

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12028

研究課題名(和文)インプラントメンテナンスでの低濃度フッ化物による創傷治癒の分子機構の解明

研究課題名(英文)The interplay between bone healing and remodeling of low-level fluoride during implant maintenance

研究代表者

木本 一成(Kimoto, Kazunari)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：60205010

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)：ビーグル犬(n=9)下顎両側大臼歯抜歯20週後、円柱状の4欠損部(左:実験群、右:対照群)を作成し、術後2週間観察した。0.2または4%NaFで3分間浸漬した低温焼成型吸収性HAを各々埋入し、免疫組織化学染色(IHC)と定量的RT-PCRで評価した。

新生骨の形成は1週後と2週後で埋入HA周囲に観察された。4日後と1週後の骨 HA界面ではRunx2とオステオカルシンの発現量が有意に上昇した。RT-PCRではRunx2 mRNAは対照群に比べてすべての実験群で高く(p<0.05)、1週後でピークに達した。オステオカルシン mRNA発現量は徐々に増加し、2週後でピークに達した(p<0.05)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低濃度Fに誘導されたRunx2とOsteocalcinのRNA発現は、H-E・アザン・マッソントリクローム・トルイジンブルー染色からみて、石灰化を促進した。免疫組織染色標本と定量PCR評価は、高濃度Fに比較して低濃度Fが良好な結果を示したことから、徐放性低濃度Fに誘導されたRunx2とOsteocalcinのRNA発現は、新生骨に特異な基質を生成し、石灰化を促進すると考える。

本研究のような骨芽細胞分化・活性化のメカニズムの解明は、新たな治療法の開発につながりうる重要な研究といえる。

研究成果の概要(英文)：The lower bilateral molars were extracted, and four cylindrical defects were created on both sides of the mandible in Beagle dogs (n=9, 20 weeks). These were divided into 2 groups (Left side: experimental group, Right side: control group) and observed for 2 weeks after surgery. The low-temperature sintering absorption HA was rinsed with 0.2 or 4% NaF for 3 minutes and was inserted on each defect. Immunohistochemical staining (IHC) and quantitative RT-PCR were performed to detect.

New bone formation was observed in 1 week and 2 weeks groups around the implanted HA. Runx2 and Osteocalcin expressions were significantly upregulated in the interface between the bone and HA at 4 days and 1 week. RT-PCR results revealed that the expression level of Runx2 mRNA was induced in all experimental groups compared to the controls (p<0.05) and reached the peak at 1 week. Osteocalcin mRNA expression was gradually increased with implantation time and peaked at 2 weeks (p<0.05).

研究分野：予防歯科・口腔衛生学

キーワード：中性低濃度フッ化物応用 中性高濃度フッ化物応用 徐放性フッ化物イオン 低温焼成型吸収性合成ハイドロキシアパタイト TOYOビーグル犬顎骨 創傷治癒過程 Runx2 mRNA発現 Osteocalcin mRNA発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

低濃度フッ化物(以下Fと略す)は、生体の硬組織に対して高い親和性を有する、必要不可欠な微量元素である。研究代表者は、ヒト骨芽細胞の遊走能、増殖能ならびにALP活性を向上すること(Ohno M、Kimoto K、et al、J Oral Implantology、2013)を過去に報告した。また、低温焼成型吸収性合成ハイドロキシアパタイト(以下HAと略す)顆粒は、生体材料として歯周治療や口腔インプラント臨床に利用されていることから、研究代表者は低温焼成型吸収性HA顆粒のF応用後の変化に着目し、F応用の影響を検討した。その結果、HA結晶の向上性およびF徐放性が認められ、HAがF供給源として期待できることを報告した(Kimoto K et al、J Oral Implantology、2011)。

口腔インプラント植立後に最も注意を払う点は、インプラント体と歯肉結合部間からの歯槽骨の吸収である。切開を加えられた口腔粘膜創面はインプラント体と接することから、口腔粘膜上皮のdown growth(もぐりこみ)によって、インプラント体と接する歯肉上皮が新生される。この歯肉上皮の下方にはインプラント体と接して結合組織層が存在し、次に歯槽骨へと続く。研究代表者は、Fによる細胞への影響を検討した結果、 μM レベルの低濃度Fが上皮細胞の増殖や移動を促進すること(Arakawa Y、Bhawal UK、Ikoma T、Kimoto K et al、Biomedical Research、2009)を報告した。

