

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10173

研究課題名(和文) ドラッグリポジショニングを応用したインプラント周囲炎予防薬の開発

研究課題名(英文) Develop the new drugs for peri-implantitis prevention by drug repositioning methods

研究代表者

佐々木 穂高 (Hodaka, Sasaki)

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：50433959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：超高齢社会である我が国では在宅歯科診療を必要とするインプラント治療患者のインプラント周囲炎の増加が問題となっている。そこで本研究では、ある疾患に应用されている薬を他の治療薬として応用法を探索するドラッグリポジショニングによってインプラント周囲炎の予防法を確立することを目的とした。

インプラント周囲軟組織に特異的発現する炎症性マーカー、細胞接着因子、創傷治癒関連遺伝子を選定し、ハイスループットスクリーニング法で、これらの遺伝子発現を制御する薬剤を検索した。本研究では発現抑制をすることで創傷治癒が促進されるNpas2が、インプラント周囲に発現することを明らかに、この発現を抑制する薬剤を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会である我が国では、在宅歯科医療が必要な患者のインプラント周囲炎の増加が問題となっている。これに対して、在宅で患者自身が行える治療法として薬物療法が効果的であると考へ、既に他の疾患の治療薬を応用するドラッグリポジショニングは、薬剤の安全性確認が簡略し早期に臨床応用を可能とすることから、最適な手法であると考えた。

本研究では、軟組織創傷治癒促進に関与が知られているNpas2の発現を制御する薬剤を同定したことで、インプラント周囲組織に生体防御機構の向上に関与する遺伝子の発現を調整する手法を確立することができたことから、今後のインプラント周囲炎への予防薬開発に大きく貢献できると考へる。

研究成果の概要(英文)：Japan has been a super-aging society and the number of elderly patients with peri-implantitis who require home dental care is increasing. Therefore, there is an urgent need to develop preventive drugs for peri-implantitis by drug repositioning. The aim of this study is to identify the compounds that can regulate the expression of gene known to express specifically at peri-implant connective tissue.

Peri-implant connective specific genes related with inflammatory, cell adhesion and wound healing acceleration were selected, and the compounds which suppress and/or increase target genes were examined by high-throughput drug screening methods. We identified drug A which reduced the expression of Npas2 known to accelerate soft tissue wound healing by suppressing its expression.

研究分野：口腔インプラント学

キーワード：口腔インプラント インプラント周囲組織 ドラッグスクリーニング インプラント周囲炎

## 1. 研究開始当初の背景

現在、歯科インプラント治療（以下、IP 治療）は歯牙欠損への補綴治療の一つとして広く認知され普及してきている。IP 治療は、義歯による治療と比較して、咀嚼能力の向上や負担軽減による残存歯の保存などの点に優れているが、一方でインプラント体が口腔粘膜を貫通した部位 = 粘膜貫通部は細菌感染が生じやすいことから、インプラント周囲炎の発症が問題となる。このため、IP 治療後も長期継続的にメンテナンスが行っていく必要がある。近年、超高齢社会となった我が国では要介護認定者の増加に伴い、過去に IP 治療をされた在宅患者が増加しており、十分なセルフケアが出来ず、清掃困難やインプラント周囲炎等のトラブルを抱えていることが報告されている。そこで、申請者らは、インプラント周囲炎の予防法を確立が急務であると考えた。そこで、インプラント周囲軟組織に特異的に発現上昇もしくは減少している遺伝子発現を制御することで、インプラント周囲軟組織の生体防御機構が維持されると考えた。そこで、インプラント周囲軟組織に特異的な遺伝子発現を解析し、これらの遺伝子発現を制御する薬剤が同定されれば、インプラント周囲炎の予防薬の開発に繋がると考えた。そこで、既に他の治療薬として実用化されている既存薬から、さらに他の疾患や細胞に対する未知の薬物効果を明らかにし実用化する“ドラッグリポジショニング”を応用して、ハイスループットスクリーニング (HTS 法) を応用することで、インプラント周囲軟組織の生体防御機構を維持する薬剤を明らかにすることとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、インプラント周囲軟組織に特異的発現遺伝子リストから、インプラント周囲軟組織の生体防御に関連する遺伝子を抽出するために、炎症を制御する遺伝子、細胞接着を制御する遺伝子、創傷治癒を制御する遺伝子から、正常時、炎症時の発現傾向を評価し、さらにハイスループットスクリーニング法を応用し、これらの遺伝子の発現調整を可能とする薬剤を既存薬からなるドラッグライブラリーから選定し、ドラッグリポジショニングを応用したインプラント周囲炎の治療法の確立に繋げていくことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) インプラント周囲軟組織特異的遺伝子の発現評価

