

令和元年6月17日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20544

研究課題名（和文）インプラントの生物学的幅径を制御する新規インプラント治療の開発

研究課題名（英文）Development of new implant treatment to control the biological width of implant

研究代表者

守源太郎（MORI, GENTARO）

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30733745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の結果、インプラント周囲上皮と結合組織では以下の遺伝子が発現していた。プロテアーゼを阻害する働きを有するプロテアーゼインヒビター、腫瘍の増殖性に影響を与える因子、結合組織では腸の上皮細胞の治癒を促進する因子。そのためインプラント周囲上皮と結合組織ではこうした遺伝子群がインプラント周囲上皮の恒常性を維持し、生物学的幅径の維持に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インプラント周囲上皮の下方増殖は、結合組織の減少を引き起こし、結合組織は減少したその幅を確保しようとするため、結果として骨の吸収を引き起こすとされる。そのため上皮・結合組織がどのような分子を発現し、組織の恒常性を維持し、生物学的幅径を維持しているのかを理解することは重要である。本研究によってこれまでインプラント周囲上皮・結合組織では報告されていなかった新たな分子の発現を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：Our study suggested that the following factors are expressed in the peri-implant epithelium and connective tissue. Protease inhibitor was expressed in the peri-implant epithelium. A factor affecting tumor growth was expressed in the peri-implant epithelium. In connective tissue, a factor promot healing of epithelial cells of the intestine was expressed. Therefore, in the peri-implant epithelium and connective tissue, these genes may maintain the homeostasis of the peri-implant epithelium and maintain the biological width.

研究分野：口腔インプラント学

キーワード：インプラント治療 インプラント周囲上皮 結合組織 相互作用 生物学的幅径

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

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会が到来し、インプラント治療は歯を失った後に行う治療として広く認知され、多くの患者の機能回復に用いられている。しかし、その普及に伴い様々な合併症が報告され、なかでもインプラント周囲炎に関する報告が多い。そのため、インプラント周囲炎に対する対応策の確立が求められている。

インプラント周囲炎は、わずかに存在しているとされる上皮性付着の破綻に始まり、さらなる炎症の進展に伴って起こる上皮の下方増殖によって引き起こされる。インプラント周囲上皮の下方増殖による深いポケットの形成は、嫌気性細菌が主体である歯周病細菌に対して発育する環境を与えてしまう。またインプラント周囲上皮の下方増殖は、結合組織の減少を引き起こし、結合組織は減少したその幅を確保しようとするため、結果として骨の吸収を引き起こすとされる。そのため上皮・結合組織がどのような分子を発現し、組織の恒常性を維持し、生物学的幅経を維持しているのかを理解することは重要である。

### 2. 研究の目的

本研究では、インプラント周囲上皮がどのような機序で恒常性を維持しているのか、インプラント周囲上皮と結合組織で発現する上皮の恒常性・増殖性に影響を与える因子を同定することとした。

### 3. 研究の方法

本研究ではインプラント埋入モデルを使用して以下の解析を行った。

#### (1) 動物実験

##### インプラント埋入モデル

実験には 4 週齢の雄性 SD 系ラットを使用した。ペントバルビタールナトリウム腹腔内投与による全身麻酔下に両側第一臼歯を抜歯し、左側にはチタン合金製インプラント (Ti-6Al-7Nb、直径:1.55mm、長さ:4mm) を埋入した。本動物実験は、東京歯科大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施された。

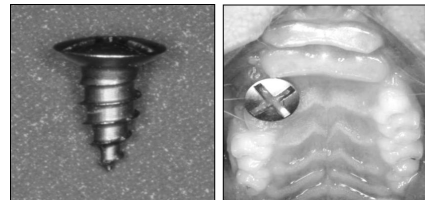


図 1, インプラント埋入モデルラット

#### (2) Laser Microdissection による対象組織の採取

インプラント埋入 4 週間後にインプラント周囲軟組織を実体顕微鏡下 (SZ61:OLYMPUS) にて採取後、OCT コンパウンドで包埋し凍結切片 (厚さ 10~15  $\mu\text{m}$ ) を作成した。その後、Laser Microdissection (Carl Zeiss 社) を用いてインプラント周囲上皮、インプラント周囲結合組織をダイセクションした。(歯周組織: 付着上皮、結合組織 抜歯後治癒した軟組織: 上皮組織、結合組織をコントロール群とした。) RNAeasy Micro kit (QIAGEN) による RNA 抽出後にキャピラリー電気泳動システム: Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) を用いて total RNA のクオリティーの確認を行った。対象組織は各組織から 50~150  $\times 10^4 \mu\text{m}^2$ /匹の組織を採取した。