これに関連し、研究共同者らは、低濃度Fは線維芽細胞増殖因子(FGF)2、FGF7の発現を上昇させ、上皮細胞移動や増殖が強くみられて、上皮の形態発育と再生を促進すること、また間葉系幹細胞マーカーTwist1の発現を上昇させて上皮間葉相互作用を刺激し、動態の上皮間葉相互作用となって、FGFの生物学的な効果と同様に、上皮の形態発育と再生を促進すること(He D、Bhawal UK et al、J Hard Tissue Biol、2013)を報告した。

口腔インプラントの場合、歯肉上皮の物理的な脆弱さを補う組織として歯肉上皮下縁と歯槽骨頂間に広がる結合組織層が存在する。上皮間葉相互作用を促進するプロパティを持つために、低濃度Fが口腔粘膜再生と発育に有益な元素になることから、創傷治癒に着目してForkhead box (FOX)転写因子ファミリーのサブクラスFOXO1の可能性を示唆し、低濃度FとFOXO1の関連性の研究を進めている。本研究において、インプラント体への低濃度F応用により、FOXO1転写因子の分子機構の解明は創傷治癒のメカニズムを解明するだけでなく、インプラント体周囲の骨性治癒(骨形成)において、抜歯窩での骨性治癒の経過の基本像と重ね合わせることができる。

創傷治癒とは、障害を受けた組織が再度バリアーとして再構築される一連の修復過程を示す。中でも、細胞の創傷治癒における一つの側面は、細胞骨格および極性輸送を損傷部位にむけ再構築することである。近年、細胞創傷治癒に関与するタンパク質は精力的に同定されつつあるが、それらはまだ一貫した反応として統合されていない。また、F全身応用は骨折や成人の骨粗鬆症を予防するという知見が報告されている。以前に、申請者らは μM レベルの低濃度Fの細胞への影響を検討し、それらが上皮細胞の増殖や移動を促進することを報告した。

本研究は、低濃度Fが口腔粘膜再生と発育に有益な元素となることに着目し、低濃度Fの創傷治癒・治癒促進に対するメカニズム、骨と結合組織に対する低濃度Fの相互作用の2点を検討するものである。本研究によってFが治癒促進に効果的であるという情報を発信し、今後の臨床応用への発展に寄与できると考える。特にインプラントと抜歯窩の骨性治癒過程は基本像を重ね合わせることが多く、治癒促進のメカニズム解明が臨床現場に与える影響は大きい。以上のことから、本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義として、上記2点の検討によって、低濃度F応用による新たな臨床術式の基盤になると考える。

2. 研究の目的

Fは、骨や歯の硬組織に対して高い親和性を有する。研究共同者らは、低濃度Fの全身投与が実験的歯周病モデルラットでの歯槽骨吸収の抑制メカニズムを解析し、また上皮間葉相互作用を刺激して、上皮の形態発育ならびに再生を促進することを確認した。さらに、研究代表者らは低濃度Fの研究結果によって、ヒト骨芽細胞の遊走能、増殖能ならびにALP 活性の向上を認め、歯周治療や口腔インプラント治療に重要であることを示唆した。低濃度Fは口腔粘膜の再生、発育に有益な元素であることから、本研究では細胞レベルでの経時的な創傷治癒に着目し、口腔インプラント臨床での中性低濃度F応用後における低温焼成型吸収性合成HAから徐放されるFによって、創傷治癒過程に及ぼす分子機構メカニズムを解明することにある。

(1) 中性低濃度F および高濃度Fの創傷治癒過程に及ぼす効果 (DNAマイクロアレイおよびmicroRNAマイクロアレイ解析)

生後約24月齢ビーグル犬9頭下顎骨(骨欠損部に低濃度Fまたは高濃度Fを処理したHA)を用いて、DNAマイクロアレイおよびmicroRNAマイクロアレイ解析にて網羅的遺伝子、microRNA発現解析を行った。マイクロアレイ解析により同定された遺伝子、microRNAの発現をリアルタイムPCR法およびウェスタンブロットティング法を用いて確認した。さらに、免疫組織化学染色法によりFOXO1、MMPsなどタンパク発現を明らかにした。

