

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10180

研究課題名(和文) 骨粗鬆症患者におけるインプラント骨結合強度の改善：腸内細菌叢からのアプローチ

研究課題名(英文) Improvement of implant osseointegration in osteoporosis patients via modification of intestinal microbiota

研究代表者

菅野 太郎 (Kanno, Taro)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：30302160

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)：本研究では、ポリフェノールの一種であるプロアントシアニジンを含むブドウ種子抽出物(GSE)の経口投与が、骨粗鬆症のモデル動物(卵巣摘出ラット)の骨治癒およびインプラント骨結合に及ぼす影響を調べた。卵巣を摘出したラットの頭蓋骨に骨欠損を作製し、脛骨にチタン製ミニスクリュー(インプラント)を埋入した。治癒期間中、毎日GSEあるいは水を経口投与した。GSE投与群では水投与群に比べて、骨欠損の治癒が促進されることが分かった。また、GSE投与群では、脛骨に埋入したインプラントの除去トルク値および組織学的分析によって算出した骨とインプラントの接触率が水投与群よりも有意に高くなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロアントシアニジンは果物や野菜に含まれるポリフェノールであり、日常的に摂取している安全性の高い物質である。この物質は種々の生理活性を有しており、メタボリックシンドロームの症状を改善する効果がある。本研究では、このプロアントシアニジンが骨粗鬆症患者のインプラント治療に応用できるかどうかについて動物実験を通して検証した。その結果、卵巣を摘出した骨粗鬆症モデルのラットでは、骨治癒が遅延しインプラントと骨の結合強度が低下するが、プロアントシアニジンを経口投与することでこれらの症状が軽減されることが分かった。従って、新たな医薬品あるいはサプリメント(特定保健用食品)として応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to evaluate the potential effects of proanthocyanidin-rich grape seed extract (GSE) on the healing of bone defects as well as implant osseointegration in ovariectomized (OVX) rats, a model of osteoporosis in postmenopausal women. Female Wistar rats were used. The animals underwent OVX operation. One week after OVX surgery, the second surgery was performed to create calvarial bone defects. In addition, one week after the second surgery, implant surgery was performed to install titanium mini-screws in tibiae. During the healing period, GSE or vehicle (water) was daily administered by oral gavage. OVX tended to impair healing of the defects. However, GSE counteracted the OVX-induced impairment in bone healing. Similarly, GSE increased the implant removal torque and bone-to-implant contact compared to those of the water-administered animals. These findings suggest that oral administration of GSE may be beneficial in dental implant therapy in osteoporosis patients.

研究分野：歯科インプラント学

キーワード：プロアントシアニジン 骨粗鬆症 インプラント 骨治癒 オッセオインテグレーション

## 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、骨強度が低下する疾患であり、主たる原因は女性ホルモンの低下や加齢である。特に、女性ホルモンの一種であるエストロゲンは、骨形成を促進し、骨吸収を抑制する役割を担っているため、閉経や加齢によりエストロゲンの分泌が低下すると骨形成と吸収のバランスが崩れ、骨密度および骨質の低下により骨粗鬆症が発症する。骨粗鬆症は、歯科用インプラント治療のリスクファクターと考えられており、骨結合の獲得およびその維持に対するリスクとなる(歯科インプラント治療指針：厚生労働省)。インプラント治療は、虫歯や歯周病で歯を喪失した患者が対象となるため、若年層よりも中年層や高齢者層の患者が中心となるので骨粗鬆症患者も多く含まれることとなる。従って、骨粗鬆症患者に対する予後良好なインプラント治療の提供は歯科医療の重要課題の一つである。

我々の研究グループでは、ポリフェノールの一種であるプロアントシアニジンの代謝改善効果の研究を行ってきた。これまでに閉経女性のモデル動物(卵巣摘出をしたマウス)にプロアントシアニジンを経口投与することで、メタボリックシンドロームの症状(肥満や血糖調節機能)が改善することを実証してきた<sup>1)</sup>。このプロアントシアニジンの代謝改善作用は、閉経女性における骨代謝も改善することが期待できる。プロアントシアニジンは果物や野菜に含まれるポリフェノールであり、日常的に摂取している安全性の高い物質であるため、骨粗鬆症患者のインプラント治療における新たな医薬品あるいはサプリメント(特定保健用食品)として応用できる可能性がある。

