

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2015～2019

課題番号：15H02573

研究課題名（和文）デンタルインターフェイスにおける応力 - セルシグナル変換の解明と個体差医療への展開

研究課題名（英文）Elucidation of stress-cell signal conversion at the dental interface and its application to individualized medicine

研究代表者

古谷野 潔 (KOYANO, Kiyoshi)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：50195872

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 32,100,000円

研究成果の概要（和文）：歯科領域において物理学的な刺激が、セルシグナルに変換される仕組みはきちんと説明されていない。本研究は、物理的な刺激を化学的刺激に変換される仕組みを考究することで、歯科臨床における力学的な刺激の位置づけを定義することを目的として企画した。本研究では、インプラントに横向きに間欠的に応力を作用させた場合圧縮側に骨形成が起こること、40Nと60Nでは40Nの方が骨接触率が高いこと、メカニカルローディングにより骨細胞がアポトーシスを起こし、コネキシン43の発現が上昇すること、エストロゲン欠乏が骨形成とオッセオインテグレーションに及ぼす負の影響を機械的負荷によって減衰させることなどが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科においては、応力はオーバーロード、歯周病の増悪因子<不良な予後>と関連づけて論じられることが多い。一方他の医科領域では、生活不活発病、サルコペニアなど、<力の不足は廃用萎縮の原因>となるといった論調で用いられることが多い。この相違を明確に説明できた研究はない。本研究では、応力による骨吸収について、その概念を整理し、発症メカニズムを理解すること、その結果を踏まえて応力による骨吸収をコントロールすることを目的としていたが、その一端が解明され、歯科臨床における力による骨吸収についての理解が深まり、力による骨吸収を制御できる可能性について重要な知見を提供できたと考えている。

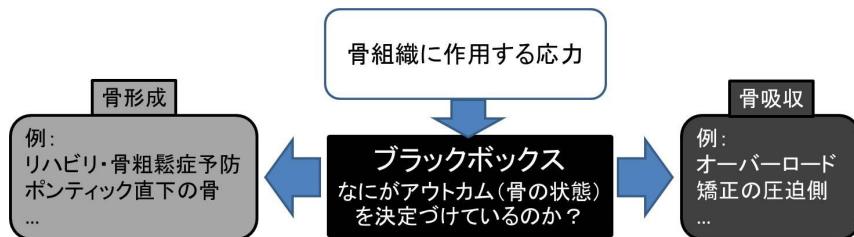
研究成果の概要（英文）：The mechanism by which physical stimuli are converted into cell signals in dentistry has not been properly explained. This study was designed to define the position of mechanical stimuli in clinical dentistry by investigating the mechanism by which physical stimuli are converted into chemical stimuli. In this study, we found that when an intermittent lateral stress is applied to an implant, osteogenesis occurs on the compression side, that bone contact is higher with 40N versus 60N, that mechanical loading causes apoptosis of bone cells and increased expression of connexin 43, and that estrogen deficiency is associated with osteogenesis and osseointegration, and that mechanical loading attenuates the negative effects of estrogen deficiency on bone formation and osseointegration.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯科補綴学 インターフェイス 応力 力学応答 個体差医療

1. 研究開始当初の背景

骨は力学的負荷によってその状態を変化させる、メカノバイオロジーリサーチの対象として最もよく研究されている組織の一つである。歯科臨床では、歯やインプラントは顎骨内に存在するため骨との関係性を無視して論じることができない。補綴領域においては、咬合や義歯の維持装置の設計、ブリッジの支台装置、インプラントの内部構造の設計や埋入位置などのエビデンスの多くは力学的見地から積み重ねられたものである。歯科領域において、応力は不良な予後と関連づけられることが多い。適切に咬合を管理することは咬合によって生じた応力を適切に分配することと同義であるし、歯周病の治療には細菌学的要素とあわせて力学的要素が重要であることに疑いの余地はない。特に歯科領域においては「過剰な応力 = 骨吸収」という等式が成立する。一方医科領域では、応力の不足は廃用萎縮の原因となるため、積極的なリハビリや運動によってそれを避ける考え方がなされている。つまり「応力 = 骨の維持、増大」である。補綴領域においても、ブリッジのポンティック直下に骨形成が起こるなど、応力が原因と思われる骨形成を目にすることがある。このように、応力は骨形成を促進する場合と骨吸収を促進する場合、相反する二つの結果をもたらす。このことに対しては多角的な視野から検討が進められているが、未だこの現象をコントロールしうる基礎的知見が得られているとは言いがたい。



