

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2023
課題番号：20K18608
研究課題名（和文）マクロファージと骨細胞のオートファジーを基軸としたインプラント周囲炎発症機構解明

研究課題名（英文）Clarification of pathophysiology of peri-implantitis based on macrophages and osteocyte autophagy

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）・客員研究員

研究者番号：00814170
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）：本研究目的は、インプラント周囲炎モデルを研究ツールとし、オートファジーを基軸としたインプラント周囲炎の発症機構を解明することにある。インプラント周囲炎モデルラットを作製して網羅的解析を行った。その結果、インプラント周囲硬軟組織では、健全な状態と比較して、コラーゲン産生が低下するとともに血管形成が抑制されていた。また、4種類のマクロファージサブタイプで動態変動が認められ、さらにT細胞のサブタイプにも変動が認められた。さらに、マクロファージのサブタイプAとT細胞のサブタイプXにおいて、オートファジーの特異的な発現変化が認められており、インプラント周囲炎にオートファジーが関与する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
インプラント周囲炎は国民病と呼ばれる歯周病と同様に、決定的治療法がない難治性慢性疾患で、原因も分かっていない。今回の研究では、インプラント周囲炎モデルラットを作製して詳細な解析を行い、インプラント周囲炎では、マクロファージとT細胞という免疫細胞の分布が変動し、あるマクロファージとT細胞で特異的にオートファジー発現の変動を認めたため、オートファジーがインプラント周囲炎と関連していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to clarify the pathophysiology of peri-implantitis based on autophagy by development of a rat model of lipopolysaccharide-induced peri-implantitis-like lesions. A rat model of peri-implantitis-like lesions was created and comprehensive analyses were performed. As results of quantitative analyses, collagen production and the number of blood vessels were significantly reduced in peri-implantitis-like lesions when compared to control group (normal tissue around implants). The distribution of 4 macrophage subtypes and several subtypes of T cells were significantly changed in peri-implantitis-like lesions when compared to control group. Moreover, the expression of autophagy in macrophage subtype A and T cell subtype X was significantly altered in peri-implantitis-like lesions when compared to control group. Our findings suggest us that autophagy is associated with the pathophysiology of peri-implantitis.

研究分野：補綴系歯学

キーワード：インプラント周囲炎 リポ多糖 炎症 慢性疾患

1. 研究開始当初の背景

わが国の高齢化率は現在世界トップであり、40年後には約40%となることが推計され(引用文献)、近年では、歯科インプラント治療を希望する患者、治療中の患者、治療終了後でメンテナンスを受けている患者の高齢化が進んでいる(引用文献)。一方、インプラント治療の生物学的併発症であるインプラント周囲炎は、確定的な治療法が存在していない慢性の経過をたどる難治性硬軟組織疾患で、基礎研究や臨床研究が行なわれているものの、その病態形成機構はよく分かっておらず、さらに、なぜインプラント周囲炎を発症する患者としない患者がいるのかは不明である。

インプラント治療患者の大規模コホート調査を行うことは日本では困難であるが、スウェーデンにおける近年の大規模後向き研究で、インプラント周囲炎は治療患者の45%以上で認められ(引用文献)、他の臨床研究ではインプラント周囲炎が高齢者に多いことが報告されていることから(引用文献)、今後は、急速な高齢化に起因して、インプラント周囲炎患者が増加することは想像に難くない。

そのような中で近年、細胞の自食作用を特徴とするオートファジーが注目されており、(1)マクロファージのオートファジーを抑制すると、細菌内毒素であるリポポリサッカライド(LPS)刺激による炎症性サイトカインの産生が著明に増加すること(引用文献)、ならびに、(2)骨細胞のオートファジーを活性化すると骨組織の脆弱化が惹起されること(引用文献)などが報告されており、インプラント周囲炎との関連性が強く予想される。

2. 研究の目的

研究代表者はオートファジーに着目し、「LPSに起因するマクロファージのオートファジー過剰抑制誘発性炎症性サイトカインの持続的産生と、骨細胞のオートファジー活性化による骨組織の脆弱化がある閾値を超えるとインプラント周囲炎が成立する」と仮説を立てた。本研究の目的は、「インプラント周囲炎モデルを研究ツールとして用い、オートファジーを基軸としたインプラント周囲炎の発症機構を解明すること」にある。

3. 研究の方法

(1) LPS誘導型インプラント周囲炎モデルの作製

初めに、研究代表者の所属講座と歯周病科が共同開発したLPS誘発型歯周病様病変モデルラットを参照にして、LPS誘発型インプラント周囲炎様病変モデルラットする(引用文献)。ラット上顎第1大臼歯を抜歯4週間後に開発済みのラット用インプラントを埋入する(引用文献)。埋入直後よりフロイントアジュバンド活性を応用したLPS腹腔内投与で免疫化を行い、4週間後に追加免疫する。その3日後からインプラント周囲粘膜溝内にLPS(150 µg/1回/毎日)を毎日注入すると、ほぼ100%でインプラント周囲炎が誘発される。

