

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670823

研究課題名(和文)破骨細胞の分化制御を基盤としたインプラント周囲骨動態制御法の開発

研究課題名(英文)The development of the method of control of periimplant bone remodeling through the control of osteoclast differentiation.

研究代表者

鮎川 保則 (AYUKAWA, YASUNORI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：50304697

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)：本研究では破骨細胞の分化や骨吸収に必須の分子を制御することによりインプラント周囲骨吸収の制御を目指した。

培養実験により、Ciglitazone、Fluvastatin、Denosumab、Odanacatib、Pantoprazoleが破骨細胞による骨吸収を制御することを確認した。また、膜ナノチューブ形成を制御するM-Sec遺伝子の発現を阻害すると破骨細胞形成が抑制的されることが明らかになった。

以上のうちFluvastatinをラット口腔内に埋入したチタンインプラント周囲に投与すると、歯槽骨の体積およびインプラント周囲の骨接触率が有意に増加した。また同時にインプラント周囲歯肉の厚みも向上した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we intended to regulate periimplant bone resorption with the control of osteoclast development and function. In vitro study revealed that ciglitazone, fluvastatin, denosumab, odanacatib and pantoprazole can regulate osteoclastic bone resorption. In addition when the expression of M-Sec gene, which regulated tunneling nanotube formation, was interfered, osteoclast formation was suppressed. Among them we applied fluvastatin for in vivo study and local administration of fluvastatin to the tissue around the implant placed in rat jaw bone augmented the bone volume, bone-implant contact, and the thickness of periimplant gingiva.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯科インプラント 破骨細胞 骨 歯科補綴学

1. 研究開始当初の背景

これまでのインプラント研究の方向性の一つとして、オッセオインテグレーションを早期に獲得することを目指した流れがあり、優れた表面性状の開発、インプラント埋入予定部位の骨の活性化、骨量が不足している部位に用いる骨補填材や骨誘導再生法の進化を目指して多くの研究がなされてきた。これらの研究の成果の一部は実際に臨床の場に供され、インプラント医療に大いに役立っている。この研究アプローチは、インプラント治療開始後短期における成功を目標とした研究といえる。具体的には、これらの研究はインプラント埋入後上部構造装着までの期間を短縮する、骨量不足部位に骨造成を行う際の成功率を高める、骨造成後の治癒期間を短縮するなど、インプラント治療開始後数年までの期間をターゲットにしているからである。一方、インプラントは数十年にわたって機能することが期待されているため、「獲得したオッセオインテグレーションの維持」を目標とする研究アプローチも同様に重要であると考えられる。この研究アプローチにはインプラント上部構造に作用する力に関する検討とそれに伴う咬合の管理、インプラント周囲の清掃、指導を通したインプラント周囲組織の感染予防と治療等が含まれる。つまりこれらはインプラント治療終了後長期の成功を目指した研究といえるが、長期経過を追うという性質から、このアプローチをとる研究には、疾患を未然に防ぐという立場からのものが多い。また、インプラントの改良は、短期の成功に関して向上させる方が長期予後を向上させるよりも簡単であるため、後者の研究アプローチに対するメーカーからの資金投入は比較的少ないと思われる。

一方患者サイドからこの問題を考えたとき、インプラント治療開始から上部構造装着までの期間が短縮されることはもちろん喜ばしいが、上部構造装着後十年、二十年とい

った長期にわたってインプラントが安定的であることは疑いなく重要である。しかし、前述のように長期間のインプラント治療の成功に関する研究には、上部構造装着までの期間を短縮することを目的とする研究と比較して企業からの資金供給は少ない。このようなことを背景に本研究を企画した。

2. 研究の目的

インプラントに対して上部構造を装着した後、長期にわたってインプラント周囲組織の健康と機能を維持するためには、インプラントに作用する力の管理、インプラント周囲組織の免疫学的な知見に基づく感染の予防と治療、インプラント周囲骨の恒常性の維持などが重要と考えられる。本研究では、インプラント周囲骨の破骨細胞を制御することによりインプラント周囲骨の動態を制御する可能性に着目した。

これまでの、骨粗鬆症やリウマチなどの破骨細胞に関連する疾患に対するアプローチとしては、これらの疾患が全身疾患であるという特徴から、全身的薬剤投与が必要であった。つまり、内服、あるいは注射にて投与可能な薬剤を用いた治療法の検討がなされてきた。一方、インプラント周囲骨動態に対しては、局所における制御を行えばいいので、ある程度強力な薬物治療が可能であると考えられる。本研究では、薬物の局所投与によるインプラント周囲骨動態の制御の可能性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

