長澤麻沙子, 高嶋真樹子, 永井康介, 山崎裕太, 荒井良明, 魚島勝美: 加熱によるデンタルインプラント除去法の有効性検証. 第 46 回日本口腔インプラント学会, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), 2016 年 9 月 18 日.
 - 6) A.Kawamura, M Nagasawa, Y.Akiba, M.Takashima, Y.Arai, K.Uoshima: Validation of an Implant Removal Method by Local Heating. EAO Congress 2016.Paris, (France) 2016 . 9.30.
 - 7) Kaori Eguchi, Yosuke Akiba, Nami Akiba, Masako Nagasawa, Lyndon F. Cooper, Katsumi Uoshima: IGFBP-3 Suppresses Osteoblast Differentiation Through BMP-2 Signaling. 94th General Session & Exhibition of the IADR. Seoul, (Korea), June 22-25, 2016.
 - 8) 加来賢, 北見恩美, JM Rosales Rocabado, 井田貴子, 秋葉陽介, 魚島勝美: SDF-1/CXCR4 による歯根膜への骨髄由来細胞の誘導, 第 125 回日本補綴歯科学会学術大会, 石川県立音楽堂(石川県・金沢市), 2016 年 7 月 8 日
 - 9) 江口香里, 秋葉陽介, 秋葉奈美, 長澤麻沙子, リンドン F. コーパー, 魚島勝美: IGFBP-3 は BMP-2 シグナルを介して IGF 非依存的に骨形成を抑制する, 日本補綴歯科学会第 125 回学術大会, 2016 年 7 月 8 日 ~ 10 日, 石川県立音楽堂(石川県・金

- 沢市).
- 10) 秋葉陽介, 江口香里, 秋葉奈美, 魚島勝美: 機能特化プライミング細胞カクテル移植による骨再生法, 日本補綴歯科学会第125回学術大会, 2016年7月8日~10日, 石川県立音楽堂(石川県・金沢市)
 - 11) 秋葉陽介: 歯科金属アレルギーと関連疾患に関するガイドライン策定を目指して, 第124回日本補綴歯科学会学術大会, 大宮ソニックシティー(栃木県・大宮市), 2015年5月30日
 - 12) 江口香里, 秋葉陽介, 長澤麻沙子, 水島一尊, クーパー リンドン, 魚島勝美: IGF binding protein 3 はBMP 2 シグナルを介してIGF非依存的に骨形成を抑制する. 平成27年度新潟歯学会第2回例会, 新潟大学(新潟県・新潟市), 2015年11月7日
 - 13) 河村篤志, 荒井良明, 秋葉陽介, 長澤麻沙子, 高嶋真樹子, 魚島勝美, 加熱によるデンタルインプラント除去法の有効性検証, 新潟歯学会第2回例会, 新潟大学(新潟県・新潟市), 2015年11月7日
 - 14) 秋葉陽介: 機能特化プライミング細胞カクテル移植による骨再生法. 第5回補綴若手研究会, KKR 鎌倉(神奈川県・鎌倉市), 2016年2月27日
 - 15) 加来 賢, 北見恩美, JM Rosales, 井田貴子, 秋葉陽介, 魚島勝美: 歯根膜には大腿骨骨髄に由来する幹細胞が存在する. 第123回日本補綴歯科学会, 仙台国際センター(宮城県・仙台市), 2014年5月24日
 - 16) 秋葉陽介, 江口香織, 秋葉奈美, 北見恩美, Rocabado JMR, 加来 賢, 魚島勝美: 多機能性エピジェネティクス化合物による骨増成法への多面的アプローチ. 第123回日本補綴歯科学会学術大会, 仙台国際センター(宮城県・仙台市), 2014年5月24日.
 - 17) 秋葉陽介, バルプロ酸(VPA)による新生骨形成促進作用の検討, 第3回あしなが予

防医学研究会, 弘前大学(青森県・弘前市), 2014年10月4日.

- 18) 秋葉陽介: 幹細胞を用いた組織再生法の新機軸 - 内在性幹細胞の動員 - イブニングセッション. 第123回日本補綴歯科学会学術大会, 仙台国際センター(宮城県・仙台市), 2014年5月24日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋葉 奈美 (AKIBA, Nami)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号: 00584591

(2) 研究分担者

加来 賢 (KAKU, Masaru)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 30547542

魚島 勝美 (UOSHIMA, Katsumi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 50213400

秋葉 陽介 (AKIBA Yosuke)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号: 30547542