(2) 0%と50%の確率でインプラント周囲炎を発症するモデルの開発

本研究では、「なぜインプラント周囲炎を発症する場合としない場合があるのか」を「マクロファージと骨細胞のオートファジー」に焦点を当てて研究するため、50%の確率でインプラント周囲炎を発症するモデルと、LPS投与が行われているにも関わらずインプラント周囲炎を発症しないモデルの開発が必要不可欠である。具体的には、インプラント周囲粘膜溝内に局所投与するLPS濃度を段階的に下げることで対応する。すなわち、20 µg・50 µg・100 µg/1回/毎日投与といった3種類の濃度を使用し、先に挙げた2種類のモデルに対する至適LPS濃度を同定して、各モデルを開発する。上記濃度で開発できない場合も考えられるが、その際には濃度を変更して開発を試みる。インプラント周囲炎モデルではLPS口腔内投与3日後から骨吸収が認められることから、LPSの歯肉溝内投与後0、1、2、4週でラットを屠殺して、以下のような各種解析を行う。

・ 構造学的解析：

マイクロCTで撮像した画像から、インプラント周囲骨組織の3次元構造解析を行う。インプラント近傍50 µmはアーチファクトの影響を受けることに留意して定量解析する。

・ 組織病理学的解析：

屠殺後採取したインプラントを含む組織片は、低温長時間脱灰後にインプラントを逆回転させ慎重に撤去する。組織損傷が危惧されるが、研究代表者の所属講座ではこの方法でインプラント周囲組織に損傷がないことを報告済みであり、不測の事態は起こらなかった。ヘマトキシリン-エオジン(H&E)染色、トライクローム染色、ピクロシリウスレッド染色を行い、骨面積、骨細胞数、空の骨小腔数、コラーゲン産生(I型とIII型)ならびに多形核白血球浸潤などを定量解析し、病理組織学的定量評価を行う。なお、骨組織の脆弱化は所属講座の既報に従い(引用文献)、マイクロCTとH-E染色から骨量と骨密度の評価を、また、コラーゲン線維と骨細胞の配向性解析から骨質の評価を行い、骨組織が量的・質的に脆弱化

しているかを比較・検討・判断する。

- 免疫病理学的解析：
軟組織では、今回焦点を当てるマクロファージと、炎症と高い相関を示す Th17 細胞を、また硬組織では骨芽細胞と破骨細胞に対する免疫染色を行い、免疫病理学的に定量評価する。さらに、マクロファージ、Th17 細胞、骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞におけるオートファジー関連分子の産生を免疫組織化学的に解析する。

4. 研究成果

インプラント周囲炎モデルラットを作製して、下記の所見を得ることができた。

LPS 投与群（実験群）では、PBS 投与群（対照群）と比較して、

- 全身的变化：LPS 反応性に有意に血清中の IgG 値が上昇する。
- インプラント周囲硬組織の変化
 - インプラントネック部からの辺縁骨レベルが有意に低下して、骨吸収が惹起されていた。
 - 破骨細胞数が有意に増加していた。
 - 骨細胞ネットワークには変化が認められなかった。
 - 第1スレッドと第2スレッド内部のコラーゲン配向性が有意に乱れ、骨質が著しく悪化していた。（本研究では、コラーゲンの優先配向性変化を骨質と定義している）一方、スレッド外部の骨質には変化が認められなかった。
 - CD169 陽性の骨性マクロファージ数は有意に減少していた。
- インプラント周囲軟組織の変化
 - コラーゲン産生量が有意に低下していた。
 - 血管数が有意に減少していた。
 - カルプロテクチンの産生量が有意に増大していた。
 - CD68 陽性全マクロファージ数が有意に増大していた。
 - CD38 陽性 M1 マクロファージ数が有意に増大していた。
 - CD163 陽性 M2 マクロファージ数に変化は認められなかった。
 - Th17 陽性細胞に変化が認められた。
- 検索したそれぞれの細胞に対するオートファジーの発現を免疫化学組織学的に解析した結果、マクロファージのサブタイプ A と T 細胞のサブタイプ X において特異的な発現変化が認められた。

（上記の結果は、現在 2 本の論文にまとめられている。）

<引用文献>

- 総務省(<http://www.soumu.go.jp/johotsusintokei/whitepaper/ja/j28/html/nc111110.html>)
Shimmel M et al. Periodontol 2000. 2017
Derks J et al. Journal of Dental Research. 2016
平成 28 年歯科疾患実態調査(<https://www.mhlw.go.jp/toukei/list/dl/62-28-02.pdf>)
Deretic V et al. Trends Cell Biol. 2012.
Vrahnas C et al. Nat Commun. 2019
Yoshinaga Y et al. J Periodontal Res. 2012.
Uto Y et al. PLoS ONE. 2017.
Kurosima S et al. Acta Biomater 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究成果は現在2本の論文にまとめられており、英文校正を終えている。

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