

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17125

研究課題名（和文）PTH製剤と機械的刺激の相乗的骨形成促進作用による低侵襲なインプラント治療の開発

研究課題名（英文）Synergistic effect of PTH administration and mechanical stimulation on bone formation around implant in rats

研究代表者

稲葉 菜緒（INABA, Nao）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・助教

研究者番号：00814170

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：失った歯の回復方法に歯科インプラント治療があります。最近では全身疾患を持つ患者さんや、多くの薬を服用している患者さんがインプラント治療を希望する機会が増えており、低侵襲で安全性の高いインプラント治療が求められています。そこでこの研究では、骨粗鬆症の治療に使うPTH製剤という薬の投与や、インプラントに力を加えることで、骨がたくさん増えると考えました。そして研究の結果、PTH製剤も荷重もインプラントの周りの骨の量と質を向上させ、両者を組み合わせることでたくさんの骨ができることが分かりました。これらの方法を単独もしくは併用することで、低侵襲で安全な治療が提供できるかもしれません。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今までのインプラント治療に関する治療理論は、あくまで健全な患者さんを対象に構築されてきました。ところが最近では全身疾患を有する患者さんや多くの薬を併用して使用する患者さんが多く認められるようになっており、新しい科学的根拠に基づいて治療を行う必要性が出てきています。したがって本研究結果は、インプラントの研究領域に新しい科学的根拠を提供できることが学術的意義であり、PTH製剤が適応外使用されれば、安全で侵襲性の低いインプラント治療を提供できる可能性があることが社会的意義であるといえます。

研究成果の概要（英文）：Implant treatment is one of reliable options to restore missing teeth. Recently, patients who have several types of systemic diseases and/or receive multiple drug therapies desire implant treatment, which requires safe and minimal invasive implant treatment. Thus, the aim of this study was to investigate the effects of PTH administration and/or mechanical loads on bone around implants in rat tibiae and/or maxillae. PTH administration and mechanical loads significantly increased bone mass and improved bone quality around implants. Moreover, the combination of PTH administration and mechanical loads enhanced both bone volume and bone quality around implants. Therefore, these monotherapies and combination therapy may provide minimal invasive implant treatment with safety to compromised patients.

研究分野：補綴系歯学

キーワード：デンタルインプラント PTH製剤 機械的刺激 骨組織

1. 研究開始当初の背景

わが国は 2060 年に人口が 4000 万人減少して高齢化率が 40%になると推計されている(総務省: <http://www.soumu.go.jp/johotsusintokei/whitepaper/ja/j28/html/nc111110.html>). 現在では骨増生を伴うインプラント埋入が理想的治療として行われているが、近年インプラント治療を希望する患者は急速に高齢化しており(Shimmel M et al. *Periodontol* 2000. 2017), 多疾患罹患患者や多剤併用患者が多く認められるようになってきた。インプラント治療成功のためにはインプラント周囲に健全な骨組織があり続けることが必要不可欠であるが、健常者を対象に構築されてきたインプラント治療に関する現在の科学的根拠は高齢者には通用せず、**新しい科学的根拠に基づいた低侵襲で安全性の高いインプラント治療が強く求められている。**

一方、デンタルインプラントは恒常的に荷重を受けて機能するが、荷重応答には骨細胞が重要な役割を果たすと考えられている(Klein-Nulend J et al. *Eur Cell Mater*. 2012). また、PTH 製剤は破骨細胞の活動を抑制せずに骨芽細胞の活動を促進するが(Jilka RL et al. *J Clin Invest*. 1999), 近年、荷重環境下で PTH 製剤を作用させると骨新生への相乗効果が生み出される(Grosso MJ et al. *J Orthop Res*. 2015)ことが明らかとなった。**しかしながら荷重と PTH 製剤による相乗効果機構は不明であり、ましてや荷重単独、PTH 製剤単独、ならびにこれらの併用療法がインプラント周囲骨組織にどのような影響を受けるかは全く分かっていないのが現状である。**

2. 研究の目的

本研究では 2 段階で研究目的を立案した。すなわち、

- (1)「インプラントを介して与えられる荷重」と「PTH 製剤の間歇的投与」の単独および併用療法がインプラント周囲骨組織に与える影響を検索し、そのメカニズムを検討する。
- (2)(1)を受けて、低侵襲で安全性の高いインプラント治療における科学的根拠の基盤を構築する。

