

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462925

研究課題名(和文) マイクロクラックから解明するオッセオインテグレーション獲得後の骨リモデリング機構

研究課題名(英文) The relationship between osteocyte and bone remodeling around implant

研究代表者

森山 泰子 (Moriyama, Yasuko)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：50452769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント周囲骨の骨細胞に着目し、インプラント周囲骨応力応答について検討した。MLO-Y4細胞三次元ゲル包埋にスレッド形態のチタンプレートを設置し反復応力を与えると、周囲骨細胞のアポトーシス、RANKL、connexin43の発現上昇が認められた。ラット顎骨インプラント埋入モデルを用いても同様に応力下における組織学的検討を行い、咬合負荷時の骨細胞においてconnexin43の発現、アポトーシス細胞、TRAP陽性細胞が多く認められ、骨代謝が活発化されている可能性が示唆された。インプラント周囲骨細胞は骨細胞死や様々な因子の発現という現象を生じリモデリングの活性化を行っていることが示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the effects of force-induced biochemical response from osteocytes in vitro and in vivo.

In vitro study, we established a loading apparatus with edged titanium plate, by which cyclic stress could be applied to the gel-embedded MLO-Y4 osteocytic cell lines. Cyclic physiological strain induced the cell death of MLO-Y4 around the plate. Real-time RT-PCR analysis showed that the expression levels of connexin43 increased under the cyclic stress. The conditioned medium obtained from cyclic stimulated culture increased ALP activity of bone marrow culture. In vivo study, we inserted titanium implant at right maxillary of 4-week-old rat. After 4 weeks of healing, we provided occlusal force to implant by prosthetic appliance and compared with another side of maxilla. Histological evaluation showed that TRAP-positive cells were observed around the implant.

These results demonstrate that osteocytes possible involvement of bone remodeling around implant.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：骨細胞 オッセオインテグレーション インプラント 骨リモデリング マイクロクラック

## 1. 研究開始当初の背景

歯科インプラントは歯根膜を有する天然歯と異なりオッセオインテグレーションをしているため、負荷された咬合力はインプラント体を通して骨に直接伝達される特徴がある。骨における応力感知細胞として骨細胞が注目されており、破骨細胞や骨芽細胞を司りリモデリングを制御することが報告されている。インプラントを顎骨に埋入した直後は骨折治癒と同様の機序が働き、インプラント周囲の骨は一時的に骨形成が促進される。この“治癒”は顎骨では数ヶ月で完了し、この時オッセオインテグレーションが獲得されたことになる。その後、インプラントが適切な咬合力を受け、その機能を発揮した時、インプラント周囲骨にはどのような応力がかかるのかに関しては有限要素法にて多数報告されている。しかし、有限要素法では骨形成や吸収は表現されない。「骨は常にリモデリングを繰り返している」ことがインプラント周囲骨でも生じていることを考慮すると、一見静的なオッセオインテグレーション獲得後のインプラント周囲骨は適度な応力を受けながらリモデリングを繰り返していることになる。

## 2. 研究の目的

そこで、インプラント周囲のリモデリング機構（特にオッセオインテグレーション後）を解明すべく、応力を感じ取る骨細胞と反復荷重により発生するマイクロクラックに着目する。反復荷重時におけるインプラント周囲骨動態を *in vivo* および *in vitro* にて検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### *in vivo*

ラット口腔内インプラント埋入モデルを使用し、長期的に観察を行い、オッセオインテグレーション獲得後のインプラント周囲骨の骨動態を検討する。非荷重時および荷重時で比較検討することで、インプラントにかかる応力が周囲骨動態（＝リモデリング）に与える影響もあわせて確認できる。

ラット口腔内右側第1臼歯を抜歯し、4週間の治癒期間をおき、同部位にインプラント体を顎骨に埋入する。4週間後にインプラントに上部構造を装着する。この時、インプラントの上部構造の高さにより非荷重、適正荷重、荷重なしに分け、インプラント周囲骨の解析を行った。インプラント埋入後4、8、12、16週後、屠殺し、非脱灰研磨標本作製しマイクロクラックを染色、観察する。反対側の顎骨（天然歯部位）も同様に検討することによって、インプラントによってできたマイクロクラックを識別して観察できる。