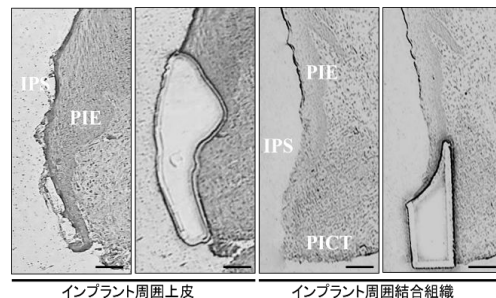


図 2, LCM による試料採取領域

#### (3) マイクロアレイ解析

抽出した total RNA から GeneChip 3 IVT press kit (Affymetrix) を用いて cDNA の合成を行った。その後、GeneChip Fluidics station 450 (Affymetrix) を用いて GeneChip (Rat genome 430 2.0 array) と Hybridization し、GeneChip scanner 3,000 (Affymetrix) にてスキャニングを行った。これらのデータから遺伝子発現解析ソフト GeneSprints GX ver.12 (Agilent) を用いて、網羅的な遺伝子発現を比較検討した。

#### (4) インプラント周囲上皮・結合組織におけるターゲット遺伝子の抽出と発現差の定量

Up-regulate していた遺伝子群と Down-regulate していた遺伝子群からターゲット遺伝子を抽出し、定量的 RT-PCR 法にて発現差の定量ならびに確認を行った。定量的 RT-PCR 法は、選定したターゲットの Primer + Taqman probe と total RNA を ABI 7500 Fast Prism Sequence Detection System (Applied biosystems) を用いて反応させ、CT 法による遺伝子発現の定量を行った。プライマーは; KGFR, FGFR1, HGFR, IGFR, TGFBR2, EGFR, PDGFR-a, Icam-1, Slpi, Il-1b, Tnf-a, lbp を使用した。

#### (5) 免疫組織化学染色 (IHC)

定量的 RT-PCR 法によって発現差が認められた遺伝子群より新規ターゲット遺伝子：FGFR1 および LBP のタンパクレベルの発現と局在の検討をするため免疫組織化学染色を行った。インプラント埋入4週後のサンプルから通法でパラフィン切片を作製した。切片を0.1%プロテアーゼ溶液にて賦活化、3%BSAにてブロッキングを行った後に一次抗体をインキュベートした。各一次抗体に対応した二次抗体で染色を行い万能顕微鏡 (Axiophoto2, CarlZeiss)を用いて観察を行った。

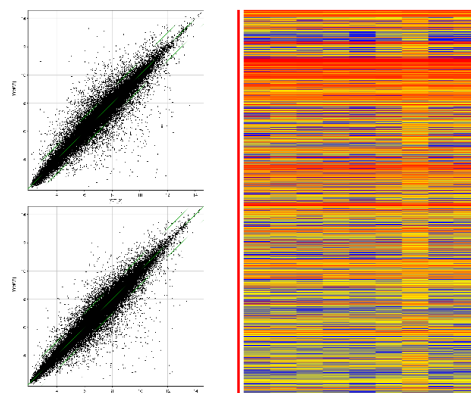


図3, 各組織の網羅的な遺伝子発現解析

#### 4. 研究成果

##### (1) Laser Microdissection による対象組織の採取

インプラント周囲上皮および結合組織から、 $50 \sim 150 \times 10^4 \mu\text{m}^2/\text{匹}$ の組織採取を行った。採取した組織の totalRNA : RIN はすべて7以上であった。

##### (2) マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析の結果、コントロールと比較しインプラント周囲上皮・結合組織では、それぞれ500個以上の遺伝子に発現変動を認めた。発現変動していた遺伝子の中から上皮の増殖性に影響を与えると考えられる KGFR, FGFR1, HGFR, IGFR, TGFBR2, EGFR, PDGFR-a, Icam-1, Slpi, Il-1b, Tnf-a と結合組織からは lbp を抽出した。(図3)

##### (3) 定量的 RT-PCR

選定したターゲット：KGFR, FGFR1, HGFR, IGFR, TGFBR2, EGFR, PDGFR-a, Icam-1, Slpi, Tnf-a において統計学的に有意な差を認めた。(図4)