生体反応は細胞分裂や移動、タンパク質合成によって起こるが、これらの現象はすべてシグナル分子によって司られる。つまりメカノバイオロジーの領域では、“応力 = 物理学的刺激”が“シグナル分子 = 化学的刺激”に“変換”されているということになる。しかし、「物理を化学に変換する」この仕組みはあまりよく分かっていない。我々の研究では、振動刺激による応力負荷が骨芽細胞のセルシグナル発現様式を変化させることが明らかになっている(河野、九州大学テシス、投稿論文作成中)。また、日常臨床において、力学的負荷に対して明らかに過剰に骨吸収を呈する患者を目にするが、これは応力応答の仕組みに個体差があることを示している

2. 研究の目的

本研究では応力を感知する骨細胞のメカニズムの検討を培養実験で行い、動物実験において骨組織に実際に応力刺激を作用させた際の組織応答を観察する。また、外来患者のうち力学的な原因によって歯を失った患者群(と対照群)に対し、CTを含む種々の臨床データから“力に反応して過剰に吸収する”骨を有する患者のスクリーニングの可能性、加えて患者より樹立したiPS細胞を硬組織細胞へと分化させて力場環境における細胞反応の相違について検討する。

3. 研究の方法

- (1) インプラントに横方向に間欠応力を作用させた場合のインプラント周囲骨の変化

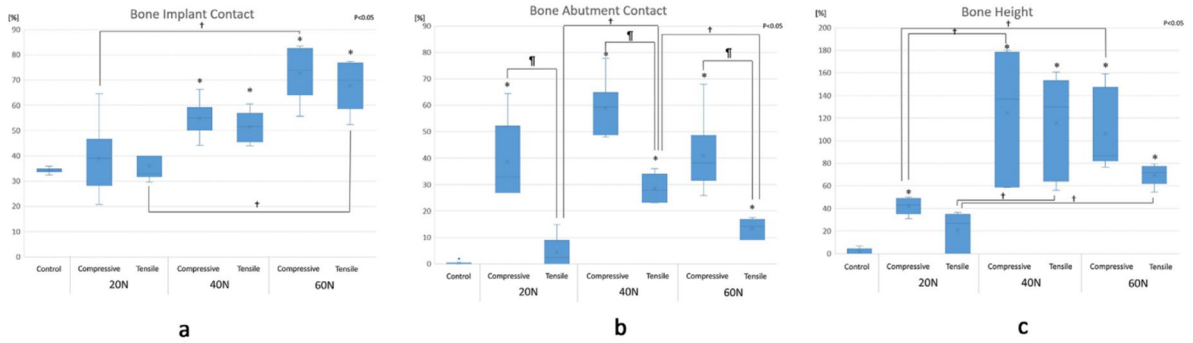
7ヵ月齢家兎左右側脛骨にインプラントを埋入し、6週間骨の治癒を待つために免荷した。その後二次手術を行いアバットメントを装着した。アバットメント装着後週二回、1Hz、18000サイクルの側方負荷をインプラントに作用させた。負荷は20、40または60Nとした。負荷は3週・6回作用させ、4週目に安楽死させた。その後非脱灰研磨標本作製し、骨-インプラント接触率、骨-アバットメント接触率、新生骨高さを計測し形態計測学的に比較した。
- (2) メカニカルローディングが骨細胞とそのタンパク発現に与える影響

骨細胞様 ML0-Y4 細胞を、下面を培養皿あるいはチタンプレートとしてコラーゲンゲル内で三次元培養した。チタンプレートは24時間、1ヘルツで振動させた。細胞形態は走査型電子顕微鏡と蛍光顕微鏡(コネキシン(CX)43、アポトーシス染色)で観察した。cell-cell contactの影響を見るため、gap junction 阻害剤である1-ヘプタノールを培地に添加する群を設定した。
- (3) インプラント周囲骨に骨粗鬆症とメカニカルローディングが与える影響

