

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19770

研究課題名（和文）骨細胞を基軸とするオートファジー誘導性優先配向制御機構の解明

研究課題名（英文）Autophagy-induced bone quality via osteocytes

研究代表者

澤瀬 隆（SAWASE, Takashi）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・教授

研究者番号：80253681

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：歯科インプラント治療は失われた歯を回復するための方法ですが、約3割の患者さんには力のかかりすぎや炎症によりインプラントを支える骨がなくなり、予後に悪影響を与えるという問題が起こります。そこで私たちは、世界中で行われているインプラント研究とは全く異なる点に着目し、力のかかりすぎや炎症で骨の質が劣化してこのような問題が起こると仮説を立て、動物実験を行いました。その結果、インプラントに力を加えると、早期にいくつかの遺伝子変動が起こり、このことはインプラントのデザインを変えると大きく変化することが分かりました。以上から、骨質の変動が、インプラント治療の予後決定因子である可能性が強く示唆されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究はインプラント治療の問題点について、今までのインプラント研究とは大きく視点を変えて骨質の点から動物実験を行いました。そして、力のかかった状態や骨質を強制的に良くしたとき、骨質がどのような因子によってコントロールされているかの仕組みを明らかにする手がかりを得られたことが大きな学術的意義であるといえます。この研究は基礎的ではありますが、研究の基盤を作ることは今後の患者さんのインプラント治療に反映できる研究が発展するための足がかりになると思われ、社会的意義も大きいといえます。

研究成果の概要（英文）：Dental implant treatment is an available treatment option to replace missing teeth. However, negative clinical outcome occurs by the loss of marginal bone around dental implants with overloads and periimplantitis in the 30% of patients who received implant treatment. Thus, we hypothesize that several factors related with autophagy play an important role in regulating bone quality around dental implants. We found that expression levels of several genes including semaphorin 3A and autophagy-related genes were significantly changed under mechanical loaded conditions. Moreover, these alterations of gene expression occurred in an implant design-dependent manner. Our findings suggest us that bone quality may become the determining factor in clinical outcome.

研究分野：補綴系歯学

キーワード：デンタルインプラント 荷重 骨関連細胞 オートファジー コラーゲン 骨質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラント治療は歯の喪失を回復する有効な治療法である。10年で95%以上の高い生存率が報告されているが、生存するインプラントの約30%は過重負担やインプラント周囲炎で支持骨が減少し、長期経過症例の増加とともに大きな社会問題となっている。インプラントと骨がいかに結合するかに着目してきた現在までのインプラント研究ではこれらの問題を解決することは困難で、今までの研究とは学術体系を大きく変革させる新たなアプローチによるインプラント研究が求められている。

現在までの骨研究では、骨量と骨密度に焦点が当てられてきた。ところが2000年に米国国立衛生研究所が「骨質の新規概念(骨強度=骨質+骨密度)」を提唱し(Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. NIH Consensus Statement 2000)、(1)骨質の構成要素である生体アパタイト結晶(BAp)とコラーゲン線維(CoI)の優先配向が主応力方向に一致すること(Nakano T et al. *Bone*. 2002)、(2)骨強度には骨質のほうが骨密度よりも重要な役割を果たすこと(Ishimoto T et al. *J Bone Miner Res*. 2013)、ならびに(3)骨質の構成要素である骨細胞は荷重応答の司令塔であること(Bonewald F. *J Bone Miner Res*. 2011)が明らかにされ、医科領域では既に、骨の長期安定性には荷重と骨質が重要な役割を果たすことが証明されている。ところが歯学領域では申請者の研究報告(Kuroshima S et al. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015, Sasaki M et al. *J Biomech*. 2015, Yasutake M et al. *Implant Dent*. 2016, Kuroshima S et al. *Acta Biomaterialia*. 2017)を含めてもわずかに10報程度しか骨質研究がなく、骨質の重要性が全く認識されていないのが現状である。申請者は近年、荷重の影響を受けた培養骨細胞様細胞がオートファジー関連遺伝子の発現様式を変化させ、細胞形態や細胞配向に影響を与える手がかりを突き止めた(稲葉菜緒ら。第45回日本口腔インプラント学会学術大会。デントプライ賞。2016, Inaba N et al. *Biochem Biophys Res*. 2017)。オートファジーは飢餓状態から細胞を保護する自食作用と定義されているが、その機能は依然として不明な点が多い。

