

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：22791893

研究課題名（和文） 骨細胞に着目したインプラント周囲骨のメカノバイオロジーの解明

研究課題名（英文） Effects of substrate strain and mechanical damage on osteocyte around implant

研究代表者

森山 泰子（MORIYAMA YASUKO）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：50452769

研究成果の概要（和文）：

インプラントに不適正な荷重がかかるとインプラント周囲の骨が吸収する現象が知られている。一方、生体では適度な荷重により骨の恒常性が保たれている。このように応力と骨の関係には解明されていないことが多いことから、メカニカルストレスの受容機構を解析する必要があると考えた。

ラット口腔内インプラントモデルを作製し（非荷重、適正荷重、過度荷重）組織学的計測を行った。各群インプラント周囲に新生骨の形成が認められたが、類骨が多く、成熟した骨に認められる骨細胞は観察されなかった。また、力学的反復刺激を与えたところ、刺激を与えた群におけるRANKLの発現量が有意に高かった。このことから、インプラント周囲骨細胞にかかる応力から骨吸収が惹起され、リモデリングが開始される可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Microdamage is naturally contained in bone and has been considered to trigger bone remodeling. Osteocytes, which exist in bone matrix forming 3-D cell-to-cell network, provide cellular basis to detect local mechanical environment neighboring the microdamage, and should be involved in the initiating mechanism of bone remodeling. This time we demonstrate the role of osteocytes in the initial phase of osteoclastogenesis around implant, osteocyte-like cell line MLO-Y4 cells were three-dimensionally cultured inside collagen gel and subjected to cyclic stretching like occlusal force.

In vivo study, right maxillary first molars were extirpated from rats and implanted with 3 types of implants (non-load, reasonable-load, over loaded). At 1, 2 and 4 weeks after implantation, rats were sacrificed and undecalcified ground sections were fabricated. We examined microcracks around osteocytes by fluorescent stain and after that, the specimens were stained with the Villanueva Goldner stain and bone volume was calculated. As a results, every specimens showed new bone formation around implants, but these bone qualities were less mineralized bone. So osteocyte could not showed these observation period. In the future, we continue to examine bone remodeling around implant long period of observation.

In vitro study, we established a loading apparatus in which osteocyte-like cell line MLO-Y4 cells were three-dimensionally cultured inside collagen gel and subjected to cyclic

stretching in near occlusal force. According to the level of RANKL in mechanical group were significantly higher than those in the non-mechanical group. Our data suggested that when MLO-Y4cells are mechanically damaged, the membrane-bound forms of M-CSF and RANKL are released, and could thus act as a “targeting” signal to bone remodeling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：補綴系歯学

キーワード：インプラント、骨細胞、三次元培養、メカノバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラント治療はその成功率の高さから、欠損補綴治療の一選択肢として確立している。しかし、歯科臨床では義歯床下の歯槽骨や応力のかかったインプラント周囲骨が吸収することよくあり、応力は骨に対してネガティブなものとしてとらえられているのが現状である。

一方で生体は応力負荷状態によって骨量を維持している（骨形成が活性化されている：Wolffの法則）ことが知られている。

このように、応力と骨の興奮には解明されていないことが多いことから、メカニカルストレスの受容機構と骨リモデリング現象を詳細に解析する必要があると考えた。

ここでは、特に **mechanostat cell** と考えられている骨細胞に着目して検討していくこととした。一般に骨組織では持続性の反復外力や加齢などにより微小ダメージが発生・蓄積している。骨基質の中で骨細胞が存在する骨小腔が応力の集中箇所となり、マイクロクラックの発生場所にあたると言われている。このことより不適合な咬合力を与えられたインプラント周囲骨には応力が集中して、インプラント周囲の骨細胞に働きかけ、マイクロクラックが生じることによって、インプラント周囲の骨吸収が生じるという仮説を立てた。

2. 研究の目的

インプラント周囲骨のリモデリング機

構についてはわかっていないことが多い。例えば、臨床現場ではインプラントの初期固定時に過度な荷重がかかるとインプラント周囲に骨吸収を起こし、最悪の場合インプラントが脱落することがある。しかし、即時埋入、即時負荷負プランとも普及してきている現在、適度な過重および荷重をコントロールできればインプラントの脱落は防げるのも事実である。