インプラント周囲軟組織に特異的に発現する炎症性マーカーの特定

網羅的遺伝子解析方であるマイクロアレイ法を用いて、インプラント周囲組織の由来組織である口腔粘膜組織 (OMT) と類似環境組織である歯周組織 (PT) と比較して、インプラント周囲粘膜組織 (PIST) で特異的に発現が認められた炎症性関連する遺伝子群を抽出し、これらを PIST 特異的炎症性マーカーとし、ラットインプラント埋入モデルを用いて創傷治癒過程での発現変化を評価し、ハイスループットスクリーニング法の対象遺伝子を検討した。

インプラント周囲結合組織に関連する接着関連因子の特定

インプラント周囲結合組織に特異的に発現する細胞接着関連遺伝子を同定するために、インプラント 結合組織界面にプラズマ処理による超親水性処理を行なうことで細胞接着を向上させた。未処理である対照群と比較し、発現差がある接着関連遺伝子の同定を行ない、ハイスループットスクリーニング法の対象遺伝子を検討した。

創傷治癒促進に関連する既知遺伝子のインプラント周囲軟組織発現の評価

線維芽細胞による発現が抑制されることで創傷治癒の促進が知られている遺伝子 *Npas2* がインプラント周囲軟組織の発現ならびに炎症反応に対してどのように発現をインプラント埋入モデルラットの創傷治癒過程で免疫組織学染色による発現の有無ならびのその経時的な変化を検討し、ハイスループットスクリーニング法の評価対象となるかを検討した。

### 2) ハイスループットスクリーニング法による標的遺伝子の発現制御する薬剤の同定

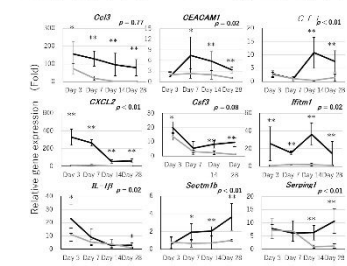
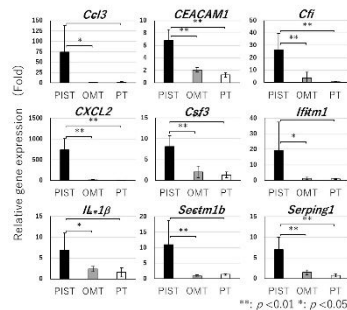
インプラント周囲結合組織に特異的に発現する炎症性マーカーでは、ケモカインの 1 種であり、対照群と比較して 200 倍以上の発現差を示した CXCL2 の発現抑制、インプラント周囲結合組織で特異的に発現変化をする細胞接着因子から、最も発現変化を示したインテグリン *Itga2* の発現上昇、発現抑制により線維芽細胞による治癒促進を示すことが知られている遺伝子 *Npas2* の発現抑制を示す薬剤をドラッグライブラリー (LOPAC1280) を用いたハイスループットスクリーニング法によって評価・同定した。

#### 4. 研究成果

### 1) インプラント周囲軟組織特異的遺伝子の発現評価 インプラント周囲軟組織に特異に発現する炎症性マーカーの特定

PIST 特異的炎症性マーカーとして、*Ccl3*, *CEACAM1*, *Cfi*, *Cxcl3*, *Csf3*, *Ifitm1*, *IL-1b*, *Sectm1b*, *Serping1* の 9 遺伝子を抽出、一般的な炎症性マーカー：IL-6, TNF- $\alpha$ , 抗炎症性マーカー：IL-10, TGF- $\beta$  との発現変化の比較検討を行なった。PIST 炎症性特異的炎症性マーカーはいずれも、正常時で对照群の口腔粘膜組織 (OMT)・歯周組織 (PT) と比較して有意に発現が高い発現が認められた (図 1)。