一方、脛骨を含む長管骨は、顎骨と比較して代謝回転が1/10であること(Russel RG et al. *J Dent Res*. 2008)や、長管骨と顎骨では骨髄由来の破骨細胞形成能が異なること(de Souza Faloni AP et al. *Calcif Tissue Int*. 2011)から、申請者は、「荷重によるインプラント周囲の骨質変化は顎骨と長管骨で異なる」と仮説を立て、ビーグル犬の下顎骨に埋入されたインプラント周囲骨の検索を開始し、荷重は骨量と骨密度ではなく骨質のみを適応変化するという、顎骨と長管骨での荷重応答性の違いを突き止め、顎骨においては、荷重がインプラント周囲骨組織の骨質を適応変化させ、その変化は長管骨とは異なる可能性を証明した(Kato H et al. *J Oral Implantol*. 2018)。

2. 研究の目的

本研究の仮説は、「インプラント周囲骨組織で起こる荷重誘発性オートファジー関連分子の変動が骨質を変化させる」である。

したがって本研究の目的は、荷重に起因する骨質変化の主軸を担うBAp/CoI複合体と骨関連細胞(骨細胞、破骨細胞、骨芽細胞)の動態制御機構とその因子を同定し、インプラント周囲骨組織の長期安定性に寄与するかを検討することにある。

3. 研究の方法

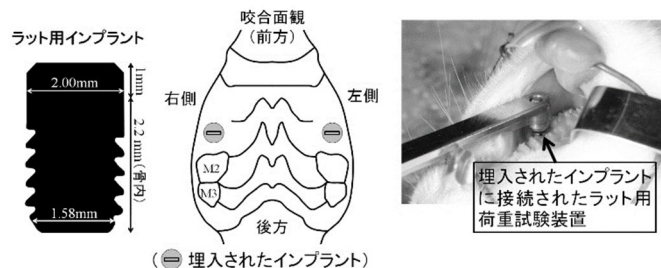
(1)インプラントを介した荷重が骨質に与える影響の検索

上顎両側第1大臼歯を抜歯後3週(Kuroshima S et al. *J Dent Res*. 2013)で、当講座で開発済みの通常型インプラントと、ネック部のデザインを変えた改良型ラット用インプラントを埋入した。また、実験的難易度の問題から口腔内におけるインプラント生着率を鑑みて、脛骨にも同様にインプラントを埋入した。

埋入3週間後から開発済みの荷重試験装置を用い、すでに報告した繰り返し荷重をインプラント長軸に与えた(Uto Y et al. *PLoS One*. 2017)。

荷重開始2週間と5週間でラットを屠殺して上顎骨と脛骨を摘出・回収して組織切片を作成し、BAp, CoI, 骨細胞の優先配向方向を、偏光顕微鏡や走査型電子顕微鏡などでそれぞれ測定後に定量解析した。

別の動物検体では、荷重開始30分でラットを屠殺して上顎骨と脛骨をそれぞれ摘出し、インプラント周囲骨組織から分担者が開発した方法(Kuroshima S et al. *Calcif Tissue Int*. 2013)、すなわち歯科用リーマーで骨髄を完全に除去した硬組織を粉末化し、TRIZOL処理とフェノール・クロロフォルム抽出で遺伝子を採取した。抽出遺伝子はマイクロアレイ受託解



析し、オートファジー関連分子の検索を行った。

別の動物検体では、荷重開始 24 時間後でラットを屠殺して上顎骨と脛骨をそれぞれ摘出し、タンパク質を抽出した。タンパク質抽出は、粉末化した硬組織を SDS-PAGE サンプルバッファで 100 ・ 10 分処理し抽出した (Piemontese M et al. *Sci Rep.* 2016)。プロテオーム受託解析し、オートファジー関連分子の検索を行った。

(2) 骨質向上型ラットインプラントモデルの作成

現在わが国で骨粗鬆症薬として認可されている PTH 製剤は、間歇的投与によって骨量や骨密度を増大させることが証明されており、さらには各骨関連細胞にもそれぞれ異なった影響を与えて骨質を向上させることから (骨細胞のアポトーシス抑制、骨芽細胞分化の促進、破骨細胞への影響など)、PTH の間歇的投与とインプラント埋入を併用したモデルを骨質向上ラットインプラントモデルとして開発した。

(1)と同様にして上顎骨と脛骨にそれぞれのインプラントを埋入し、インプラント埋入 3 週間後から、生理食塩水投与群と PTH 製剤投与群に無作為に分け、荷重を付与して 2 週間後と 5 週間後に屠殺を行った。

屠殺時に上顎骨と脛骨を摘出・回収して、マイクロ CT による 3 次元的構造解析、ヘマトキシリン エオジン染色による組織形態学的評価 (骨細胞ネットワーク解析も含む)、特異抗体 Runx2 を用いた骨芽細胞の免疫染色、TRAP 染色による破骨細胞数の定量解析、ピクロシリウスレッド染色と偏光顕微鏡を用いたコラーゲンの種類の同定解析と配向性解析、ならびに、骨組織から骨細胞遺伝子を回収後に定量 PCR (Inaba N et al. *Biochem Biophys Rep.* 2017) を用いた遺伝子解析とマイクロアレイ解析などを行った。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

