

平成 30 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15767

研究課題名(和文)細胞性バイオマーカーを用いたインプラント疾患の診断とデバイス開発

研究課題名(英文)Diagnosis of peri-implant diseases by cellular biomarkers and development of diagnostic device

研究代表者

木戸 淳一(KIDO, Jun-ichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・准教授

研究者番号：10195315

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文):インプラント周囲疾患の診断を目指してインプラント周囲溝滲出液(PICF)等の疾患バイオマーカーの検索と有用性の検討を行った。PICFのプロテオーム解析の結果、血液、免疫、細胞由来の蛋白や抗菌ペプチドを認めた。炎症マーカーのカルプロテクチンと骨吸収マーカーのNTxに着目し、インプラント疾患群と健常群のPICF中のマーカー量を測定した結果、両マーカーとも疾患群で有意に高いレベルを示した。両蛋白は、臨床指標である歯周ポケット深さ、歯肉炎指数あるいは歯槽骨吸収率と有意な相関関係を示し、ROC曲線分析でも適正な感度と特異度が得られ、インプラント疾患の診断マーカーとしての有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文):Biomarkers in peri-implant crevicular fluid (PICF) and their usefulness were investigated to diagnose peri-implant diseases. Many proteins related to blood, immunity, cell and anti-microbial peptides were detected by proteomic analysis of PICF. Calprotectin, inflammation marker, and NTx, bone resorption marker, were selected for markers of peri-implant diseases. When the levels of calprotectin and NTx in PICF samples derived from healthy and diseased sites were determined, two marker levels in the diseased samples were significantly higher than those of healthy samples, and significantly correlated to clinical indicators including periodontal pocket depth, gingival index or bone loss rate. ROC curve analysis of two markers showed appropriate sensitivity and specificity as diagnostic markers for peri-implant diseases. These results suggest that calprotectin and NTx in PICF are useful markers for a diagnosis of peri-implant diseases.

研究分野：歯周治療学

キーワード：インプラント疾患 インプラント周囲溝液 バイオマーカー 診断デバイス

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療の普及に伴い、インプラント粘膜炎および周囲炎を含むインプラント疾患の発症率が増加している。インプラントの長期的な維持にはメンテナンスとインプラント疾患の早期発見が不可欠である。インプラントの定期検診では、プラーク附着、周囲溝の深さ測定、BOP 動揺や X 線検査(歯槽骨吸収)などの臨床検査により治療法が選択されるが(累積的防御療法: CIST)、これらの臨床検査では、検査者による客観性や精度の問題が指摘されている。

インプラント疾患診断の研究として歯周病原細菌検査やインプラント周囲溝滲出液(Peri-implant crevicular fluid: PICF)の分析が行われているが、複数の研究で整合性のある結果は報告されていない。このため、現在、インプラント疾患の正確な予知・診断法は見当たらない。一方、歯周病に関しては、歯肉溝滲出液中の蛋白質の網羅的な分析や、様々なマーカーを用いた診断研究が行われており、少数ではあるがマーカー測定デバイスの研究や、一部に歯周病診断キットも市販されている。また、細胞内で発見された microRNA は、その幾つかが健常や歯周炎の歯肉組織でも発現していることが報告されているが、その動態の詳細は不明であり、歯周病との関連が注目されている。

2. 研究の目的

本研究では、インプラント粘膜炎・周囲炎などのインプラント疾患の高精度で客観的な診断を目指して、PICF 中の蛋白質のプロテオーム解析を行い、疾患診断マーカー候補となりうる蛋白質の分析を行った。PICF 中に見いだされた疾患マーカーとなる蛋白質について、インプラント疾患部位由来 PICF サンプルと健常部位由来サンプル中のマーカーレベルを比較した。これらのマーカーレベルと従来からの臨床的指標との相関関係を調べることから、PICF 中の蛋白質のインプラント疾患マーカーとしての有用性について検討を行った。また、インプラント周囲組織中の microRNA (miRNA)の存在についての検討を目指した。

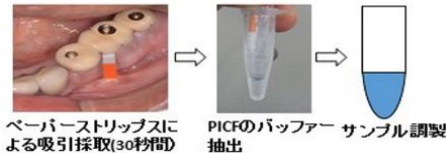
3. 研究の方法

1) 被験者および臨床検査: 研究は、徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行った(承認番号 2368 及び 2719)。35名の被験者(男性 10名; 平均年齢 70.5歳, 女性 25名; 平均年齢 68.0歳)から研究参加への同意を得て、インプラント埋入部位の歯周組織検査を行った。検査項目は、歯周ポケット深さ測定(PD)、歯肉炎指数(GI)、プロービング時出血(BOP)、X 線検査による歯槽骨吸

収率(BL: Schei's 法)とした。検査項目に基づき、PD \geq 3 mm, GI \geq 1, BOP(±)の部位をインプラント疾患部位とし、PD < 3 mm, GI=0, BOP=(-)の部位を健常部位とした。