プロアントシアニジンは、カテキンなどの重合体であり分子量が大きいため、腸管から吸収されにくい。従って、腸管吸収 血管 各臓器という作用経路は考えにくい。これまでの研究で、プロアントシアニジンは卵巣摘出後のホルモンバランスの乱れなどで変化する腸内細菌叢を元に戻し、脂質や糖の代謝機能を改善する作用を発揮することが示唆されている<sup>2)</sup>。しかしながら、プロアントシアニジンがエストロゲン欠乏による骨量減少を改善し、インプラント埋入後の骨結合(オッセオインテグレーション)強度の向上をもたらすかどうかに関する科学的な根拠は未だ報告されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、骨粗鬆症のモデル動物(卵巣摘出ラット)において、プロアントシアニジン経口投与による骨治癒促進効果とインプラントの骨結合強度改善効果の実証を目的とした。

## 3. 研究の方法

“プロアントシアニジンの経口投与が卵巣摘出ラットにおける骨量減少、骨治癒、オッセオインテグレーションに及ぼす影響の検証”

研究デザイン：本動物実験は、東北大学動物実験専門委員会での審査を受け、承認を得て実施した(承認番号:2018DnA-038)。プロアントシアニジン(80%以上含むブドウ種子抽出物(GSE))を Indena 社(製品名: Leucoselect)から入手した。GSE 粉末を純水(PW)に溶解・懸濁して調製し、動物実験に用いた。雌性 Wistar ラット(6週齢)を購入し、1週間の順化飼育後に実験を開始した。Day 0 において実験動物に対して卵巣摘出術(OVX)あるいは偽手術(Sham)を行った。外科手術の翌日(Day 1)以降から試験期間が終了するまで(Day 35)、経口ゾンデを用いて GSE あるいは Vehicle としての PW を毎日投与した。GSE の投与量は先行研究をもとに、100 mg/2.5 mL/kg/day とした。従って、外科処置および投与物質の組み合わせによって、次の 3 群を設定して実験を行った(各群 6 匹); Sham+PW、OVX+PW、OVX+GSE。Day 7 に頭蓋骨に骨欠損を作製し、Day 14 にチタン製スクリュー(インプラント)を脛骨に埋入した。Day 35 に動物を安楽死させて、骨欠損部治癒評価のための頭蓋骨採取、インプラントの除去トルク試験、組織学的分析のためにインプラントを埋入した脛骨の採取、骨密度計測のための大腿骨採取、およびプロアントシアニジンのエストロゲン様作用を評価するための子宮採取を行った。

外科処置：すべての外科処置は、0.15 mg/kg メドミジン、2 mg/kg ミダゾラム、2.5 mg/kg 酒石酸ブトルフェール混合液の皮下注射による全身麻酔下で実施した。OVX 手術および Sham 手術では、ラット背部を剃毛・消毒後に、腎臓を触知できるあたりに小切開を入れて腹腔内にアクセスした。卵巣をリングピンセットで掴んで腹腔外に出し、OVX 群では卵巣と輸卵管の移行部で結紮を行った後に卵巣を切除し、Sham 群では卵巣をもとの位置に戻した。その後、切開部を縫合した。頭蓋骨の骨欠損の作製は、頭蓋部の剃毛・消毒後に矢状方向に皮膚を切開してフラップを剥離・翻転して行った。外径 5 mm のトレフィンバーを 6000 rpm で操作して、露出した頭蓋骨に骨欠損を作製した。脳の損傷を避けるために、トレフィンバーによる切削は骨を貫通する手前で停止し、最終的にはエキスペータを用いて骨片を除去した。骨欠損作製後、骨膜と皮膚をそれぞれ縫合した。インプラント埋入手術は、脛骨内側部位の剃毛・消毒後に脛骨に沿って皮膚を切開し、フラップ剥離・翻転して行った。露出した脛骨に直径 1.5 mm のドリルで穴をあけ、M1.6 のチタン製ミニスクリュー(全長 3 mm)をセルフタッピング法で埋入した。埋入後、

皮膚を縫合し、切開部を閉鎖した。

骨欠損のマイクロ CT 分析：Day 35 で採取した頭蓋骨をマイクロ CT (ScanX-mate-E090, Comscantecno) を用いて分析した。各群で 12 の骨欠損のマイクロ CT 画像を撮影した。解像度 (voxel size) を  $50\ \mu\text{m}$  とし、600 projections の画像を取得し、画像解析ソフト ImageJ を用いて解析し、骨欠損部の体積を計測した。

