

令和元年6月7日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11617

研究課題名(和文)インプラント周囲炎に対する先制医療戦略の基盤構築

研究課題名(英文)Strategy Foundation of Preemptive medicine for peri-implantitis

研究代表者

田口 洋一郎 (TAGUCHI, Yoichiro)

大阪歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：60434792

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)：高血糖モデル培地を用いて、歯周組織再生に關する細胞への影響とナノレベル表面構造制御チタン金属上における硬組織分化誘導に及ぼす影響について検討した。グルコース濃度はチタン表面の骨量と骨質に大きく關与しており、高濃度状態でも、ナノシート析出チタンを用いることで、通常と同等の骨質と骨量を獲得できる可能性が明らかになった。

実際の臨床を想定した高血糖モデル培地を用いて、歯周組織再生療法やインプラント治療で、硬組織形成における血糖値コントロールの重要性を示した。以前は困難であった糖尿病患者への幅広いレベルでの硬組織再生治療を受けることができる治療法が確立されることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の骨結合型インプラントは初めての症例が行われて約50年が経過している。そのなかで糖尿病を中心とした生活習慣病も今般の食生活の変化に応じて多くの患者が罹患されている。そのような患者がインプラントを過去に埋入されて悪化した症例や、その全身疾患のためにインプラント補綴を受けることができない症例が散見されている。

申請者らはペリオドンタルメディシンの一つで代表的な生活習慣病の糖尿病において硬組織再生治療に及ぼす影響について調べた。その結果、糖尿病患者のインプラント治療のオッセオインテグレーションの獲得がより堅固なものとなり、インプラント治療の適応範囲が拡大されていくのではないかと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Patients with Diabetes mellitus (DM) have an increased risk of losing their teeth compared with other individuals. Dental implants are a standard of care for treating partial or full edentulism, and various implant surface treatments have recently been developed to increase dental implant stability. However, some studies have reported that DM reduces osseointegration and the success rate of dental implants. The purpose of this study was to determine the effects of high glucose levels for hard tissue formation on a nano-scale modified titanium surface.

High glucose concentration increased hard tissue formation, but the quality of the mineralized tissue decreased. Furthermore, the nano-scale modified titanium surface increased mineralized tissue formation and anti-inflammatory, but the quality of hard tissue was dependent on glucose concentration.

研究分野：歯周病学，口腔インプラント学

キーワード：インプラント周囲炎 hyperglycemia 硬組織再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、歯周病患者においてもインプラント補綴治療は必須の選択肢となった。顎骨内に埋入されたインプラントフィクスチャーが良好に維持するためには、埋入後の Osseointegration の獲得と長期安定性が重要であり、課題として治療期間の長期化の最大要因である Osseointegration の期間短縮とインプラント周囲炎への対応がある。フィクスチャーの表面性状が細胞接着・硬組織への分化誘導に影響を与え、期間短縮に関係しているという報告もある (M.Vandrovcov et. al, *Physiological research/Academia Scientiarum Bohemoslova*. 2011.)。

材料のナノ化を利用し、従来にない新機能を見出す研究が進められ、インプラントの表面性状にも応用されつつある。酸化チタンは 300 °C 大気圧下における低温溶液化学的な合成手法を用いることでテンプレートを一切使わずに、ナノチューブ構造 (TNT) を自己組織化的に形成することが報告されて、我々も TNT の生体活性について成果を得ている (T.Kasuga et.al, *Advanced Materials.*, 1307-11, 11, 1999. , H.Nishida et.al, *J.A.O.R.*, 2011.)。

共同研究者らは、この TNT 合成研究の過程において、室温での濃アルカリ溶液中において純チタン金属から酸化チタンナノシート (TNS) が形成されることを見出した。

2. 研究の目的

申請者は、間葉系幹細胞の培養系で TNS 構造が無処理表面と比較して、有意に硬組織分化を促進し、TNS 構造が骨の分化・誘導に影響すると報告した (Komasa S, Taguchi Y et al, *J Prosthodont Res*, 2012) 。これは、従来と比べて Osseointegration 期間を短縮させる可能性を示唆し、さらに TNS 構造を 600 °C の焼結処理を加え XPS と XRD で評価したところ、表面に存在する酸化膜が水酸化ナトリウム中のナトリウムイオンと結合し、チタネート構造を形成し酸化層において " Rutile 層" と呼ばれる硬い結晶化相を形成したものと考えられる。他の報告 (T.Kasuga et.al, *Lanmuir.*, 3160-3, 14, 1998.) にもあるようにチタネート構造が骨分化誘導に関与していることが示唆される。

