

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11792

研究課題名(和文)咀嚼筋活動によるAMPキナーゼの活性化はインプラントの骨結合を強化する

研究課題名(英文)Activation of AMP kinase with masticatory muscle activity enhances osseointegration of implants

研究代表者

城戸 寛史(Kido, Hirofumi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：90169897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：AICARのインプラントの骨結合強化におよぼす影響を検討した。チタンプレート上でosteoblast-like cell MC3T3-E1を培養した。通常培養群、石灰化誘導群、石灰化誘導+AMPK活性化群についてday0,7,14,21でサンプルを回収した。結果：day7で石灰化誘導+AMPK活性化群におけるALPの発現量は他2群と比較して有意に増加していた。また、osterixの遺伝子発現量はday21において石灰化誘導+AMPK活性化群は他2群と比較して有意に増加していた。さらに、ALP活性はday7,14で石灰化誘導+AMPK活性化群は他群より有意に増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では咀嚼筋の活動によって引き起こされるAMPキナーゼ活性がチタン製の歯科インプラントと骨の結合を強化することを証明しようとしたものである。チタン版上で骨芽細胞を培養し、通常の培養と骨分化誘導を行ったものと、AMPキナーゼの活性化処理を行ったものを比較したところ、AMPキナーゼ活性を誘導した群で、骨芽細胞の分化が誘導された。このことから、AMPキナーゼが活性化される条件下で、インプラントと骨の結合が強化されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effect of AICAR on osseointegration of implants was investigated. Osteoblast-like cell MC3T3-E1 was cultured on titanium plates. Samples were collected on days 0, 7, 14, and 21 for (1) normal culture group, (2) calcification-induced group, and (3) calcification-induced + AMPK activation group. Results: The expression of ALP in the calcification-induced + AMPK-activated group was significantly increased on day 7 compared to the other two groups. Gene expression of osterix was also significantly increased in the calcification-induced + AMPK-activated group compared to the other two groups on day 21. Furthermore, ALP activity was significantly increased in the calcification-induced + AMPK-activated group on days 7 and 14 compared to the other two groups.

研究分野：口腔インプラント学

キーワード：インプラント AMPキナーゼ活性 骨結合 骨芽細胞 分化 石灰化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

よく噛むことが健康の増進につながることは、一般的に広く信じられていることである。糖尿病、メタボリックシンドローム、認知症などの予防や治療において、食物をよく咀嚼することの有効性が報告されている。京都大学大学院医学研究科の家森らは、滋賀県長浜市の住民を調査した結果、噛む能力が最も高いグループでは、最も低いグループに比べて 2 型糖尿病リスクがほぼ半減していたことを報告されている。咀嚼運動によって口腔内の触覚や味覚などが刺激されることや、翼突筋静脈層叢を繰り返し圧迫することによるポンプ作用が脳をはじめ諸器官の血流を活発にすることが、咀嚼の効果の要因であると考えられる。また、咀嚼運動では咀嚼筋が活発に活動し、特に閉口筋は非常に大きな力を発揮する。近年、骨格筋の活動によって AMP キナーゼが活性化し、その作用によって血糖値や中性脂肪が下がることが報告されている。また、AMP キナーゼの癌治療の効果や骨粗鬆症治療への応用についても試みられている。そこで、咀嚼筋活動による AMP キナーゼの活性化が歯科インプラントの骨結合強化に有効に働くのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

AMPK は、ミトコンドリア合成を促しエネルギー産生に関与し、細胞内へのグルコースや脂質の取り込みの中心的機能を有するなど、細胞内のエネルギーの恒常性を保つ酵素として知られている。糖尿病治療薬によって活性化することや、低酸素ストレス・低血糖などの負荷がかかった状態で活性化することが知られている。Burkholder ら(2007)は骨格筋においてはストレス反応性に活性化され、損傷を受けた筋の再生や増強を誘導することが報告されている。AMPK と骨芽細胞の関連については、AMPK の賦活化により osteoblast の分化・成熟が促進されることが複数の研究で報告されている。同様の効果がインプラント周囲の骨芽細胞にもたらされることは十分想定される。また、AMPK 促進剤 AICAR は、骨格筋の筋肉量の増強・萎縮予防など筋肉量の制御機能を持つことが報告されている。Lijuan ら(2019)は、AICAR は acute lymphoblastic leukemia (急性リンパ芽球性白血病)の治療効果があると報告した。また、Eric ら(2013)は、AICAR は T-cell acute lymphoblastic leukemia (T リンパ球性白血病)の治療効果があることを報告している。よって、骨格筋の筋肉量の増強や白血病の治療等様々な薬効が期待されている。インプラント体周囲の骨芽細胞に対する薬物療法を検討した研究としては、M Fernanda ら(2017)はチタンディスク上で培養したヒト骨芽細胞(MG63)に Melatonin を添加することで骨芽細胞の増殖・分化が促進されることを報告している。Kanazawa ら(2008)は Metformin の作用により骨芽細胞(MC3T3-E1)の AMPK は賦活化し、ALP 活性化および石灰化能の上昇が起こることを報告した。Xiao ら(2017)は、adiponectin により糖尿病環境下のチタンインプラント上のラット骨芽細胞の AMPK が活性化され結果的に骨芽細胞が活性化するという報告した。しかし、AICAR のインプラント体周囲骨芽細胞への直接的な薬物効果を評価した研究は非常に乏しい。そこで、我々は AMPK 活性がインプラントの骨結合を強化する可能性を評価するために、AMPK 活性がインプラント表面の骨芽細胞におよぼす影響を検討することとした。本研究の目的は、AICAR(AMPK 促進剤)が、インプラントの維持安定のための補助療法としての薬物効果がないか検証することである。