オッセオインテグレーションの分析：Day 35 において、実験動物の安楽死後、インプラントを埋入した脛骨部の皮膚を切開し、チタンスクリューの除去トルク ( $\text{N}\cdot\text{cm}$ ) を、トルク計 (GLK060, KTC) を用いて計測した。除去トルク試験は、各群 9 本のインプラントで行った。除去トルク試験に用いなかった各群 3 本のインプラントは脛骨ごと採取し、10% 中性ホルマリン中に浸漬して組織を固定した。その後、通常に従って脱水し、メチルメタクリレートレジンに包埋した。インプラントを埋入した脛骨を含むレジンブロックを、切断機 (BS-300CP, Exact) を用いてインプラント中央部で切断し、マイクログラインディング装置 (MG-400CS, Exact) を用いて厚さ  $40\ \mu\text{m}$  の非脱灰標本を作製した。組織標本のヘマトキシリン・エオジン染色を行い、組織形態学的分析を行ってインプラントと骨の接触率 (BIC) を算出した。

大腿骨のマイクロ CT 分析：GSE の経口投与が骨密度に及ぼす影響を大腿骨において評価した。各群の動物から 1 本 / 匹の大腿骨を採取し、マイクロ CT 分析に用いた。大腿骨のマイクロ CT 画像撮影では、解像度を  $67\ \mu\text{m}$  とした。大腿骨遠位部分の成長板から  $1.5\ \text{mm}$  離れた所から長さ  $3\ \text{mm}$  の領域を計測部位とし、マイクロ CT を用いた骨微細構造の評価のためのガイドライン<sup>3)</sup>に従って、海綿骨については、bone volume fraction [BV/TV (%)]、trabecular number [Tb.N (1/mm)]、trabecular thickness [Tb.Th ( $\mu\text{m}$ )]、trabecular separation [Tb.Sp ( $\mu\text{m}$ )] を評価した。また、皮質骨については total cross-sectional area [Tt.Ar ( $\text{mm}^2$ )]、cortical bone area [Ct.Ar ( $\text{mm}^2$ )]、cortical bone area fraction [Ct.Ar/Tt.Ar (%)]、cortical thickness [Ct.Th ( $\mu\text{m}^2$ )] を算出した。

子宮の重量計測：OVX によってエストロゲンが欠乏すると子宮が委縮する。もし GSE あるいは GSE の分解産物・異化生成物がエストロゲン様作用を発揮すると、子宮の委縮が抑制されると考えられる。そこで、安楽死させた各群の動物から子宮を摘出し、精密電子天秤を用いて子宮重量の計測を行った。

#### 4. 研究成果

頭蓋骨に作製した骨欠損のマイクロ CT 画像の分析結果を図 1 に示す。マイクロ CT 画像においては、新生骨の形成がいずれの群においても認められた。しかしながら、骨欠損の大きさを定量的に解析したところ、OVX+PW 群では、OVX+GSE 群に比べて有意に大きな骨欠損の残留が認められた。OVX+PW 群と Sham+PW 群との差は統計学的に有意な差として検出されなかったが、p 値は 0.0508 と低い値となった。一方、Sham+PW と OVX+GSE では骨欠損の大きさに有意差は認められなかった。

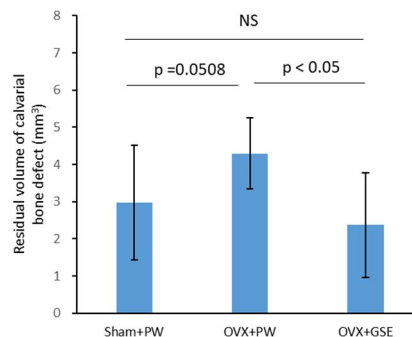


図1. 頭蓋骨に作製した骨欠損のDay 35における体積

脛骨に埋入したインプラントの除去トルク試験結果を図 2A に示す。OVX+PW 群では、他の 2 群に比べて有意に小さい除去トルク値が認められた。一方、Sham+PW と OVX+GSE では、除去トルク値に有意差は認められなかった。インプラントと骨の組織形態学的分析の結果を図 2B に示す。新生骨の形成及びインプラントオッセオインテグレーションがいずれの群の組織標本でも認められた。しかしながら、OVX+PW 群では、他の 2 群に比べて有意に低い BIC が認められた。一方、Sham+PW と OVX+GSE では、BIC に有意差は認められなかった。