炎症反応時における PIST 特異的炎症性マーカーの発現は、9 遺伝子中 8 遺伝子が口腔粘膜と比較してインプラント周囲上皮で高い発現を維持したことが明らかとなった (図 2)。一方で、インプラント周囲軟組織における一般的な炎症性マーカー発現は、非炎症時には对照群と比較して有意な発現差は認められず、炎症時にはインプラント周囲軟組織で高い傾向がみられたが有意差は認められなかった。このことから、インプラント周囲軟組織では、特異的に発現する炎症関連遺伝子がありこれらの発現がインプラント周囲炎を同定する特異的炎症性マーカーとなることが示唆された。

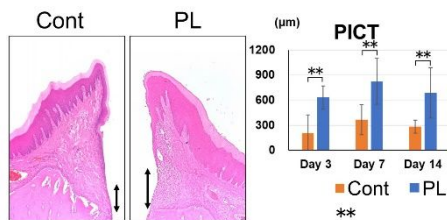


炎症時の PIST 特異的炎症性マーカーの遺伝子発現 (図 2)

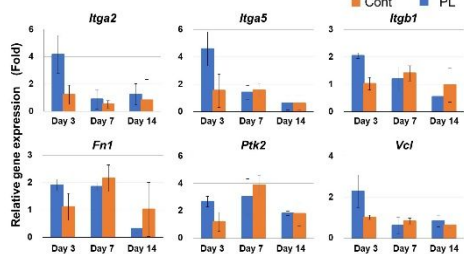
### インプラント周囲結合組織に関連する接着関連因子の特定

インプラント埋入モデルラットを用いて、インプラント周囲結合組織付着の促進モデルとしてインプラント体に低温大気圧プラズマ照射を行ったプラズマ照射群 (PL) は对照群 (Cont) と比較して、有意にインプラント周囲結合組織の付着幅 (PICT) を有意に増加させた (図 3)。

インプラント周囲結合組織幅の増加が認められたインプラント周囲軟組織内における細胞接着因子に関連する遺伝子発現を比較したところ、インテグリンファミリーの *Itga2*, *Intga5*, *Intgb1*, *Vinculin (Vcl)* で初期接着がみられる Day 3 で Cont と比較して有意に遺伝子発現が上昇した (図 4)。また、インテグリン (*Itga2*, *Intga5*, *Intgb1*) に対しては免疫組織化学染色によるタンパクレベルでの発現局在を検討したところ、いずれもインプラント体と接触界面に限局して発現し、Day 3 から Day 14 まで発現が維持されることが確認された。



プラズマ処理によるインプラント周囲結合組織幅の増加 (図 3)

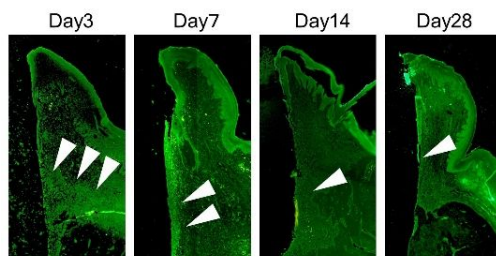


インプラント周囲軟組織で特異的発現変化した細胞接着因子 (図 4)

このことから、インプラント周囲結合組織ではインプラント埋入直後からインプラント体と界面とにインテグリン (*Itga2*, *Intga5*, *Intgb1*) が発現し、さらに表面処理によりその発現が増加することでインプラント周囲組織幅 (PICT) が増加させることから、インプラント周囲炎の起点となるインプラント周囲上皮の最下点から歯槽骨までの距離を維持することで、生体防御機構の改善に寄与することが示唆された。