(2) 歯肉上皮細胞、歯肉線維芽細胞、歯根膜細胞における濃度依存的Fの機能に対するin vitro評価

Fの骨分化能を評価するため、低濃度Fおよび高濃度Fを用いて歯肉上皮細胞、歯肉線維芽細胞、歯根膜細胞における創傷治癒能を評価した。各群を6穴培養ディッシュに静置後、 1×10^4 cells/mlのMC3T3-E1を基板表面に播種し、培養一定期間(6時間、12時間、24時間、48時間、72時間)ごとに、リアルタイムPCR法にてmRNA発現、さらにウェスタンブロットティング法、ELISA法を用いてタンパク質発現を調べた。

(3) 濃度依存的Fの骨分化能に対するin vitro評価

低濃度Fおよび高濃度Fを用いてマウス骨芽細胞(MC3T3-E1)の骨分化能を評価した。各群を6穴培養ディッシュに静置後、 1×10^4 cells/mlのMC3T3-E1を基板表面に播種し、培養一定期間(1日、3日、7日、14日)ごとの細胞数とアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を測定した。また、SEMを用いて培養期間ごとの細胞の形態観察を行った。チタン基盤上の骨芽細胞に対してVon Kossa染色、アリザリンレッド染色を行った。

3. 研究の方法

生後約24月齢ビーグル犬9頭の下顎両側臼歯部を抜歯後、18~20週を経過した後に実験に用いた(体重 10.6 ± 1.0 kg)。下顎骨欠損部両側に円筒形状人工欠損(3.5×7.0 mm)4箇所を形成し、右側を非埋入側、左側を埋入側とした。埋入する低温焼成型吸収性HAは、低濃度F(0.2% NaF)あるいは高濃度F(4% NaF)溶液を3分間作用させて蒸留水100 mlで水洗して前処理とした。各F濃度の2実験群とF溶液未処理HAを各頭の左側4箇所に埋入して縫合し、4日(4D群)、7日(1W群)、14日(2W群)後に再度切開して歯科用トレフィンバーにて埋入物質を採取した。対照群として右側の非埋入側人工欠損部から骨様物質を同様に採取した。採取物質は4%パラホルムアルデヒドで固定後、病理組織像切片を作製し、H-E・アザン・マッソントリクローム・トルイジンブルー染色にて観察し、免疫組織染色法と定量PCRにて、骨芽細胞分化に必須な転写因子Runx2とOsteocalcinの発現量を検討した。