<培養実験>

4週齢の雄性ラット脛骨と大腿骨を無菌的に摘出した。軟組織を剥離した後、両骨端を切断し、シリンジおよび注射針を用いて α -MEMを骨髓腔内に注入し骨髓細胞を採取した。得られた細胞から骨髓ストローマ細胞を除去し、非接着性の骨髓細胞を調整した。15%牛胎児血清含有 α -MEMに熱処理した

ROS17/2.8 cell conditional medium(10%)、10-8M $1\alpha, 25(OH)2D3$ 、および 20ng/ml sRANKL を添加し培養した。培養に際し、後述の薬剤を培地に投与し、破骨細胞に対する効果を検討した。

<動物実験>

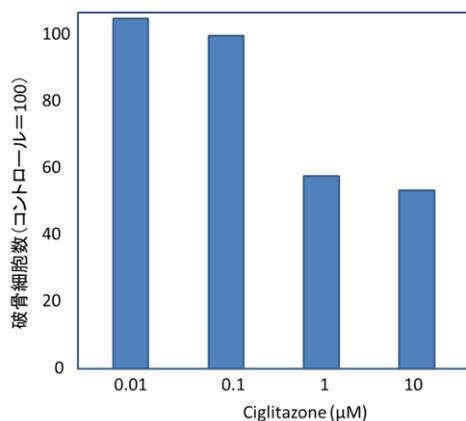
実験動物には、6 週齢の雄性 Wistar 系ラットを用いた。インプラントはラット第一臼歯抜歯窩に適合するように設計した直径 2 mm 長さ 4.5 mm の純チタン製スクリータイプのものを用いた。全身麻酔下にて上顎右側第一臼歯抜去後、#80~#120 の歯科用リーマーを用いて抜歯窩を順次拡大し、インプラント埋入窩を形成した。インプラント体はプラットフォームが歯肉と同縁になるように植立した。植立後、抜歯窩近傍の歯肉類移行部に fluvastatin (有無、含有量により 4 群に分類した) をポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体 (PLGA) マイクロカプセルに封入し、注射にて投与した。インプラント埋入 4 週後にインプラント体を含む右側上顎骨を採取し、固定後、メチルメタクリレート樹脂に包埋した。試料をインプラントの長軸に平行になるように、薄切・研磨し、厚さ 70 μ m の非脱灰研磨標本を作製した。染色後、封入し、光学顕微鏡を用いて、Ti インプラント周囲の骨および軟組織の評価を行った。同様の実験をインプラントを埋入しない抜歯窩周囲においても実施した。

4. 研究成果

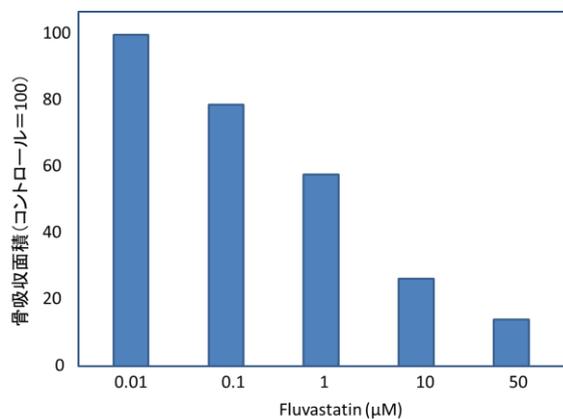
<培養実験>

培養実験により、次のような結果が得られた。

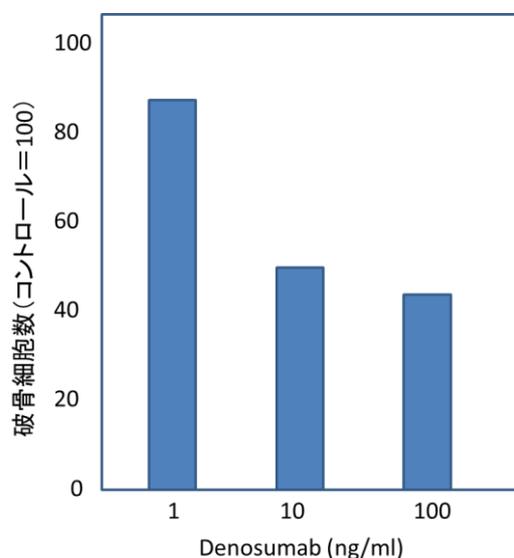
- PPAR γ アゴニストである Ciglitazone により、培養破骨細胞の多角化が投与量依存的に抑制された。