2) PICF 採取とサンプル調製: 滅菌ペーパーストリップスを用いて PICF を吸引採取した。その後、ストリップスをバッファー中に浸し、PICF サンプル液を調製した(図 1)。

図1 PICFサンプル採取と調製



ペーパーストリップスによる吸引採取(30秒間)

PICFのバッファー抽出

3) プロテオーム解析: インプラント周囲炎部位から PICF サンプルを調製し、サンプル中の蛋白質を SDS-PAGE し、7つのゲル片に分離した。各画分のプロテオーム解析は、徳島大学大学院総合研究支援センターに依頼し、nanoLC-MS/MS(Ultimate 3000 RSL Cnano)を用いて行った。

4) PICF 中マーカーの ELISA 測定およびマーカーレベルと臨床指標との関連分析: 疾患部位と健常部位から採取した PICF 中のカルプロテクチンおよび NTx 量は、各 ELISA キットを用いて測定した。また、2つのマーカーレベルと PD 値、GI 値あるいは骨吸収率との相関関係を分析した。さらに、両マーカーについて ROC 曲線分析を行い、閾値から感度と特異度を求めた。

5) イムノクロマト(IC)チップ測定: マーカー測定デバイス開発の基礎的研究として、歯周病診断用に開発したカルプロテクチンイムノクロマトチップを用いて PICF 中のカルプロテクチンの測定を行った。チップ上のカルプロテクチンバンドの濃さを目視判定基準により評価し、またイムノクロマトリーダーを用いて測定した。

6) インプラント周囲組織の採取とサンプル調製(miRNA 分析用): インプラント周囲炎罹患患者から治療上切除された炎症周囲組織の提供を受けた。周囲組織片から miRNA 分離用キット(miRNeasy Mini Kit; QIAGEN)を用いて miRNA を分離した。

4. 研究成果

1) 臨床指標評価: 健常群と疾患群のサンプル(それぞれ 34 と 40)の採取部位での臨床指標は PD 値、GI 値、BOP 陽性率および骨吸収率のいずれも疾患群で有意に高い値を示した(表 1)。

表1 PICFサンプル及び検査部位情報

検査部位	健常	疾患
サンプル数	34	40
PD (mm)	2.32±0.58	4.70±1.36**
GI	0.0±0.0	1.5±0.5**
BOP rate (%)	0.0±0.0	40.0±15.2**
Bone loss (%)	19.7±9.8	42.7±18.0**

** P<0.01

2) PICF 中の蛋白質の解析：疾患群 PICF サンプルのプロテオーム解析の結果，細胞外基質成分であるコラーゲンの様々な成分，抗菌ペプチドの transferrin や lactoferrin，血液関連蛋白の macroglobulin や serum albumin，immunoglobulin や補体などの免疫関連蛋白が高レベル検出された。また，炎症関連蛋白のカルプロテクチンの成分である S100A9 蛋白質も同定された(表2)。

表2 PICFのプロテオーム解析(一部データ)

蛋白質	スコア
Collagen a 1 chain preproprotein	186776
Serum albumin	39841
Transferrin	37868
α 2-Macroglobulin	31713
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	26114
Lactoferrin	23948
Complement C3 preproprotein	23010
α1-Antitrypsin	14154
S100A9	538
Ig heavy chain	324

3) PICF 中のカルプロテクチンおよび NTx レベル：PICF 中のカルプロテクチンの平均量は，健常群と疾患群で 40.1 と 171.9 ng/site で，平均濃度はそれぞれ 113.2 と 231.7 ng/μl であり，疾患群において有意に高い値を示した(図2)。NTx の平均量は，健常群と疾患群で 2.94 と 6.16 ng/site で，平均濃度は 6.62 と 9.27 ng/μl と疾患群で有意に高いレベルを示した(図3)。

図2 PICF中カルプロテクチンレベル

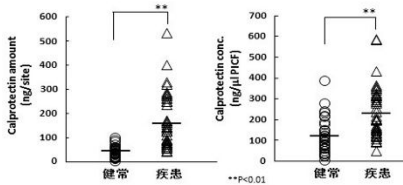
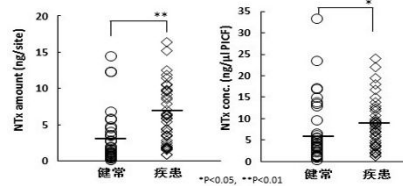


図3 PICF中NTxレベル



カルプロテクチン量と臨床指標の PD 値及び GI との相関関係を調べたところ，PD 値との間に有意な正の相関関係($\rho=0.709$, $P<0.001$) がみられ，GI=1 と 2 群のカルプロテクチン量は，GI=0 群と比較して有意に高い値を示した(図4)。また，NTx 量と PD 値の間にも有意な正の相関関係がみられ($\rho=0.434$, $P<0.001$)，さらに骨吸収率(BL)との間にも有意な相関関係が認められた(図5， $\rho=0.570$, $P<0.001$)。