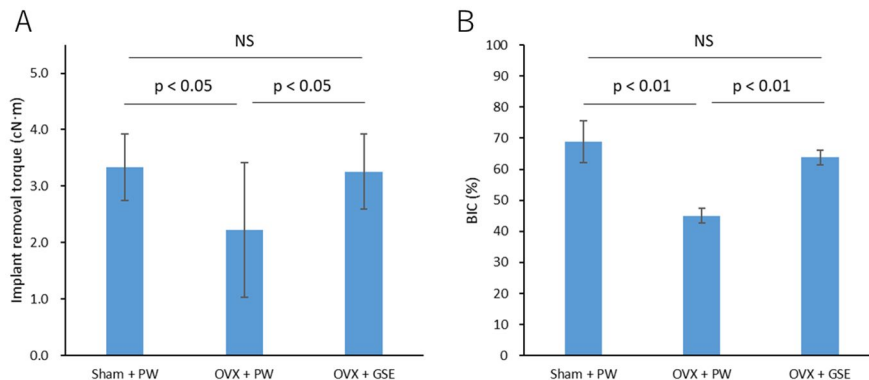


図2. 脛骨に埋入したインプラントの除去トルク値と骨接触率 (BIC)

大腿骨の骨微細構造の分析結果を図3に示す。OVXによってBV/TVが顕著に下がることが確認できた。その結果、Sham+PW群ではBV/TVが20%であったのに対して、OVX+PW群では3%となった。GSEの経口投与により骨密度が改善し、OVX+GSE群ではBV/TVが16%となった。また、OVX+PW群では、Sham+PW群よりもTb.Nが有意に低く、Tb.Spが有意に高くなった。OVX+GSE群ではOVX+PW群よりもTb.Nが有意に高くなり、Tb.Spが有意に低くなったが、Sham+PW群と比べると、Tb.Nは有意に低く、Tb.Spは有意に高かった。一方、OVXおよびGSE投与が皮質骨に及ぼす影響は小さく、いずれのパラメータにおいても群間で有意差は認められなかった。