インプラントを介した荷重が骨質に与える影響の検索

インプラント埋入 2 週間後と 5 週間後に屠殺して上顎骨に埋入されたインプラント周囲骨を皮質骨領域と海綿骨領域に分けて詳細に解析した結果、以下の成果を得た。

- ・ 皮質骨領域に埋入されたインプラント周囲骨組織
 - a. 2 週間と 5 週間後における骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞に大きな変化は認められなかった。
 - b. コラーゲン線維の種類について解析すると、タイプ III コラーゲンの増大量が後半 3 週間で有意に増大していた。
 - c. 骨細胞が産生するスクレロステチンの分布を検索すると、インプラント埋入 5 週間後では荷重付与によりスクレロステチンが有意に産生抑制されていた。
- ・ 海綿骨領域に埋入されたインプラント周囲骨組織
 - a. 荷重 5 週間後には骨細胞ネットワークが著しく発達し、破骨細胞は 2 週で荷重により増大したが 5 週では荷重の影響はなく、また、骨芽細胞は 2 週と 5 週で荷重によりその数を有意に増大させた。
 - b. コラーゲン線維の種類について解析すると、タイプ I コラーゲンもタイプ III コラーゲンも、荷重付与 2 週間では変化が認められなかったが、荷重付与 5 週間では荷重群で有意な繊維の増大を認めた。
 - c. 骨細胞がスクレロステチン産生も荷重 5 週間後に増大が認められた。
- ・ 荷重付与 30 分後の検体から採取した骨細胞遺伝子の定量 qPCR 解析
 - a. 荷重群において、荷重付与 30 分後にはすでに *RANKL* の相対発現が有意に増大していた。
 - b. 骨芽細胞マーカーである *cbfa1* や *ALP* の相対発現が有意に増大していた。
 - c. 3 つのオートファジー関連遺伝子に大きな変動が認められた。
- ・ 荷重付与 30 分後の検体から採取した骨細胞遺伝子のマイクロアレイ解析
 - a. 荷重群において、多くのオートファジー関連遺伝子、種々のサイトカイン・ケモカインに大きな変動が認められた。
 - b. 興味深いことに、インプラントのデザインが異なると、上記変動遺伝子に差異が認められた。

PTH 製剤の間歇的投与が、脛骨に埋入されたインプラント周囲骨組織の骨質 (骨質向上型ラットインプラントモデル) に与える影響を、スレッド内部領域と外部領域に分けて詳細に解析し、以下の成果を得た。

- ・ PTH 製剤の間歇的投与は、スレッド内部領域における骨量を有意に増大させるが、外部領域では変化が起こらない。
- ・ PTH 製剤の間歇的投与は、スレッド内部領域における骨細胞数、骨芽細胞数、破骨細胞数の全てを有意に増加させていた。
- ・ PTH 製剤の間歇的投与は、スレッド外部領域における骨細胞数と骨芽細胞数の両者を有意に増大させたが、破骨細胞には影響を与えなかった。
- ・ PTH 製剤の間歇的投与は、スレッド内部領域におけるタイプ III コラーゲン産生量を増大させたが、タイプ I コラーゲンの産生量には変化がなかった。

- ・ PTH 製剤の間歇的投与は、スレッド外部領域におけるタイプ I コラーゲンの産生量を有意に増大させたが、タイプ III コラーゲンの産生量には影響を与えなかった。上記と合わせると、部位特異的にコラーゲンの種類が変化しているか、部位特異的に骨成熟度合いの速度が異なると判断できた。

(2)得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究では荷重環境下におけるインプラント周囲骨組織の骨質に着目し、さらにはオートファジーに焦点を当てて検索を行ったが、インプラント周囲骨組織に関する骨質研究は、我々の基礎研究以外はほとんど報告がなく、また、オートファジー関連分子の挙動を骨質と合わせて解析した研究は皆無である。以上から、本研究は国内外において先駆的研究であり、研究結果がインプラント研究領域に与えるインパクトは非常に大きい。