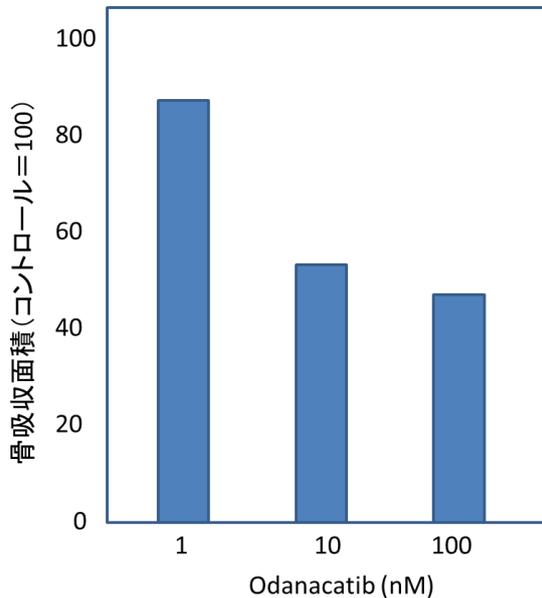
- 脂質異常症治療薬であり、骨に対する作用が報告されている Fluvastatin は、培養破骨細胞に投与すると骨吸収面積が投与量依存的に縮小した。



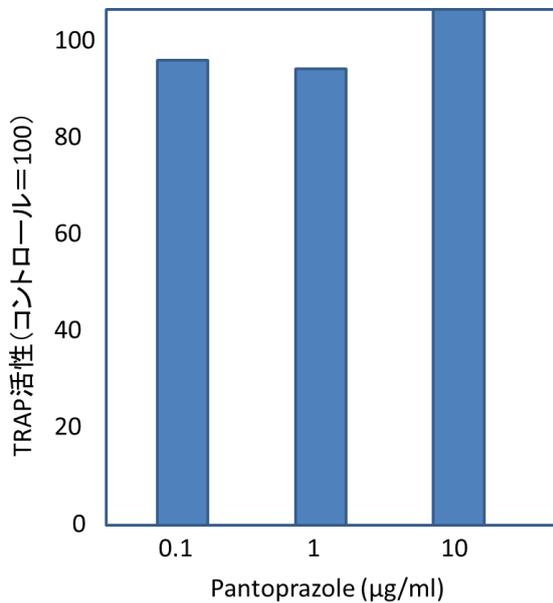
- RANKL 阻害剤である Denosumab により、TRAP 陽性細胞数が減少した



- Cathepsin K 阻害剤である Odanacatib により、容量依存的に破骨細胞の基質吸収面積が低下した。



- Proton pump inhibitor である Pantoprazole により、破骨細胞の TRAP 活性がわずかに低下した。

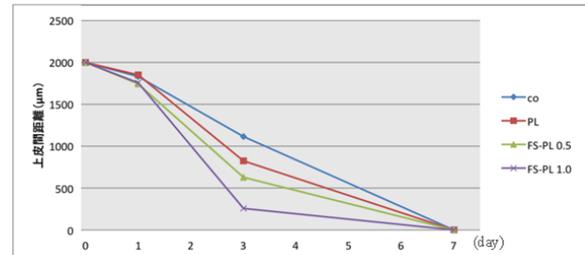


<動物実験>

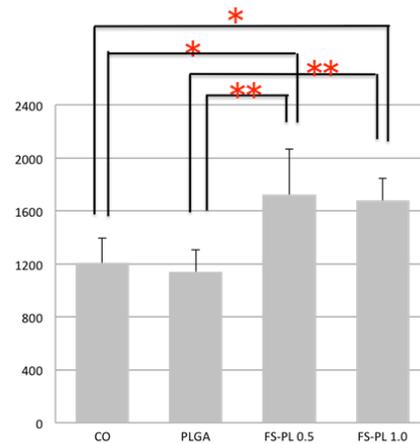
- インプラント-骨接触率について
インプラント埋入後即時に fluvastatin を注射にて投与し 28 日経過後において、PLGA-フルバスタチン複合体投与群ではフルバスタチン非投与群と比較して有意にインプラント-骨接触率が増加した。