### 創傷治癒促進に関連する既知遺伝子のインプラント周囲軟組織発現の評価

インプラント埋入モデルラットにおける創傷治癒過程 (Day 3, 7, 14, 28) における *Npas2* の発現ならびに局在を免疫組織化学染色にて検討をした。創傷治癒初期である Day 3 ではインプラント周囲結合組織の全層に発現がみられ、経時的にインプラント体界面部に局在していった。また、発現強度は弱くなる傾向を示したが、治癒が完了した Day 28 でも一部で発現が認められた。発現抑制によって治癒が促進することが知られている *Npas2* がインプラント周囲結合組織の治癒過程において継続的に発現を示したことから、インプラント体 (チタン) の存在により通常よりも治癒遅延ならびに生体防御機構が脆弱化している可能性が考えられ、発現抑制が生体防御機構の改善に寄与することが示唆された。



創傷治癒に関連する遺伝子 (*Npas2*) の発現・局在の変化 (図 5)

このことから、インプラント体 (チタン) の存在により通常よりも治癒遅延ならびに生体防御機構が脆弱化している可能性が考えられ、発現抑制が生体防御機構の改善に寄与することが示唆された。

## 2) ハイスループットスクリーニング法による標的遺伝子の発現制御する薬剤の同定

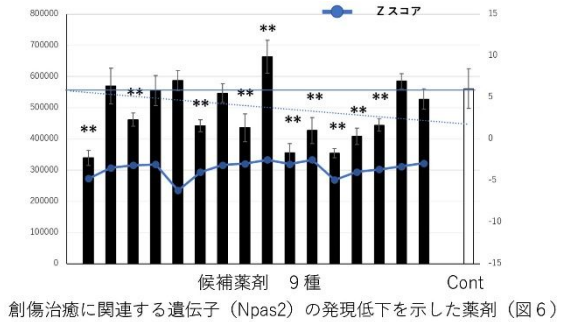
インプラント周囲結合組織に特異的に発現する炎症性マーカー：Cxc12 では、コントロールと比較して有意に発現抑制を示した薬剤が 50 種以上抽出された。しかしながら、発現差が大きい薬剤の多くが培養線維芽細胞に対する細胞毒性による細胞減少による影響での発現抑制であることが疑われた。目的とするインプラント周囲炎の予防薬として使用についても、その影響が危惧されたため、これらの薬剤は研究対象から除外をした。

インプラント周囲結合組織で特異的に発現変化をする細胞接着因：Itga2 では、コントロールと比較して、有意に発現現象を示した薬剤は 60 種以上認めただのに対して、目的とする発現上昇を認めた薬剤は同定されなかった。ハイスループットスクリーニング法は網羅的評価法より、選定した条件下と同様のチタン上での細胞培養が行なえなかったことで、標的遺伝子のタンパク質発現が効率的に行えていないことが原因と考えられた。個々の薬剤の検討を行っていく方法は非効率的かつ、本研究期間中で全てを終えることが困難であったため、「細胞接着因子の向上」を目的とした薬剤同定は、研修対象から除外をした。

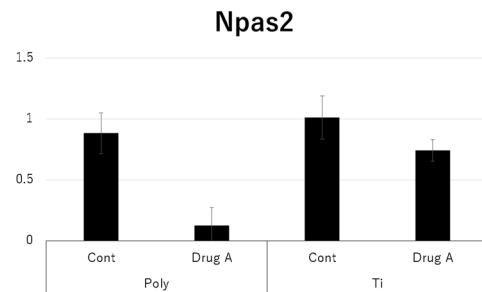
発現抑制により軟組織の早朝治癒の促進する遺伝子：Npas2 では、発現抑制を示した薬剤 16 種のうち、コントロールと比較して有意に低下した 9 種の薬剤を同定した (図 6)。