歯周病はグラム陰性嫌気性細菌を中心とする感染症と位置づけられ、インプラント周囲炎の細菌叢も類似している。Infection Control という観点から全身疾患とインプラント周囲炎の関連性 (Peri-implantitis medicine) も注目された問題点であり、対応が急務である。前述のインプラント表面のナノ構造化における表面の酸化チタンすなわち Rutile 層が抗菌作用を及ぼすかはこれからのインプラント周囲炎の予防戦略構築上、重要な注目点である。

3. 研究の方法

まず純チタン板表面への TNS 構造を作製し、細胞と構造の相関を精査する。インプラント材料と主に使用されている純チタン板を 10 M 水酸化ナトリウム水溶液に加え、室温条件下で 24 時間攪拌させて反応を進行し、大気圧下と共に反応を活性化させるために室温圧力下 (0.1-15MPa) での合成を行う。合成後に超純水で洗浄を繰り返し、溶存イオンの除去を行う。洗浄の進行は導電率によりモニターする。この後、真空乾燥することで試料を得る。

材料の表面構造を SEM, SPM 電子顕微鏡で観察し、構造を X 線回析で組成を EDX にて解析評価し、試料を作製する。

高グルコース培養下で β -glycerophosphate と ascorbin acid と dexamethasone 含有培養液にて細胞増殖能・ALP 活性について検索する。DNA マイクロアレイでの網羅的解析を行い、顕著な増加・減少している因子の mRNA に関してリアルタイム PCR での解析を予定している。とくにまた同時に培養上清に含まれる骨分化誘導を示すタンパクの ELISA 法による検索を行う。

実験動物には2型糖尿病モデルラット(GKラット),コントロールにはSprague-Dawley系ラットを用いて行い、*in vivo*での組織反応の観察の際に過去の標本と比較できるように行う。

4. 研究成果

我々はナノレベルでの表面改質を行うことで、硬組織誘導能を付与したナノシート析出チタン(NSx)が糖尿病患者のインプラント治療に有効ではないかと考え、高血糖モデル培地を用いて、チタン平板上における硬組織形成能について評価を行った。

ALP活性はグルコース濃度が上昇するにつれて抑制されていくが、OCN産生量とCa析出量はグルコース濃度が8.0mMの時に急激に減少し、その後はグルコース濃度の上昇とともに増加に転じる傾向にあった。またカルシウムとリン比はグルコース濃度が8.0mMでは減少し、グルコース濃度の上昇とともに増加に転じることが明らかになった。

加熱ナノ表面処理を行うことで、表面粗さとぬれ性を獲得し不純物が除去でき細胞にとって良好な環境となり、ALP、OCN、Ca、Pともに上昇したと考えられる。高グルコース環境では細胞内情報伝達が阻害されALP、OCN、Ca、Pが低下することが予想されるとの報告もあり、またLPS存在下で形成される硬組織と同様な幼弱な硬組織が多量に形成されるとも過去に報告されている。本研究でも8.0mMのグルコース濃度でOCN、Ca、Pが大きく変化しており、この時点で何かのスイッチがはいたのではないかと示唆される。骨粗鬆症の治療とモニタリングにおいて高いCa/P比は病状進行の重要な基準であるとの報告も含め、Ca/P比が高くなると骨質の低下が疑われる。リンは、リン酸エステルをALPが無機りんとアルコールに分解することで生じるが、高グルコース状態ではALP活性が低下し、Pの量が低下する。その結果としてCa/P比が高くなり、骨粗鬆症と同様な脆弱な骨が形成されることになると示唆される。