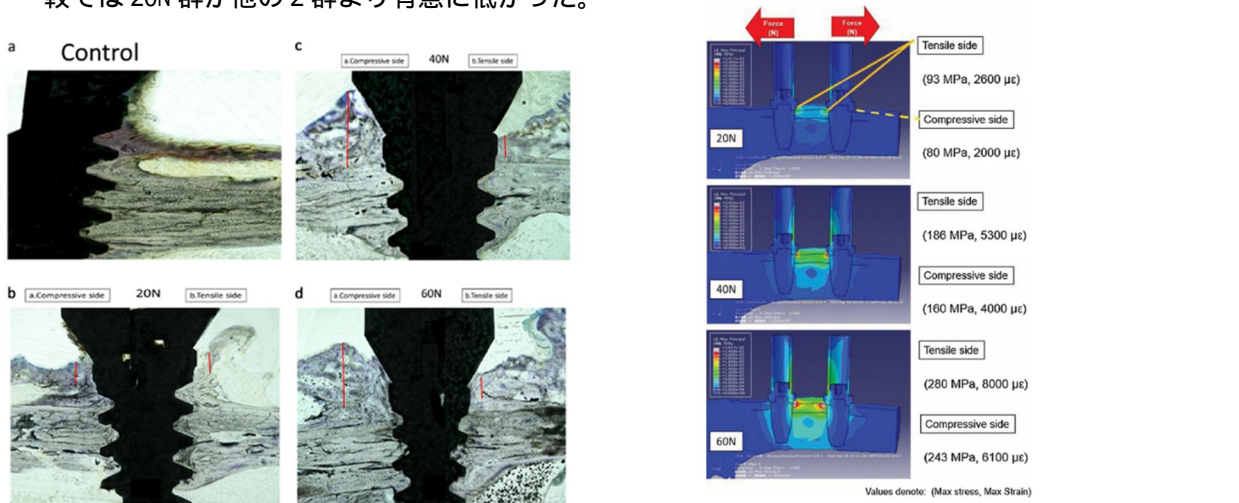
5週齢雌性 Wistar ラットの第一臼歯を抜歯し、1週後に抜歯窩にチタンインプラントを埋入した。用いたインプラントは高さ3mmまたは4mmであり、前者は対合歯と咬合しない非加重群、後者は対合歯と咬合する加重群とした。抜歯から10週後に卵巣摘出あるいは擬手術を実施した。さらに21週後にすべてのラットを安楽死させ、組織形態計測学的検討を行った。

4. 研究成果

- (1) インプラントに横方向に間欠応力を作用させた場合のインプラント周囲骨の変化

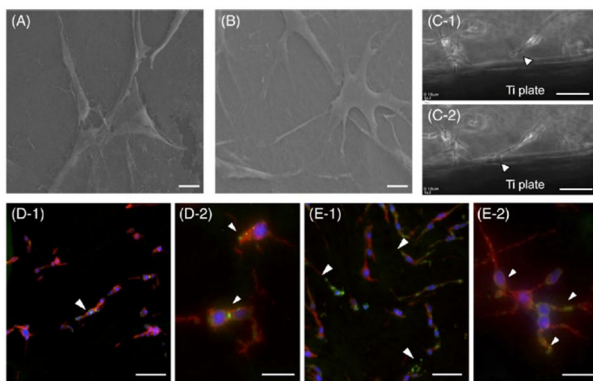


骨 - インプラント接触率(a)はインプラントに作用させる横方向の間欠応力が大きくなるほど高まった。骨 - アバットメント接触率(b)は、20、40、60N 負荷群いずれも圧縮側の方が引っ張り側より大きく、また引っ張り側内の比較では、40N 群が最も高かった。新生骨高さ(c)は20 および 60N 群において圧縮側より引っ張り側の方が小さく、また圧縮側内および引っ張り側内の比較では 20N 群が他の 2 群より有意に低かった。



応力非負荷群(a)、20N 負荷群(b)、40N 負荷群(c)および 60N 負荷群(d)のインプラント周囲骨組織所見。赤線はインプラント埋入後に形成された骨(左図)。同モデルの有限要素解析では、インプラントとアバットメントの接合部の引っ張り側に引っ張り応力の集中が見られる。