同様のモデルを用い、より骨細胞に着目した組織解析を行った。同様にインプラントを埋入し、同観察期間後、屠殺、脱灰し、凍結切片を作製し、骨細胞に特異的なスクレロス

チンの局在を免疫染色にて観察した。また骨細胞の死細胞を TUNEL 染色にて観察し、マイクロクラックとの関係を検討した。また、ALP、TRAP 染色も行い、周囲の骨芽細胞、破骨細胞の局在を観察した。

### *in vitro*

骨細胞樹立株 MLO-Y4 細胞を使用し三次元ゲル包埋培養（生体における骨細胞の環境を模擬する）を行い、応力を作用させた時の骨細胞の挙動について検討する。

インプラント周囲の応力分布を模擬するためにスクリー形態のチタンプレートで骨細胞培養ゲル内に包埋し、周囲の骨細胞の生死を観察する。またその突起の状態、細胞突起間のギャップジャンクションの構成因子である connexin43 の発現について検討する。

同様に応力負荷後、培養液を回収し調整培地を作製、ここにマウス脛骨より採取した骨髄細胞を播種し、ALP、TRAP 活性の定量を行う。また、応力をかけた後の細胞を選択的に採取し、骨細胞に特異的な遺伝子発現を解析（RT-PCR 法）し、応力と骨形成の関係を解明する。

## 4. 研究成果

### *in vivo*

インプラント荷重後、4、8、12、16週後いずれにもインプラントのスクリー先端よりマイクロクラックの発生が認められた。マイクロクラックの定量は困難で、経時的には有意差は確認できなかった。天然歯と比較すると天然歯周囲にはマイクロクラックは認められず、歯根膜によって咬合力が緩衝されていることが示唆された。つまり、インプラント周囲には咬合力が直接骨に伝達し、マイクロクラックを発生させる要因になっていることが示唆された。

また、荷重負荷をした群は荷重なしの群と比較してマイクロクラックの発生量はやや多く観察されたが、定量はできなかった。今後はマイクロクラックの定量方法を開発し、統計学的に検討したいと考えている。

同モデルを使用して行ったインプラント周囲の免疫組織学的検討では、骨細胞のギャップジャンクション構成タンパクである Connexin43 の発現が、荷重群が非荷重群より多く認められた。またアポトーシスした骨細胞が非荷重群では認められなかったのに対して、荷重群ではインプラント周囲に多く認められた。骨細胞に発現する骨吸収因子スクレロスタチンの発現も荷重群で多く認められた。TRAP 染色においても活性部位が荷重群では多く認められた。つまり、咬合負荷によりインプラント周囲骨には Connexin43 の発現増加が認められ、咬合を骨細胞が伝達する上でギャップジャンクションの関与が示唆された。また、アポトーシスした骨細胞、スクレロスタチンの発現、TRAP 陽性細胞が認められ、

骨代謝の活性化の可能性は示された。これらの結果よりマイクロクラックの発生と骨吸収の惹起、そしてリモデリングのスイッチになる現象が組織学的に観察できたと考える。

#### in vitro

スレッド型チタンプレート周囲の生死細胞を染め分けただころ、チタンプレート付近では生細胞が突起を結合し合ってネットワーク構造を構成し、プレートを取り囲む様子が観察された。荷重群の方が突起部に connexin43 が有意に多く集積している様子が観察された。荷重群において、非荷重群と比べ有意にアポトーシス細胞の増加が認められた。またスレッド内にはスクレロステチンの発現が多く認められた。

real-time RT-PCR 法を行ったところ、荷重群において、RANKL、Connexin43、スクレロステチンの発現が非荷重群に比べて有意に増加していた。OPG、RANKL/OPG 比に関しては変化が認められなかった。

荷重群においてアポトーシスした骨細胞が増加したことで RANKL 分泌を促進したと考えられる。RANKL、スクレロステチンの発現上昇は破骨細胞を誘導し、ダメージを受けた骨を除去し作り変えるプロセスのスタートであると考えられた。Connexin43 の発現上昇については、免疫染色の結果と合わせ、チタンプレートからの刺激を骨細胞が受容して、互いに伝達し合っている可能性が再度示された。