- 抜歯窩周囲の治癒について

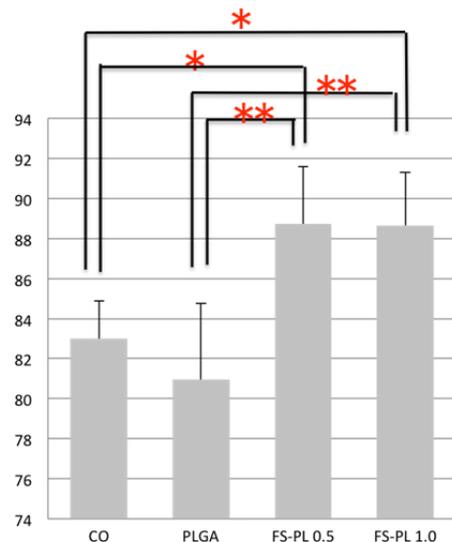
抜歯後 3 日目において PLGA-フルバスタチン複合体投与群では、非投与群と比較して有意に上皮による抜歯窩の封鎖が促進されていた。抜歯後 7 日目には全ての群において上皮による封鎖が完了していた。



抜歯後 28 日目において PLGA-フルバスタチン複合体投与群では、非投与群と比較して有意に結合組織面積の増加が確認された。

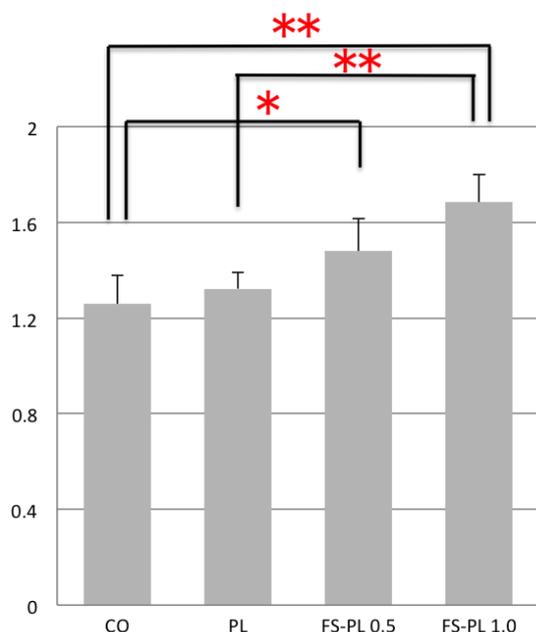


抜歯後 28 日目において PLGA-フルバスタチン複合体投与群では、非投与群と比較して有意に骨密度の上昇が確認された。



抜歯後28日目においてPLGA-フルバスタチン複合体投与群では、非投与群と比較して有意に垂直的骨高さの増加が確認された。

抜歯後28日目においてPLGA-フルバスタチン複合体投与群では、非投与群と比較して有意に抜歯窩周囲骨体積の増加が確認された。



以上のことより、種々の破骨細胞関連疾患治療薬をインプラント周囲に局所投与してインプラント周囲骨動態の制御が可能かを動物実験で確認する必要性が考えられた。また、破骨細胞の制御をしようことが確認された脂質異常症治療薬である fluvastatin は、ラット口腔内において抜歯窩の創傷治癒を促進しようこと、ラット口腔内に埋入されたインプラント周囲の骨動態を改善することが示唆され、インプラント周囲骨動態改善薬剤としての可能性が示された。

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)

[学会発表] (計2件)

鮎川保則、インプラント治療に関連したマテリアル創成、第12回日本再生歯科医学会学術大会、2014年8月26日、徳島大学・藤井節郎記念医科学センター(徳島県徳島市)。

Yasunami N, Ayukawa Y, Furuhashi A, Atsuta I, Rakhmatia YD, Moriyama Y, Koyano K. Accelerated Healing of Extraction Socket and Peri-implant Tissue by Statin, IADR General Session 6 Exhibition, March 13, 2015, Boston, MA, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鮎川 保則 (AYUKAWA YASUNORI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：50304697

(2) 研究分担者

古谷野 潔 (KOYANO KIYOSHI)

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号：50195872

高橋 良 (TAKAHASHI AKIRA)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：60637924