これらの結果から、グルコース濃度はチタン表面上の骨量と骨質に大きく関与しており、高グルコース状態であっても、ナノシート析出チタンを用いることで、通常グルコース濃度と同等の骨質と骨量を獲得できる可能性が明らかになった。したがって、このナノシート析出処理を施したインプラント体を適切に調製し使用することによって、糖尿病患者の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がより堅固なものとなり、糖尿病患者におけるインプラント治療の適応範囲が拡大されていくのではないかと考えられる。しかし、ナノシート析出チタンの詳細な作用機序の検討やイヌなどの大型動物による臨床モデル試験による検証が必須であり、今後の臨床応用に向けての課題として、検討していく必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6件)

原著論文

1 Masahiro Noguchi, Isao Yamawaki, Saitatsu Takahashi, Yoichiro Taguchi, Makoto Umeda.

Effects of α -tocopherol on bone marrow mesenchymal cells derived from type 2 diabetes mellitus rats
Journal of Oral Science, 2018; 60: 579-587. DOI: 10.2334/josnusd.17-0422. (査読有)

2. Nobuhiro Yamauchi, Yoichiro Taguchi, Hirohito Kato, Makoto Umeda.

High-Power, red-light-emitting diode irradiation enhances proliferation, osteogenic differentiation and mineralization of human periodontal stem cells via ERK signaling pathway.

Journal of Periodontology, 2018; 89: 351-360. DOI: 10.1002/JPER.17-0365. (査読有)

3. Mariko Nishizaki, Satoshi Komasa, Yoichiro Taguchi, Hiroshi Nishizaki, Joji Okazaki.

Bioactivity of NANOZR Induced by Alkali Treatment.

International Journal of Molecular Science, 2017; 18: E780. DOI: 10.3390/ijms18092009. (査読有)

4. Isao Yamawaki, Yoichiro Taguchi, Satoshi Komasa, Akio Tanaka, Makoto Umeda.

Effects of glucose concentration on osteogenic differentiation of type 2 diabetes mellitus rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on a nano-scale modified titanium.

Journal of Periodontal Research, 2017; 52:761-771. DOI: 10.1111/jre.12446. (査読有)

総説(ミニレビュー)

1. 田口洋一郎, 嘉藤弘仁, 山脇勲, 山内伸浩, 梅田誠.

高血糖状態が歯周組織再生療法やインプラント補綴治療における硬組織再生治療に及ぼす影響.

内分泌・糖尿病・代謝内科, 2018; 48: 142-148 (査読有)

2. 嘉藤弘仁, 田口洋一郎, 山脇勲, 奥田麻貴子, 小石玲子, 野口正皓, 山内伸浩, 今井一貴, 高橋宰達, 田中昭男, 梅田誠.

高血糖状態が骨髄由来幹細胞や歯根膜幹細胞の硬組織形成に与える影響.

日本歯周病学会会誌. 2017; 59: 118-124. (査読有)

[学会発表](計 13 件)

1. Ruan Yaru, 嘉藤弘仁, 田口洋一郎, 山内伸浩, 中田貴也, 緒方智壽子, 木村大輔, 梅田誠.

高出力赤色 LED 照射はヒト骨髄間葉系細胞の硬組織分化および石灰化形成を促進する

第 61 回日本歯周病学会秋季学術大会

2018 年 10 月 26 日 (大阪府, 大阪市)

2. 塩見慧, 山脇勲, 田口洋一郎, 野口正皓, 中垣直毅, 山岸信博, 那須誉, 本城佳明, 梅田誠.

P. gingivalis LPS 存在下における高グルコース環境がヒト骨髄間葉系細胞の硬組織分化に及ぼす影響.

第 61 回日本歯周病学会秋季学術大会

2018 年 10 月 26 日 (大阪府, 大阪市)

3. 中島幸市朗, 田口洋一郎, 山脇勲, 山内伸浩, 梅田誠.

高出力赤色 LED 照射における光増感剤がヒト歯肉上皮細胞に及ぼす影響.

第 61 回日本歯周病学会秋季学術大会

2018 年 10 月 26 日 (大阪府, 大阪市)

4. 田口洋一郎

LED が慢性歯周炎やインプラント周囲炎予防のための医療デバイスとして活躍する!