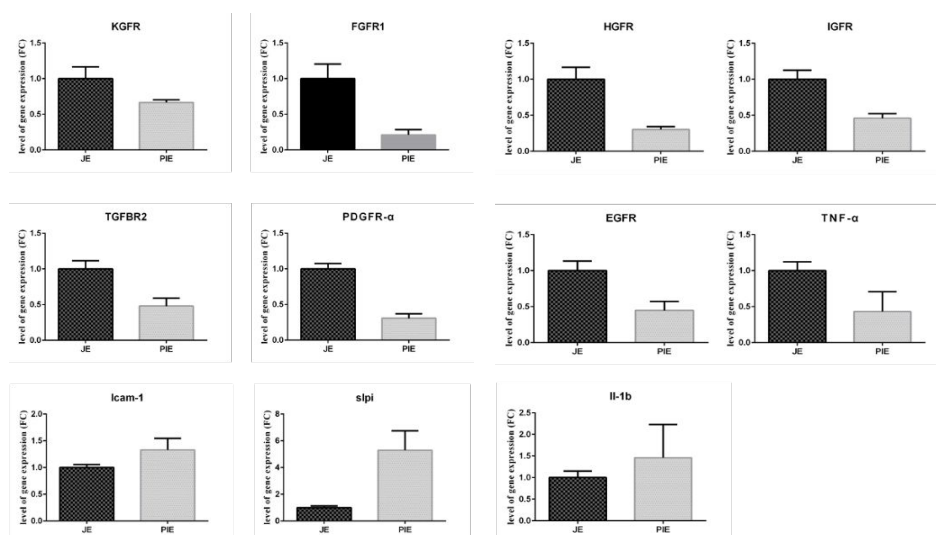


図4, 定量的 RT-PCR

#### (4) 免疫組織化学染色 (IHC)

TGFBR2 は、付着上皮では中等度の陽性反応を示したが、インプラント周囲上皮では、弱い陽性反応を示した。また、LBP はインプラント周囲結合組織において強い陽性反応を示した。現在、マイクロアレイ解析から抽出したターゲットの IHC を継続して行っているが、Rat に使用できる一次抗体が限られているため、抽出した全てのターゲットの IHC を行うことができなかった。そのため使用する生物種の変更と in situ ハイブリダイゼーションでの組織内での発現と局在の検討が可能か継続して解析を行っている。

#### まとめ

インプラント周囲上皮で有意に高く発現していた SLPI は、プロテアーゼインヒビターであり上皮の組織破壊を引き起こす好中球が分泌するプロテアーゼやマトリックスプロテアーゼ (MMP) を阻害する働きを有する。インプラント周囲上皮細胞の間隙には、多数の好中球が存在しているが、こうした好中球が分泌するプロテアーゼからインプラント周囲上皮は、自らの組織を保護し恒常性を維持し、細菌の進入時に生じた炎症による組織破壊や上皮の下方増殖

を抑制する働きを有していた可能性がある。また有意に低く発現していた TGFBR2 は、上皮の正常な分化と増殖を制御する因子のレセプターである。結合組織で発現していた LBP は腸の上皮組織の治癒を促進するとする報告がある。そのため、結合組織で発現した LBP は上皮の恒常性の維持に影響を与えていた可能性がある。SLPI,TGFBR2,LBP はインプラント周囲の軟組織で発現し生物学的幅径の維持に関与している可能性が示唆された。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1.Gentaro Mori, Yukari Oda, Kei Sakamoto, Taichi Ito, Yasutomo Yajima. Clinical Evaluation of Full-arch Screw-Retained Implant-Supported Fixed Prosthesis and Full-arch Telescopic-Retained Implant-Supported Fixed Prosthesis: A 5–12 Year Follow-up Retrospective Study. *Clinical Oral Implants Research*. 30 ( 3 ): 197-205 2019 査読あり
- 2.Gentaro Mori, Takafumi Kobayashi, Taichi Ito, Yasutomo Yajima. Implant-Supported Prosthesis in a Patient with Sjögren ' s Syndrome: Clinical Report with 3-year Follow-up. *The bulletin of Tokyo Dental College*. Volume 59 (no.3) p201-206, 2018. 査読あり
- 3.Gentaro Mori, Hodaka Sasaki, Yasushi Makabe, Masao Yoshinari, Yasutomo Yajima. The genes Scgb1a1, Lpo and Gbp2 characteristically expressed in peri-implant epithelium of rats. *Clinical Oral Implants Research*. 27(12) e190-e198 2016 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1.浅見洋祐,佐々木穂高,守源太郎,小林孝誌,吉成正雄,矢島安朝  
インプラント周囲軟組織の創傷治癒期間における特異的炎症性マーカーの発現変化  
第 38 回関東・甲信越支部学術大会 2019 年
- 2.小林孝誌,佐々木穂高,浅見洋祐,守源太郎,吉成正雄,矢島安朝  
インプラント周囲結合組織に特異的に発現する遺伝子と Lbp と Sod3 の検討  
第 48 回 日本口腔インプラント学会学術大会 2018 年
- 3.小林孝誌,佐々木穂高,守源太郎,真壁康,吉成正雄,矢島安朝  
マイクロアレイ法を用いたインプラント周囲結合組織の特異的遺伝子の解析 歯科学報  
第 303 回東京歯科大学学会 2017 年
- 4.KOBAYASHI T, SASAKI H, MORI G, MAKABE Y, YOSHINARI M, YAJIMA Y  
Identification of characteristic gene expressions in peri-implant connective tissue.  
95<sup>th</sup> IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition  
San Francisco, Calif., USA 2017 年
5. 小林孝誌,佐々木穂高,守源太郎,真壁康,吉成正雄,矢島安朝  
マイクロアレイ法を用いたインプラント周囲結合組織の特異的遺伝子の解析  
口腔インプラント学会関東甲信越支部会 2017 年

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。