3. 研究の方法

上記の研究目的を達成するため、下記のように研究を計画した。

(1)骨粗鬆症患者にインプラント治療を行う患者を模倣した動物モデルの作成

8 週齢の雌性 Wistar 系ラットの卵巣摘出を行うことで、骨粗鬆症モデルを作成する。

卵巣摘出 5 週間後に両側上顎第一大臼歯の抜歯を行い、その 3 週間後に、当講座で開発済みのラット用インプラント(Uto Y et al. *PLoS One*. 2017)を埋入する。なお、口腔内でのインプラント埋入は実験的に生着率に問題があるため、脛骨にもインプラントを埋入しておく。

卵巣摘出しないラット(健常者を模倣)に対しても抜歯と抜歯部位・脛骨へのインプラント埋入を行い、以降の検討を行う。

(2)PTH 製剤の間歇的投与によるインプラント周囲骨組織の薬剤効果の検証

PTH の作用が創部に集積する性質を利用して(Kuroshima S et al. *J Dent Res*. 2013), インプラント埋入後から荷重開始前までの間に PTH 製剤を投与し、インプラント周囲骨の増大効果を期待する(右図)。なお、一般的に PTH 製剤は皮下注射であるが、歯科適応拡大のために、当講座が開発した口腔内間歇的局所投与を適応する(局所麻酔注射と全く同じで極めて簡便)。PTH 製剤の濃度(80µg/kg)(Kuroshima S et al. *Osteoporos Int*. 2014)に関しては、申請者を含む当講座が効果を確認している。

インプラント埋入 3 週間後から、生理食塩水投与群と PTH 製剤投与群に分け、時系列(インプラント埋入 2 と 5 週間後)でそれぞれ屠殺する。

屠殺時に上顎骨と脛骨を回収し、以下の解析を行う。

- ・マイクロ CT による 3 次元的構造解析(骨構造解析、インプラント周囲骨組織の厚さと辺縁骨高さの定量比較解析)
- ・ヘマトキシリン エオジン染色による組織形態学的評価(骨組織の厚さと辺縁骨高さの定量比較解析、軟組織の厚さ、骨細胞密度の解析)
- ・特異抗体 Runx2 を用いた免疫染色(骨芽細胞数の定量解析)
- ・TRAP 染色(破骨細胞数の定量解析)
- ・ピクロシリウスレッド染色(コラーゲンの量と種類 [タイプ 1 と 3])
- ・骨組織から骨細胞遺伝子を回収して定量 PCR (Inaba N et al. *Biochem Biophys Rep*. 2017)



- ・ マイクロアレイ解析 (遺伝子の変動をピックアップ)
- (3)荷重付与によるインプラント周囲骨組織の荷重効果の検証
 荷重条件 (10N, 3Hz, 1800 回/1 回, 週 2 回, 荷重試験機は開発済み)(Uto Y & Inaba N et al. *PLoS ONE*. 2017) に関しては, 申請者を含む当講座が効果を確認している. インプラント埋入 3 週間後から, 荷重を付与し, 時系列 (インプラント埋入 2 と 5 週間後にそれぞれ屠殺)
 インプラント埋入 3 週間後から, 生理食塩水投与群と PTH 製剤投与群に分け, 時系列 (インプラント埋入 2 と 5 週間後) でそれぞれ屠殺する.
 屠殺時に上顎骨と脛骨を回収し, 以下の解析を行う.
- ・ マイクロ CT による 3 次元的構造解析 (骨構造解析, インプラント周囲骨組織の厚さと辺縁骨高さの定量比較解析)
 - ・ ヘマトキシリン エオジン染色による組織形態学的評価 (骨組織の厚さと辺縁骨高さの定量比較解析, 軟組織の厚さ, 骨細胞密度の解析)
 - ・ 特異抗体 Runx2 を用いた免疫染色 (骨芽細胞数の定量解析)
 - ・ TRAP 染色 (破骨細胞数の定量解析)
 - ・ ピクロシリウスレッド染色 (コラーゲンの量と種類 [タイプ 1 と 3])
 - ・ 骨組織から骨細胞遺伝子を回収して定量 PCR (Inaba N et al. *Biochem Biophys Rep.* 2017)
 - ・ マイクロアレイ解析 (遺伝子の変動をピックアップ)
- (4)PTH 製剤と荷重付与の併用療法によるインプラント周囲骨への効果検証
 インプラント埋入 3 週間後から, (2)と (3)で行った条件を組み合わせる実験を行い, その 2 と 5 週間後に屠殺する.
 屠殺後は (2) と (3)で行ったのと同様の解析を行う.
- (5)PTH 製剤と荷重による骨組織増大相乗効果機構の解明実験
 インプラント埋入 3 週間後から PTH1R 阻害剤 [PTHrp(7-34)] もしくは Protein Kinase A(PKA)阻害剤 [H-89] をラットに投与して PTH1R の下流シグナルを強制的に抑制し, 生理食塩水投与群, PTH 製剤投与群, 荷重付与群, ならびに PTH 製剤投与と荷重付与の併用群を作成して実験を行う.
 治療 2 と 5 週間後に屠殺し, RANKL, 種々の Wnt タンパク質, Sclerostin, ならびに Wnt シグナル伝達に重要な GSK-3 と -catenin の産生や組織内分布を詳細に定量比較解析し, PTH 製剤と荷重による骨組織への相乗効果の作用メカニズムを解明する.