(3)今後の展望

本研究では、荷重環境下におけるインプラント周囲骨組織でオートファジー関連遺伝子の変動が認められてその関連性が示唆されたが、決定的な分子の同定までには至らなかった。また、骨組織の成り立ちの違いによるインプラント周囲骨組織の部位特異性(顎骨と長管骨)については更なる検討が必要であるため、本研究で得られたサンプルをさらに詳細に解析し、骨質制御機構の解明と顎骨の特異性について研究を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 黒嶋伸一郎, 加来 賢, 石本卓也, 佐々木宗輝, 中野貴由, 澤瀬 隆	4. 巻 10
2. 論文標題 歯科補綴学における骨質のパラダイムシフト	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本補綴学会誌	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2186/ajps.10.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 黒嶋伸一郎, 澤瀬 隆	4. 巻 32
2. 論文標題 高齢者に対するプレジジョンインプラント治療の提案	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本口腔インプラント学会誌	6. 最初と最後の頁 92-101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11237/jsoi.32.92	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchida Y, Kuroshima S, Uto Y, Kanai R, Inoue M, Suzue M, Sawase T	4. 巻 -
2. 論文標題 Intermittent administration of PTH improves bone quality and quantity around implants in rat tibiae	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Oral Biosci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 黒嶋伸一郎
2. 発表標題 補綴治療に求められる骨質を科学する。「骨質を基盤とした補綴歯科治療戦略は必要か」
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会 第127回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 右藤友督, 黒嶋伸一郎, 石本卓也, 内田悠介, 叶井里歩, 中野貴由, 澤瀬 隆
2. 発表標題 インプラントを介した規則的な繰り返し荷重が骨関連細胞とコラーゲンの配向性に与える影響
3. 学会等名 第38回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 右藤友督, 黒嶋伸一郎, 石本卓也, 中野貴由, 澤瀬 隆
2. 発表標題 規則的な繰り返し荷重がインプラント周囲の骨関連細胞とコラーゲンの配向性に与える影響
3. 学会等名 第4回日本骨免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 右藤友督, 黒嶋伸一郎, 石本卓也, 稲葉菜緒, 内田悠介, 中野貴由, 澤瀬 隆
2. 発表標題 ラット上顎骨に埋入されたスレッドインプラント周囲における荷重の影響
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒嶋伸一郎
2. 発表標題 口腔インプラント治療と研究をつなぐ。「骨質を基軸とした新規インプラントの開発とインプラント-薬剤関連顎骨壊死の病態解明に向けた取り組み」
3. 学会等名 平成30年度公益社団法人日本補綴歯科学会九州支部学術大会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 右藤友督, 黒嶋伸一郎, 内田悠介, 叶井里歩, 澤瀬 隆
2. 発表標題 インプラント周囲骨組織における荷重応答性の骨質変化
3. 学会等名 平成30年度公益社団法人日本補綴歯科学会九州支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inaba N, Kuroshima S, Uto Y, Uchida Y, Sawase T
2. 発表標題 Effect of local PTH administration on maxillary bone around implants in osteoporotic rats
3. 学会等名 28th Annual scientific meeting of the Australian and New Zealand Bone and Mineral Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Uto Y, Kuroshima S, Inaba N, Uchida Y, Kanai R, Sawase T
2. 発表標題 Effect of mechanical loading on bone around threaded implants in rat maxillae
3. 学会等名 Effect of mechanical loading on bone around threaded implants in rat maxillae (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒嶋伸一郎
2. 発表標題 高齢患者に対するプレジジョンインプラント補綴治療の提案
3. 学会等名 第48回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Uto Y, Kuroshima S, Inaba N, Uchida Y, Kanai R, Sawase T
2. 発表標題 Mechanical repetitive load on implant enhances bone quality around implant
3. 学会等名 The11th AAO CONGRESS MEETS ITI KOREA AND KASFO (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sasaki M, Kuroshima S, Sawase T
2. 発表標題 Effect of phosphorus on osteocyte function and aging
3. 学会等名 Secretariat of the 7th Seoul Symposium on Bone Health (SSBH 2019) & the 31th Annual Meeting of the Korean Society for Bone and Mineral Research(KSBMR) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 右藤友督, 黒嶋伸一郎, 内田悠介, 叶井里歩, 鈴江正義, 澤瀬 隆
2. 発表標題 規則的な繰返し荷重は顎骨に埋入されたインプラント周囲骨組織の荷重応答性適応変化を誘導する
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 右藤友督, 黒嶋伸一郎, 内田悠介, 叶井里歩, 鈴江正義, 澤瀬 隆
2. 発表標題 ラット上顎骨に埋入したインプラントへの繰返し荷重がインプラント周囲骨組織のリモデリングに与える影響
3. 学会等名 第49回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sasaki M, Kuroshima S, Sawase T
2. 発表標題 Correlation between phosphorus concentration and autophagy
3. 学会等名 29th Australian and New Zealand Bone and Mineral Society Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019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	黒嶋 伸一郎 (KUROSHIMA Shinichiro) (40443915)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授 (17301)	
研究分担者	佐々木 宗輝 (SASAKI Muneteru) (10706336)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教 (17301)	
研究分担者	中島 和慶 (NAKAJIMA Kazunori) (40707246)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員 (17301)	
研究分担者	住田 吉慶 (SUMITA Yoshinori) (50456654)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授 (17301)	
研究協力者	石崎 明 (ISHISAKI Akira)		