第 61 回日本歯周病学会秋季学術大会 シンポジウム 2

2018 年 10 月 26 日 (大阪府, 大阪市)

5. Yoichiro Taguchi, Nobuhiro Yamauchi, Hirohito Kato, Makoto Umeda..

High-Power, red-light-emitting diode irradiation enhances proliferation, osteogenic differentiation and mineralization of human periodontal stem cells via ERK signaling pathway.

EuroPerio9

2018 年 6 月 20-23 日, RAI Amsterdam (Amsterdam, Netherland)

6. 嘉藤 弘仁, 田口 洋一郎, 今井一貴, 野口正皓, 山内伸浩, 山脇勲, 富永和也, Ruan Yaru, 田中昭男, 梅田誠.

エムドゲイン由来ペプチドがヒト歯髄幹細胞の石灰化物形成能に及ぼす影響.

日本歯科保存学会 2017 年秋季学術大会 (第 146 回)

2017 年 6 月 10 日 リンクステーション青森 (青森県, 青森市)

7. 野口正皓, 田口洋一郎, 山脇勲, 片山暢仁, 高橋幸達, 梅田 誠

高グルコース環境と *Porphyromonas gingivalis* 刺激におけるヒト骨髄間葉系細胞に対する vitamin E の影響

日本歯科保存学会 2017 年秋季学術大会 (第 146 回)

2017 年 6 月 10 日 リンクステーション青森 (青森県, 青森市)

8. 田口洋一郎

歯周病学の未来を担う 高血糖状態が再生治療やインプラント埋入手術における硬組織形成に及ぼす影響.

第 60 回日本歯周病学会春季学術大会 シンポジウム 1

2017 年 5 月 12 日 (福岡県, 福岡市)

9. 田口 洋一郎, 劉大力, 山内伸浩, 山脇 勲, 野口 正皓, 嘉藤 弘仁, 周蓉, 梅田誠.

高出力赤色 LED がヒト歯肉上皮細胞に及ぼす影響.

日本歯科保存学会 2016 年度秋季学術大会 (第 145 回)

2016 年 10 月 27 日 (長野県, 松本市)

10. 山内 伸浩, 田口 洋一郎, 嘉藤 弘仁, 野口正皓, 今井一貴, 小淵健二郎, 梅田誠.

赤色 LED 照射は MAPK 経路を介してヒト歯根膜幹細胞の骨芽細胞分化を促進する

第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会

2016 年 10 月 7 日, 朱鷺メッセ (新潟県, 新潟市)

11. Yoichiro Taguchi, Isao Yamawaki, Satoshi Komasa, Hirohito Kato, Akio Tanaka, Makoto Umeda.

Osteogenic effects of high glucose concentrations on nano-modified titanium surface.

The 102nd Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology and Japanese Academy of Clinical Periodontology.

2016 年 9 月 10 ~ 12 日, San Diego Convention Center(San Diego, CA, USA)

12.Makoto Umeda, Hirohito Kato, Yoichiro Taguchi, Isao Yamawaki, Nobuhiro Yamauchi, Masahiro Noguchi.

Effects of hyperglycemia in human periodontal ligament stem cell.

The 102nd Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology and Japanese Academy of Clinical Periodontology.

2016年9月10～12日, San Diego Convention Center(San Diego, CA, USA)

13.山脇勲, 田口洋一郎、嘉藤弘仁, 山内伸浩, 野口正皓, 田中昭男, 梅田誠.

グルコース濃度がナノレベル表面構造制御チタン金属上における硬組織分化誘導に及ぼす影響.

第59回春季日本歯周病学会春季学術大会

2016年5月21日, かごしま県民交流センター(鹿児島県, 鹿児島市)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 楠本 哲次

ローマ字氏名: KUSUMOTO, Tetsuji

所属機関名: 大阪歯科大学・医療保健学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 70186394

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 山内 伸浩

ローマ字氏名: YAMAUCHI Nobuhiro

研究協力者氏名: 山脇 勲

ローマ字氏名: YAMAWAKI, Isao

研究協力者氏名: 嘉藤 弘仁

ローマ字氏名: KATO, Hirohito

研究協力者氏名: 梅田 誠

ローマ字氏名: UMEDA, Makoto

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。