4. 研究成果

(1)研究の主な成果

PTH 製剤がインプラント周囲骨組織に与える影響

まず初めに, PTH 製剤の間歇的投与がインプラント周囲骨に与える影響の検索を行った. PTH の間歇的投与はインプラントと無関係の長管骨の骨量と骨密度を有意に増大させたことから, 本研究で用いた PTH の投与条件は問題ないことが確認された.

この実験では, 以下のことが明らかとなった. すなわち PTH の間歇的投与は,

- ・ インプラント周囲骨組織の厚み, 骨量, ならびに骨密度を増大させ, 骨量の増加量は特にインプラントスレッド内部領域に依存していた.
- ・ インプラント周囲骨組織の骨細胞数を増加させた.
- ・ インプラント周囲骨組織の骨芽細胞数を増加させた.
- ・ インプラント周囲骨組織の破骨細胞数を増加させた.
- ・ 骨関連細胞の増加はスレッド内部領域と外部領域の両方で起こっており, その数が減少している部位はほとんど認められなかった.
- ・ 骨関連細胞の増加は, 骨細胞ネットワークを発達させ, さらにこれら骨関連細胞のカップリングが増加していることを示唆している.
- ・ インプラント周囲骨内のコラーゲン産生量が増大したことは, 骨組織の増大と相関している. スレッド内部領域ではタイプ III コラーゲンが, また, スレッド外部領域ではタイプ I コラーゲンがそれぞれ増大していたことから, 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.

荷重がインプラント周囲骨組織に与える影響

この実験では, 以下のことが明らかとなった. すなわちインプラントを介した荷重付与は,

- ・ 上顎骨に埋入されたインプラント周囲の骨量は増大させず, 骨密度を増大させる.
- ・ 脛骨に埋入されたインプラント周囲の骨量と骨密度の両方を増大させる.
- ・ インプラント周囲骨の骨細胞数・骨芽細胞数・破骨細胞数を増大させる.
- ・ インプラント周囲骨内のタイプ I コラーゲンとタイプ III コラーゲンの産生をともに増大させる.

PTH 製剤と荷重の併用治療がインプラント周囲骨に与える影響

この実験では、以下のことが明らかとなった。すなわちインプラントを介した PTH 製剤の間歇的投与と荷重付与の組み合わせは、上記の各評価パラメーターに対して、相乗もしくは相加効果を与えることが分かった。

(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

本研究は、骨量だけではなく骨質にも焦点を当てて研究を行ったが、インプラント周囲骨組織の骨質に対する解析は国内外でほとんど全く行われていない。これは 2000 年に提唱された骨質の定義が歯科領域の研究者に浸透・定着していないことが原因である。さらに PTH 製剤と荷重環境下におけるインプラント周囲の骨質解明研究など一切行われていない。したがって本研究は、インプラント周囲骨組織の骨質研究では先駆的であり、科学的インパクトが極めて大きい。

(3)今後の展望

PTH 製剤はすでに骨粗鬆症治療薬として国内で認可されている。したがって、インプラント治療への適応外使用が認められれば、低侵襲な治療法として患者へ提供できる可能性がある。また、実際に患者の口腔内でインプラントに荷重を簡単に付与できる装置があれば、本研究はそのまま臨床へと移行できる可能性を秘めている。したがって、今後の展望としては、そのような荷重付与装置の開発や、PTH 製剤におけるデンタルインプラント治療に対する臨床研究などを展開したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Inaba N, Kuroshima S, Uto Y, Uchida Y, Sawase T
2. 発表標題 Effect of intermittent PTH administration on bone around dental implants in osteoporosis model 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

〔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
研究協力者	黒嶋 伸一郎 (KUROSHIMA Shinichiro)		