### 3. 研究の方法

#### 細胞培養

チタンプレート上でマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を 1%ペニシリン-ストレプトマイシンと 10%ウシ胎仔血添加 MEM(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)中で 5% CO<sub>2</sub> 中 37 °C で培養した。実験には、縦 10mm、横 10mm、厚さ 1mm のチタンプレート (NANTOH Co., Ltd, Shizuoka, Japan) を用いた。細胞がコンフルエントに増殖するのを確認し、24 ウェルプレートの各ウェルにチタンプレートを設置し、細胞をチタンプレート上に各ウェル 1.0 × 10<sup>5</sup> cells/ml の密度で播種した。48 時間培養後、無血清培地に交換し 24 時間結成飢餓状態においた。control 群は通常培地で培養し、石灰化誘導培地群 (以下 OG 群) は 10%FBS と 1%ペニシリン-ストレプトマイシン、および 10mM  $\beta$ -glycerophosphate、ascorbic acid を含む  $\alpha$ -MEM で培養した。石灰化誘導培地+AICAR 活性化群 (OG+AICAR 群) では石灰化誘導培地に AICAR (1 $\mu$ M) を追加し培養した。実験期間中は、週 2 回培地交換を行った。

#### 細胞増殖試験

細胞増殖は、Cell counting Kit-8 溶液 (Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan) を使用して測定した。各群それぞれ実験開始後 day0、day7、day14、day21 の 24 ウェルプレートの各ウェルに Cell Counting Kit-8 溶液を 50  $\mu$ L ずつ加え、5%CO<sub>2</sub> 中 37 °C で 4 時間反応させた。溶出液 100  $\mu$ L を測定用 96well プレートに移し、450nm の吸光度をマルチプレートリーダー (1420 Multilabel Counter ARVO MX, PerkinElmer) を用いて測定した。

#### RNA の分離と定量的 RT-PCR 法による遺伝子発現量の測定

各群 day0、day7、day14、day21 に逆転写のため、ISOGEN(Nippon gene, Toyama, Japan)を使用して細胞から RNA を全抽出した。SuperScript II 逆転写酵素 (Invitrogen, Thermo Fisher

Scientific, Commonwealth of Massachusetts, United States of America) を使用して、cDNA を合成した。mRNA の発現を検出するために、cDNA のヌクレオチド配列に基づいて遺伝子特異的プライマーを選択した。ターゲット mRNA の QRT-PCR 分析は、SYBR Prime Script RT-PCR キット (TOYOBO, Osaka, Japan) と ABI7500 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を使用して実施した。反応条件: 95 で 30 秒間、続いて 95 で 5 秒間の変性、60 で 10 秒間のアニーリング、および 72 で 35 秒間の伸長の 40 サイクルを行った。開始 mRNA 濃度の違いによる増幅の変動を制御するための内部標準として  $\beta$ -アクトンを使用した。しきい値サイクル ( $C_t$ ) は、分画サイクル数として定義した。遺伝子発現レベルは  $\beta$ -アクトンの発現レベルと比較して表され、デルタ (デルタ  $C_t$ ) 法を使用して各サンプルの倍率変化を計算した。