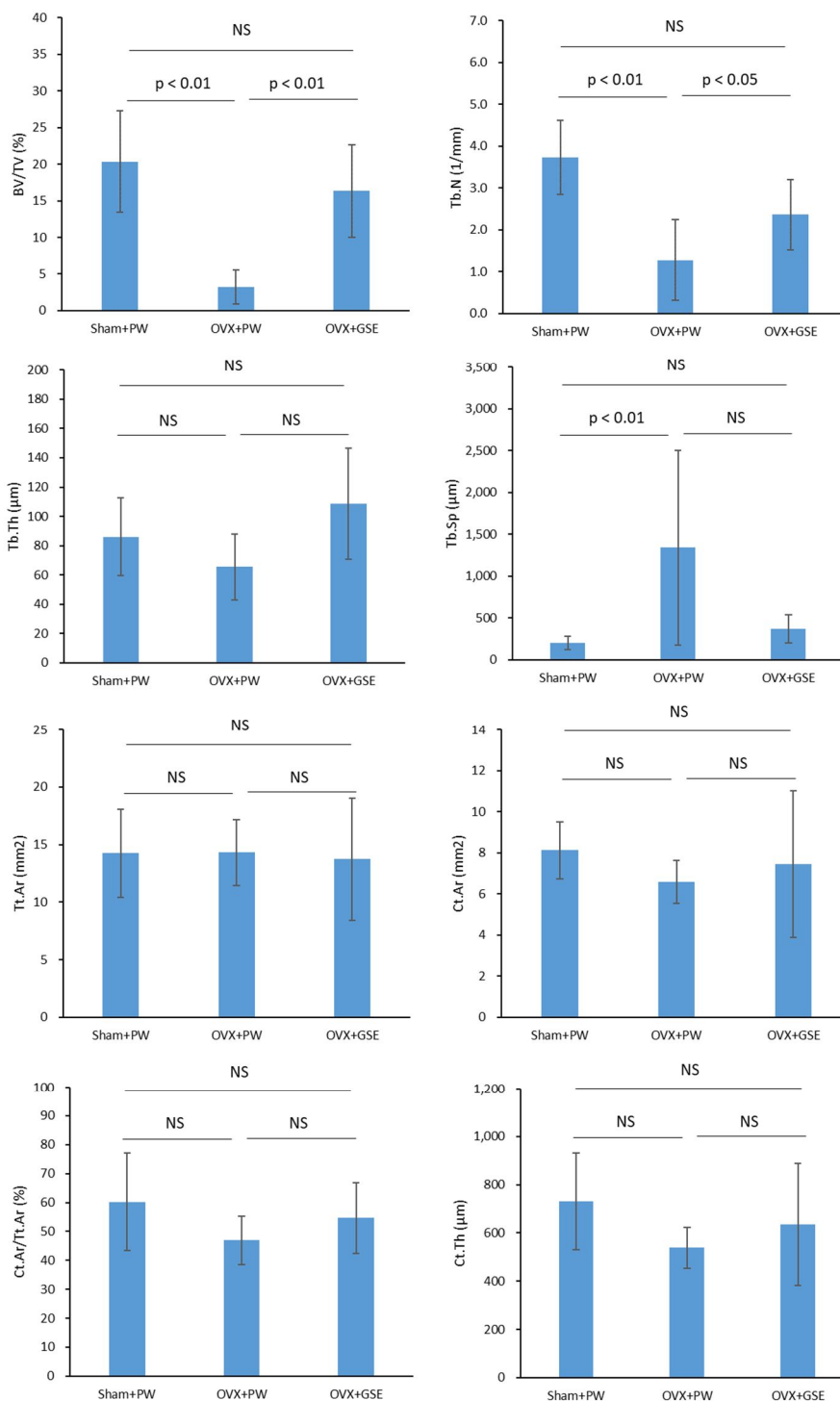


図3. マイクロCTを用いた大腿骨の骨構造解析結果

子宮重量はSham+PW群で489 ± 81 mg、OVX+PW群で152 ± 46 mg、OVX+GSE群で164 ± 70 mgとなった。Sham+PW群は他の2群に比べて有意に高い値であったが、OVX+PW群とOVX+GSE群では有意差は認められなかった。従って、GSEに含まれるプロアントシアニジンはエストロゲン様作用とは別の作用機序で骨代謝改善に寄与していることが示唆された。

以上の結果より、GSE の経口投与は OVX による骨治癒遅延や骨量減少を軽減する作用があることが示された。これらの作用に関連して、GSE の経口投与は OVX によるチタン製インプラントの除去トルク値および BIC を改善する効果があることが実証された。今後、さらなる研究を通して、GSE が歯科臨床で応用されるようになることが期待される。

GSE の作用機序の解明を目的として、上記とは別の動物実験を行い GSE 経口投与が腸内細菌叢に及ぼす影響を予備試験で調べた。ラットの糞便および盲腸の内容物を採取して DNA を抽出して PCR で細菌の門レベルでの解析を行い、Firmicutes 門と Bacteroidetes 門の組成比(F/B 比)を調べた。先行研究では、OVX により F/B 比が増加することが示唆されているが、本予備試験では F/B 比の個体差が大きく顕著な増加は認められなかった。また、次世代 DNA シーケンサーを用いた解析も実施したが、OVX による特定の細菌種の増加や減少、あるいは F/B 比の増加が認められなかった。今後の研究では、対象とする動物の個体数を増やしてより詳細な分析を実施し、GSE の作用が腸内細菌叢を介して発揮されるのかどうかの分析を行う。さらに、腸内細菌による GSE の代謝産物の影響などを調べて作用機序を明らかにする必要がある。

#### 引用文献

- 1) Jin G, Aobulikasimu A, Piao J, Aibibula Z, Koga D, Ochi H, Ishiyama K, Kanno T, Niwano Y, Okawa A, Asou Y. Proanthocyanidin-rich grape seed extract prevent estrogen deficiency-induced metabolic disorders. *J Med Dent Sci*, 62: 45-50, 2018
- 2) Jin G, Asou Y, Ishiyama K, Okawa A, Kanno T, Niwano Y. Proanthocyanidin-rich grape seed extract modulates intestinal microbiota in ovariectomized mice. *J Food Sci*, 83: 1149-1152, 2018
- 3) Bouxsein, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J. Bone Miner Res* 25:1468–1486, 2010.

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 Tenkumo T, Aobulikasimu A, Asou Y, Shirato M, Shishido S, Kanno T, Niwano Y, Sasaki K, Nakamura K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Proanthocyanidin-rich grape seed extract improves bone loss, bone healing, and implant osseointegration in ovariectomized animals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8812
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65403-4	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakamura K, Tenkumo T, Aobulikasimu A, Shirato M, Shishido S, Kanno T, Niwano Y, Sasaki K, Asou Y
2. 発表標題 Improvement of bone health condition by oral administration of proanthocyanidin-rich grape seed extract in ovariectomized animals
3. 学会等名 XXX International Conference on Polyphenols (ICP2020 Turku) (国際学会)
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	中村 圭祐 (Nakamura Keisuke) (30431589)	東北大学・歯学研究科・准教授  (11301)	
研究分担者	天雲 太一 (Tenkumo Taichi) (80451425)	東北大学・大学病院・講師  (11301)	

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