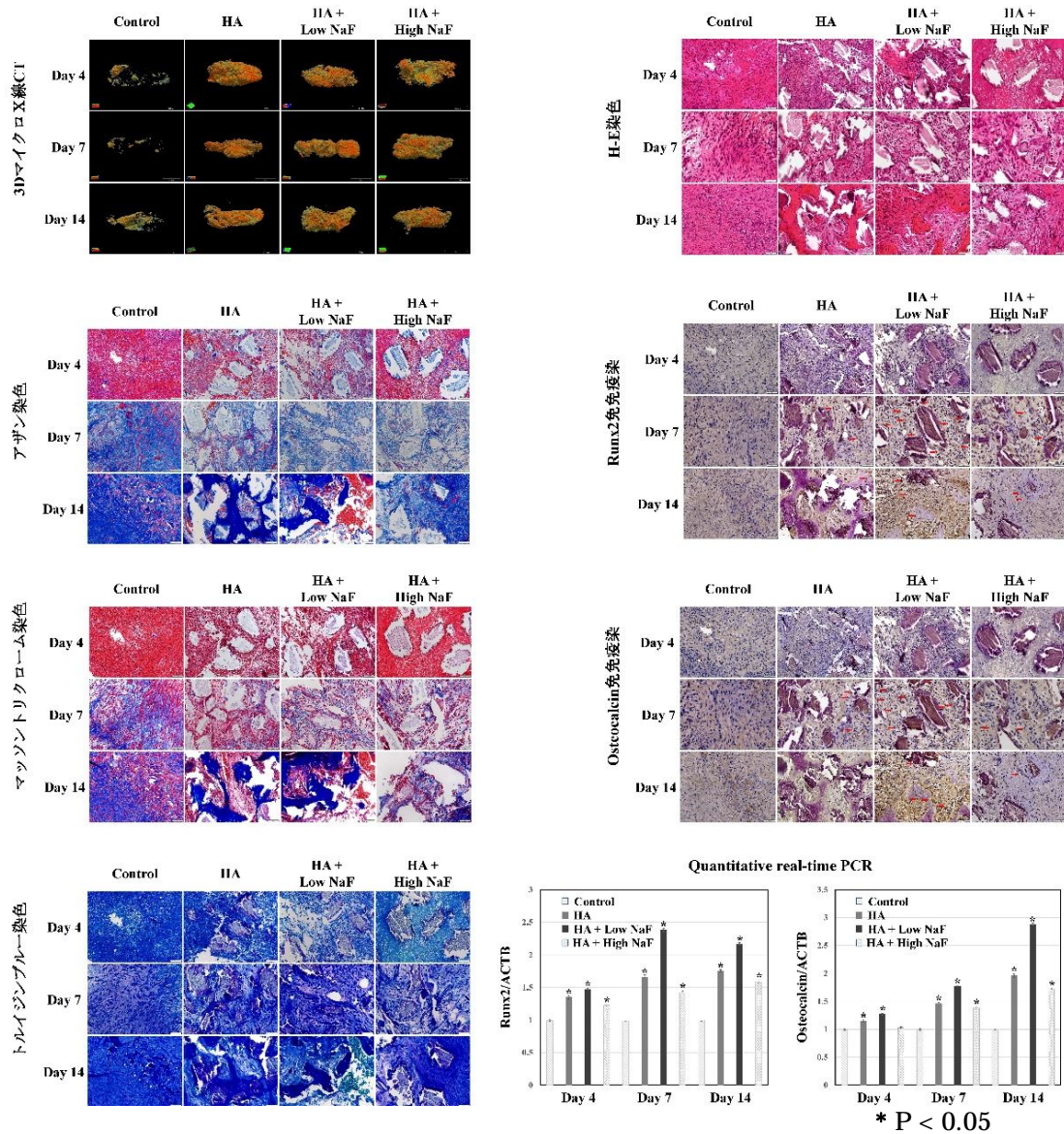
4. 研究成果

H-E・アザン・マッソントリクローム・トルイジンブルー染色では、4D群でF処理の埋入

HA形態と大きさに変化はみられなかったが、1W群と2W群の低濃度Fで埋入HAの周囲に多くの新生骨と骨芽細胞を認めた。Runx2とOsteocalcinの免疫反応では4D群と1W群の骨補填材界面に両転写因子が出現し、2W群においても両者の沈着を認めた。Runx2 mRNAは、非埋入側に比較して1W群でピークに達したものの、4D群、1W群、2W群のすべての群で有意に増加した($P < 0.05$)。またOsteocalcin mRNAは、経時的に徐々に増加して2W群でピークに発現した($P < 0.05$)。免疫組織染色標本と定量PCR評価は、低濃度Fが高濃度Fと比較して良好な結果を示した。

今回の低濃度Fによって誘導されたRunx2とOsteocalcinのmRNA発現は、H-E・アザン・マッソントリクローム・トルイジンブルー染色から認められたように、骨に特異な基質を生成して石灰化を促進すると考える。骨芽細胞分化・活性化のメカニズムの解明は、新たな治療法の開発につながりうる重要な研究といえる。結論として、徐放性低濃度Fに誘導されたRunx2とOsteocalcinのmRNA発現は、新生骨に特異な基質を生成し、石灰化を促進した。

(動物実験倫理委員会承認 承認番号17-034)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木本一成, 渡辺孝夫, 小田部岳雄, 村上龍也, パワール ウジャール
2. 発表標題 徐放性低濃度フッ化物による創傷治癒の分子機構に関する研究 - 骨芽細胞分化に関わるRunx2およびOsteocalcinの発現 - .
3. 学会等名 公益社団法人日本口腔インプラント学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木本一成, パワール ウジャール, 古澤利武, 渡辺孝夫
2. 発表標題 徐放性低濃度フッ化物は骨芽細胞分化に関わるRunx2およびOsteocalcin発現量を増加して石灰化を促進した.
3. 学会等名 一般社団法人日本口腔衛生学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	B h a w a l U j j a l (Bhawal Ujjal) (50433339)	日本大学・松戸歯学部・助教 (32665)	