チタンプレート周囲の骨細胞は、荷重によりアポトーシスを引き起こし、ギャップジャンクション機能が生存率や骨芽細胞活性に関与していることが示された。また荷重による RANKL や Connexin43、スクレロステチンの発現上昇を認めた。以上より、骨細胞はチタンプレートからの機械的刺激を受容し、ギャップジャンクションを介して周囲の骨細胞に伝達し、破骨細胞、骨芽細胞の活性にかかわる因子の調整を行うことが示唆された。

本研究では、骨細胞様細胞株 MLO-Y4 三次元培養を用いて反復伸張刺激を負荷し、ひずみの大きさに応じて細胞死や骨形成、骨吸収に関する種々の因子の発現という現象を引き起こすことを解明した。さらに、インプラントスレッド形態を模した実験装置を開発し、複雑なひずみを負荷することでも骨細胞の反応が生じることを観察した。また、どちらの実験系においてもギャップジャンクション構成因子である Connexin43 の発現上昇が認められ、骨細胞の応力応答にはギャップジャンクションを介した細胞間コミュニケーションが関与していると考えられた。動物実験においても Connexin43 の発現やアポトーシス、TRAP 活性の上昇といった反応を確認し、Connexin43 を介したギャップジャンクションによる細胞間連絡がインプラントからの力学的刺激を伝達し、インプラント周囲骨

における力学応答の一端を担っていることが示唆された。

結論：インプラント周囲における骨細胞はインプラント体により伝達された複雑な機械的刺激を感知し、その大きさに応じて骨吸収・骨形成につながる反応を生じることを明らかにした。また、その機序の一つとして、骨細胞のアポトーシスを起点と下ターゲットリモデリングや骨組織のひずみを感じた骨細胞反応が、インプラント周囲骨代謝に関与することが示唆された。

今後、インプラント周囲骨代謝機構の解明に繋がるラット顎骨インプラント荷重負荷モデルにおける長期的な組織学的評価、インプラントと骨細胞界面についての検討を進めていく必要がある。

#### 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 5 件)

富田 陽子、森山 泰子、鮎川 保則、古谷野 潔、インプラント周囲骨代謝と骨細胞の陸学応答の関連 -Association between bonemetabolism around dental implant and osteocytic mechanical response-、日本口腔インプラント学会、名古屋、2016年9月

Tomita Y, Moriyama Y, Ayukawa Y, Kurata K, Zhang H, Koyano K. Osteocyte Network Regulated by Mechanical Stress Activates Peri-implant Bone Remodeling. International Association for Dental Research, Soule. June., 2015.

Tomita Y, Moriyama Y, Ayukawa Y, Kurata K, Fukunaga T, Koyano K. Stress-induced osteocytic expression of connexin43 around the dental implant. The 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. Fukuoka. Oct., 2015.

Tomita Y, Moriyama Y, Ayukawa Y, Kurata K, Fukunaga T, Takamatsu H, Koyano K. Strain dependent response of osteocytes in peri-implant bone. Kyudai Oral Bioscience 2015, Fukuoka, Feb., 2015.

Tomita Y, Moriyama Y, Ayukawa Y, Kurata K, Fukunaga T, Takamatsu H, Koyano K. Osteocyte Involvement in Peri-implant Strain-related Bone Remodeling. International Association for Dental Research, Boston. Mar., 2015.

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森山 泰子 (MORIYAMA, Yasuko)  
九州大学・大学院歯学研究院・助教  
研究者番号：5 0 4 5 2 7 6 9

(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：5 0 1 9 5 8 7 2

(3) 研究分担者

鮎川 保則 (AYUKAWA, Yasunori)  
九州大学・大学院歯学研究院・准教授  
研究者番号：5 0 3 0 4 6 9 7

(4) 連携研究者

藏田 耕作 (KURATA, Kosaku)  
九州大学・大学院工学研究院・准教授  
研究者番号：0 0 3 6 8 8 7 0

(5) 研究協力者