図4 カルプロテクチンレベルとPD及びGIとの関連

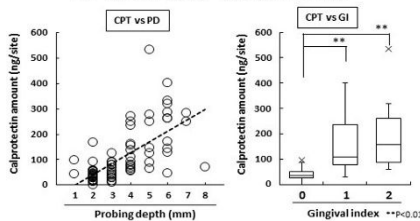
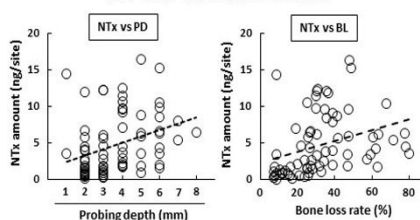
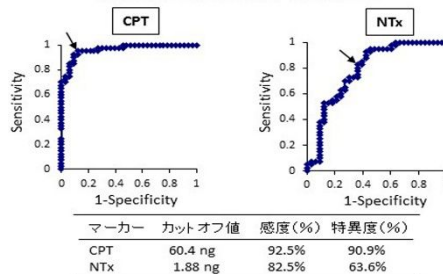


図5 NTxレベルとPD及びBLとの関連



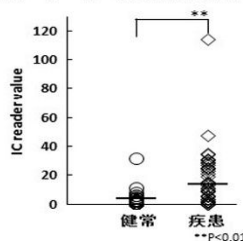
PICF 中のカルプロテクチン及び NTx 量の ROC 曲線では，カルプロテクチンでは AUC=0.964, $P<0.001$ で，カットオフ値が 60.4 ng の時，感度は 92.5%，特異度が 90.9% であった。一方，NTx では AUC=0.784, $P<0.001$ で，カットオフ値が 1.88 ng の時，感度は 82.5%，特異度が 63.6% であった(図6)。

図6 ROC曲線(カルプロテクチン&NTx)



4) イムノクロマトチップによる PICF 中カルプロテクチン測定：歯周病診断用カルプロテクチン IC チップを用いて PICF 中のカルプロテクチンを測定した結果，平均 IC リーダー値は，疾患群(15.93)で健常群(2.36)より有意に高い値を示した(図7)。しかし，目視判定では，健常群での陰性率は 97% であったが，疾患群での陽性率は 43% と，疾患群で低い値を示すサンプルが散見され，本 IC チップによる PICF 中のカルプロテクチン定量には改善が必要であることが考えられる。

図7 ICリーダーレベル(カルプロテクチン)



5) インプラント周囲組織の miRNA 分析：miRNA 分析を行うためにインプラント周囲炎部の組織から miRNA の分離を行ったが，比較対象となる非炎症(健常)の周囲組織の採取には被験者から同意が得られず，miRNA 用チップを用いた分析を行うことが

できなかった。

6) まとめ

インプラント疾患の客観的な診断法の開発を目的として、PICF 中の診断マーカー蛋白の検索をプロテオーム解析により行った。炎症関連蛋白であるカルプロテクチンと骨吸収マーカー蛋白である NTx の PICF 中レベルは、疾患部サンプルで有意に高く、臨床指標と有意な正の相関を示し、ROC 曲線分析でも診断マーカーとしての有用性が示唆された。一方、これらのマーカーの PICF 用の測定デバイスについてはさらなる検討が必要である結果となった。

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 1 件)

Sakamoto E, Kido R, Tomotake Y, Naitou Y, Ishida Y, Kido J. Calprotectin and cross-linked N-telopeptides of type I collagen levels in crevicular fluid from implant sites with peri-implant diseases: A pilot study. International Journal of Implant Dentistry, 査読有, in press. 2018.

〔学会発表〕(計 1 件)

木戸理恵, 坂本英次郎, 板東美香, 稲垣裕司, 二宮雅美, 美原智恵, 生田貴久, 成石浩司, 永田俊彦, 木戸淳一, 湯本浩通. インプラント周囲溝滲出液中のカルプロテクチンと NTx を用いたインプラント疾患の診断. 第 61 回春季日本歯周病学会学術大会(東京・新宿区), 2018 年 6 月 1 日.

〔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

木戸 淳一 (KIDO, Junichi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号: 10195315

(2) 研究分担者

永田 俊彦 (NAGATA, Toshihiko)
徳島大学・本部・理事
研究者番号: 10127847
(平成 27 年度~28 年度)

成石 浩司 (NARUISHI, Koji)
徳島大学・病院・講師
研究者番号: 00346446

板東 美香 (BANDO, Mika)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 10510000

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

稲垣 裕司 (INAGAKI, Yuji)
片岡 正俊 (KATAOKA, Masatoshi)
阿部 佳織 (ABE, Kaori)
廣島 佑香 (HIROSHIMA, Yuka)
生田 貴久 (IKUTA, Takahisa)
梶浦 由加里 (KAJIURA, Yukari)
西川 泰史 (NISHIKAWA, Yasufumi)