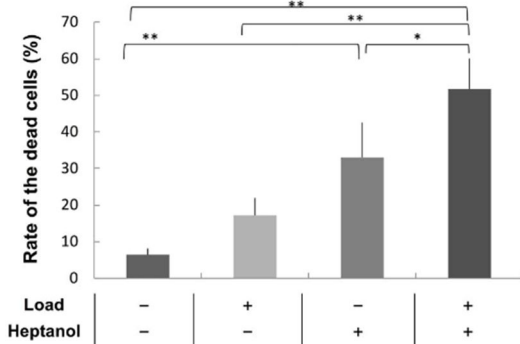
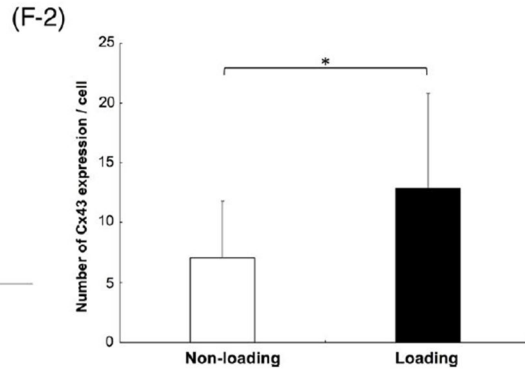
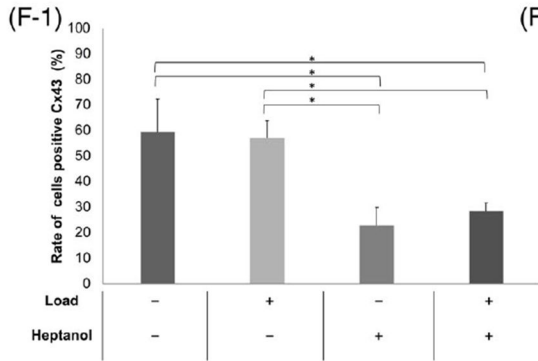
(2) メカニカルローディングが骨細胞とそのタンパク発現に与える影響



培養皿(a)およびチタンプレート(b)上で培養した MLO-Y4 細胞。三次元培養において、チタンプレートに接触した細胞が突起で互いにつながっている。(C) タイムラプス顕微鏡による MLO-Y4 細胞とチタンプレートの界面画像。細胞は突起を伸ばし(C-1) 最終的にチタン表面に到達した(C-2)。ヘプタノールを含まないコ Cx43 の蛍光染色の画像(D, E)。アクチンは赤く、核は青く、Cx43 陽性部位は緑に染色されている。Cx43 陽性部位は、非負荷群では主に細胞質内にあったが(D-1, 2) 負荷群では細胞突起や細胞間に局在

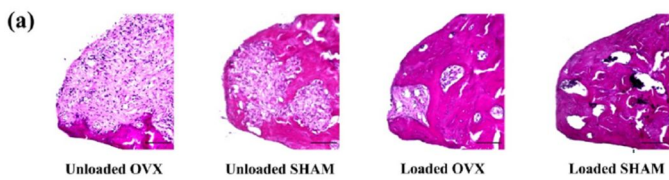
していた(矢尻)(E-1, 2)

ヘプタノール非添加群では Cx43 陽性細胞の割合は非添加群と負荷群で有意差はなかった(F1)が、細胞あたりの Cx43 発現部位数は、ヘプタノールを処理しない非負荷群に比べ負荷群では有意に多かった(F2)。



負荷の繰り返しにより、チタンプレート周囲に観察される死細胞数は増加した。ギャップジャンクション阻害剤であるヘプタノールは、非負荷群に比べ、負荷群での死細胞数を有意に増加させた。

(3) インプラント周囲骨に骨粗鬆症とメカニカルローディングが与える影響



I				II			
Parameters	Unloaded OVX	Unloaded SHAM	P value	Parameters	Loaded OVX	Loaded SHAM	P value
BD (%)	27.04 ± 6.44	59.46 ± 5.53	0.002	BD (%)	60.82 ± 5.38	78.16 ± 4.84	0.031
BIC (%)	33.04 ± 11.35	74.07 ± 7.42	0.009	BIC (%)	70.50 ± 7.86	92.33 ± 2.72	0.029*