#### アルカリホスファターゼ活性の評価

アルカリホスファターゼ活性測定は ALP 活性化キット (TRACP&ALP Assay kit, TaKaRa Bio Inc, Shiga, Japan) を用いた。24 ウェルプレート内にあるチタンプレート上の細胞を生理食塩水 (大塚製薬) で 2 回洗浄し、細胞抽出用溶液 (1% NP-40 含有生理食塩水液) を各ウェルに 500  $\mu$ l ずつ加えた。アルカリ性ホスファターゼ用緩衝液を各ウェルに 50  $\mu$ l ずつ加え、37 で 15 ~ 60 分反応した。NaOH (0.5M) を各ウェルに基質と等量の 50  $\mu$ l ずつ加え、溶出液 100  $\mu$ l を測定用 96well プレートに移し、405nm の吸光度をマルチプレートリーダー (1420 Multilabel Counter ARVO MX, PerkinElmer) を用いて測定した。コントロール群、OG 群、OG + AICAR 群それぞれ day0、day7、day14、day21 日後に回収した

#### 石灰化能の評価

MC3T3-E1 細胞の石灰化は、アリザリンレッド染色 (Iwai Chemicals Company Ltd, Tokyo, Japan) を使用した。各群それぞれ day0、day7、day14、day21 に培養後 24 ウェルプレートの培地を除き、PBS にて洗浄した。細胞を中性緩衝ホルマリン溶液 10 分間で固定し、取り除いた後、アリザリンレッド溶液を 0.5mL/well で添加し、室温で 30 分間染色した。アリザリンレッド溶液を除き、精製水でプレートを洗浄した。well 内の水を取り除いた後、石灰化結節溶解液を 0.5mL/well で添加し、プレートを 10 分間攪拌して、色素を溶出した。溶出液 100  $\mu$ l を測定用 96well プレートに移し、吸光度をマルチプレートリーダー (1420 Multilabel Counter ARVO MX, PerkinElmer) を用いて 405nm の吸光度を測定した。

## 4. 研究成果

### Results

#### チタンプレート上の MC3T3 細胞増殖の評価

Cell Counting Kit-8 を用いて細胞数を測定した。day7、14 で各群間に有意差は認めなかった。day21 で細胞数は減少傾向にあったが、各群間に有意差は認めなかった。

#### Real-time PCR 法による骨芽細胞分化関連遺伝子発現量の解析

チタンプレート上の MC3T3-E1 細胞の遺伝子発現量を real-time PCR 法により解析した。ALP の発現量は day7 で OG+AICAR 群において他の 2 群と比べて有意に増加した。その後、day14、day21 では減少傾向にあり 3 群間での有意差は認めなかった。Osterix の発現量は、day7、day14 では 3 群間での有意差は認めなかった。day21 において OG+AICAR 群は他群と比較して有意に増加した。

#### アルカリホスファターゼ (ALP) 活性化の評価

ALP 活性化は、day7 で他 2 群と比較して OG+AICAR 群で有意に増加していた。day14 で OG 群は control 群と比較して有意に ALP 活性が増加していた、OG+AICAR は control 群、OG 群と比較して有意に ALP 活性が増加していた day21 では各群ともに減少傾向になり有意差は認めなかった。

#### 石灰化能の評価

チタンプレート上の細胞をアリザリン染色で染色した。OG 群と OG+AICAR 群上の細胞は時間経過とともに染色濃度は増加した。特に OG+AICAR 群で顕著に増加した。アリザリン染色を定量化した結果、day7 では各群間で有意差を認めなかった。day14、21 で OG 群は control 群と比較して有意に石灰化度の増加を認めた。day14、21 で OG+AICAR 群は control 群、OG 群と比較して有意な石灰化度の増加を認めた。

以上の結果より、AMPK 活性化によりインプラント周囲骨芽細胞の分化・成熟を促し、石灰化を賦活化した。よって、AMPK 活性化がインプラントの良好な維持安定をもたらすことが示唆された。しかしながら、その詳細なメカニズムの解明にはさらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Phanthavong V, Kakura K, Taniguchi Y, Egashira K, Matsuzaki E, Tsutsumi T*, Kido H.	4. 巻 in press
2. 論文標題 The effect of AMP kinase activation on differentiation and maturation of osteoblast cultured on titanium plate.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dental Science	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 M. Otawa, K. Yasumatsu, E. Nakamura, K. Kakura, H. Kido
2. 発表標題 Circumvention of posterior alveolar artery in maxillary sinus elevation: A digital approach
3. 学会等名 Academy of Osseointegration 2018 Annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Morinaga, S. Park, A. Hokugo, H. Sasaki H. Kido, I. Nishimura
2. 発表標題 Biomaterials-induced neuronal PAS domain2 (Npas2) in bone marrow environment facilitated enhanced osseointegration of titanium implant with complex surface modification
3. 学会等名 Academy of Osseointegration 2018 Annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------