これらの同定した 9 種の薬剤の既存薬としての効能・応用、副作用の有無を過去の研究報告等から評価し、ドラッグリポジショニングとして応用が可能となる薬剤を抽出した。さらに、各薬剤の単価、過去の研究報告より、将来的に口腔内への臨床応用が行ないやすいと考えられる薬剤を 1 種、選定した (薬剤 A)。培養皿状 (Poly) とチタンディスク上 (Ti) に培養したラット口蓋由来線維芽細胞に薬剤 A を添加したところ、いずれも非添加群 (Cont) と比較して有意に発現が減少した。

このことから、Npas2 の発現抑制は軟組織の創傷治癒を促進することが知られており、インプラント周囲軟組織において、炎症のみならず創傷治癒初期のみならず治癒完了後も Npas2 の発現が維持されていたことから、本研究で同定された薬剤を応用することでインプラント周囲結合組織における生体防御機構が維持されることが示唆された。



創傷治癒に関連する遺伝子 (Npas2) の発現低下を示した薬剤 (図 6)



同定した薬剤によるNpas2発現抑制の評価 (図 7)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi T, Sasaki H, Asami Y, Mori G, Yoshinari M, Yajima Y	4. 巻 108
2. 論文標題 The characteristic regulation of gene expression Lbp and Sod3 in peri implant connective tissue of rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 592-600
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.a.36839	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asami Y, Sasaki H, Harada A, Hanazawa K, Kobayashi T, Mori G, Yajima Y.	4. 巻 110
2. 論文標題 Rat peri-implant soft tissue specifically expressed CXCL2 on titanium implant during wound healing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 899-908
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.a.37337	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山本将仁, 是澤和人, 小川雄大, 廣内英智, 松永智, 佐々木穂高, 小高研人, 笠原正彰, 笠原典夫, 崎山浩司, 阿部 伸一	4. 巻 32
2. 論文標題 【超高齢社会への責任、患者に寄り添う歯科医療を目指して】インプラント装着後 身体に現れる加齢変化	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本口腔インプラント学会誌	6. 最初と最後の頁 181-188
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 浅見洋佑, 佐々木穂高, 守源太郎, 小林孝誌, 齋藤伸, 原田惇朗, 矢島安朝
2. 発表標題 ラットのインプラント周囲軟組織の創傷治癒時におけるCXCL2の発現と局在
3. 学会等名 第50回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅見洋佑, 佐々木 穂高, 守 源太郎, 小林 孝誌, 齋藤 伸, 原田 惇朗, 矢島 安朝
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第308回東京歯科大学記念学会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asami Y, Sasaki H, Mori G, Kobayashi T, Yajima Y
2. 発表標題 Altered expression of specific inflammatory marker in peri-implant soft tissue
3. 学会等名 The 97th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sasaki H, Kobayashi T, Nakano R, Nakajima K, Yajima Y
2. 発表標題 Relationship with Carbohydrate Metabolism and Bone Turnover in Implant Patients
3. 学会等名 The 97th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木穂高
2. 発表標題 東京歯科大学におけるインプラント治療のリスクファクターの探求
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会関東・甲信越支部 第10回学術シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田惇朗, 佐々木穂高, 浅見洋佑, 花澤清俊, 宮崎創太, 平野友基, 関根秀志, 矢島安朝
2. 発表標題 低温大気圧プラズマ処理によるインプラント周囲軟組織の封鎖性向上
3. 学会等名 第51回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田惇朗, 佐々木穂高, 浅見洋佑, 花澤清俊, 宮崎創太, 平野友基, 関根秀志, 矢島安朝
2. 発表標題 低温大気圧プラズマ処理によるインプラント周囲軟組織内コラーゲンへの影響
3. 学会等名 第312回東京歯科大学学会・総会
4. 発表年 2021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	平野 友基 (Hirano Tomoki) (10755044)	東京歯科大学・歯学部・助教  (32650)	
研究分担者	守 源太郎 (Mori Gentaro) (30733745)	東京歯科大学・歯学部・非常勤講師  (32650)	
研究分担者	国分 栄仁 (Kokubu Eitoyo) (70453785)	東京歯科大学・歯学部・講師  (32650)	

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
研究協力者	浅見 洋祐  (Asami Yosuke)		
研究協力者	原田 惇朗  (Harada Atsuro)		

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