III				IV			
Parameters	Unloaded OVX	Loaded OVX	P value	Parameters	Unloaded SHAM	Loaded SHAM	P value
BD (%)	27.04 ± 6.44	60.82 ± 5.38	0.001	BD (%)	59.46 ± 5.53	78.16 ± 4.84	0.023
BIC (%)	33.04 ± 11.35	70.50 ± 7.86	0.017	BIC (%)	74.07 ± 7.42	92.33 ± 2.72	0.047*

(a) 左から非応力負荷・卵巣摘出(OVX)群、同・擬手術(SHAM)群、応力負荷・OVX群、応力負荷・SHAM群のインプラントスレッド部組織標本。(b)骨面積率(BD)および骨-インプラント接触率(BIC)。WはWelchのt検定、他はStudentのt検定。非加重群、加重群いずれもSHAM群の方がOVX群より有意にBD,BICともに大きい(I, II)。OVX群、SHAM群いずれも加重群の方が有意にBD,BICともに大きい(III, IV)。

I				II			
Parameter	Unloaded OVX	Unloaded SHAM	P value	Parameter	Loaded OVX	Loaded SHAM	P value
Number of osteoclasts (#/mm ²)	57.89 ± 1.94	44.85 ± 3.82	0.009	Number of osteoclasts (#/mm ²)	40.61 ± 5.03	19.97 ± 4.87	0.011

III				IV			
Parameter	Unloaded OVX	Loaded OVX	P value	Parameter	Unloaded SHAM	Loaded SHAM	P value
Number of osteoclasts (#/mm ²)	57.89 ± 1.94	40.61 ± 5.03	0.011*	Number of osteoclasts (#/mm ²)	44.85 ± 3.82	19.97 ± 4.87	0.001

I				II			
Parameters	Unloaded OVX	Unloaded SHAM	P value	Parameters	Loaded OVX	Loaded SHAM	P value
Number of osteoclasts (#/mm ²)	1478.35 ± 197.67	1749.93 ± 128.98	0.269	Number of osteoclasts (#/mm ²)	1352.45 ± 119.04	1518.77 ± 108.67	0.320
Percentage of sclerostin-positive osteoclasts (%)	13.11 ± 2.25	11.61 ± 1.38	0.577	Percentage of sclerostin-positive osteoclasts (%)	5.08 ± 1.32	3.63 ± 0.72	0.350

III				IV			
Parameters	Unloaded OVX	Loaded OVX	P value	Parameters	Unloaded SHAM	Loaded SHAM	P value
Number of osteoclasts (#/mm ²)	1478.35 ± 197.67	1352.45 ± 119.04	0.594	Number of osteoclasts (#/mm ²)	1749.93 ± 128.98	1518.77 ± 108.67	0.192
Percentage of sclerostin-positive osteoclasts (%)	13.11 ± 2.25	5.08 ± 1.32	0.008	Percentage of sclerostin-positive osteoclasts (%)	11.61 ± 1.38	3.63 ± 0.72	0.0001

酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ陽性(TRAP+)細胞数(左)およびスクレロスチン陽性(SC+)細胞数(右)、それぞれ破骨細胞、骨細胞数を表す。非加重群、加重群いずれもSHAM群の方がOVX群より有意にTRAP+細胞数が少ない(左I, II)。OVX群、SHAM群いずれも加重群の方が有意にTRAP+細胞数が少ない(左III, IV)。OVX群、SHAM群いずれも加重群の方が有意にSC+細胞率が少ない(右III, IV下段)。

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 富田陽子、森山泰子、鮎川保則、張浩ミヨウ、今井 実喜生、古谷野 潔
2. 発表標題 咬合荷重下におけるインプラント周囲骨代謝への骨細胞の関与
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第126回学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 富田陽子、森山泰子、鮎川保則、古谷野 潔
2. 発表標題 インプラント周囲骨代謝と骨細胞の力学応答の関連
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会第46回学術大会
4. 発表年 2016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	鮎川 保則 (AYUKAWA Yasunori) (50304697)	九州大学・歯学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	熱田 生 (ATSUTA Ikiru) (30423487)	九州大学・歯学研究院・准教授 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	荻野 洋一郎 (OGINO Yoichiro) (50380431)	九州大学・歯学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	松崎 達哉 (MATSUZAKI Tatsuya) (70736694)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関