そこで、インプラント周囲骨のリモデリングが、異なる荷重量によってどのように変化するのか経時的に観察、検討する。また、メカになるストレスを受容すると有力視されている骨細胞の形態変化と応力下のインプラント周囲骨の遺伝子発現の変化を対応させることによって、骨の応力に対する情報伝達経路を総合的に検討する。加えて、ゲル内で骨細胞を三次元培養することで骨内を再現し、**in vitro** においても応力に対する骨細胞間ネットワークを観察する。

本研究では、インプラント周囲骨および応力を感知すると言われている骨細胞に着目し、インプラント周囲骨吸収メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

in vivo 実験：

Wistar ラット（雄性、4週齢）、上顎第一臼歯を抜去し、4週間の治癒期間をおき、インプラントを埋入する、ラット口腔内インプラントモデルを作製し、実験を行った。埋

入するインプラントは荷重がかからない非荷重のもの、咬合面程度の適正荷重のもの、咬合面より高い過度荷重のものを作製した。観察期間は1、2、4週間とした。骨細胞に着目し、組織を basic fuchsin にて蛍光染色し、骨細胞および骨細胞周囲にみられるマイクロクラックを観察し、インプラント周囲の骨細胞にいかなる影響を与えているか検討する。その後、研磨標本を Villanueva Goldner 染色を行い、インプラント周囲の新生骨の骨質を分染する。また、骨細胞のアポトーシス量を計測し、応力による影響を検討する。同モデルを使用しインプラント周囲骨の遺伝子発現量を計測し、応力下の骨吸収、骨形成メカニズムを解析する。

in vitro 実験：

骨細胞 MLO-Y4cell を三次元培養し、さまざまな応力をかけ、インプラント周囲の骨細胞にどのように応力がかかり、骨細胞が反応するかを検討する。三次元で培養することによって樹状突起によって細胞同士が連絡し合っている骨細胞の突起を、生体に近い形で再現できることが利点である。まずは、シリコンチャンバーにてひずみを数種かけた状態で測定する。インプラントには様々な応力がかかることから、インプラント周囲の有限要素法を利用しインプラント周囲の骨のひずみを解析し、後にひずみ量を対応させ、骨細胞の反応を検討する。骨細胞の解析は、応力をかけた後、骨細胞の生死の計測や、遺伝子発現量を解析する。

4. 研究成果

in vivo実験：

1週間後、各群インプラント周囲に新生骨の形成が認められた。周囲骨はまだ幼若で類骨が多く、成熟した骨に認められる骨細胞は観察されなかった。2週間後、それぞれの群にインプラント周囲に新生骨の形成が認められ、周囲骨の石灰化も認められたが、骨細胞は認められなかった。4週間後、インプラント周囲の新生骨の多くが石灰化されたのが観察された。荷重群は骨細胞も観察され、マイクロクラックも観察されたが、その量に有意な差は認められなかった。今回の実験では観察期間が短く、骨細胞が成熟するまでに至らなかったため、今後は観察期間を延ばして、オッセオインテグレーションを獲得したインプラント周囲の骨リモデリングを観察する必要があると考える。

in vitro 実験：

臨床で使用されている同じ規格のインプラントを使用し、インプラント周囲環境を模擬した実験系を確立した。実際臨床で使用さ

れているインプラントを骨細胞が培養されている三次元コラーゲンゲル内に固定し、力学的反復刺激（振幅100mm、振動数1Hz）を与えた。刺激時間は24時間とし、その後M-CFSとRANKLをELISAにて測定したところ、M-CFSには差はなかったが、刺激を与えた群におけるRANKLの発現量が有意に高かった。

このモデルでは、実際の骨のひずみ量に相当する力学的刺激を与えることが困難であったため、インプラントスクリー周囲の骨細胞の動態に注目することとし、モデルの改変を行うこととした。

まず、インプラント周囲の刺激のみならず刺激の幅による骨細胞MLO-Y4cellの反応を確認するために、5段階の刺激が一度に与えられるシリコンチャンバーを作製し、伸展刺激を与え、そのときの遺伝子発現をRT-PCRにて解析した。刺激は、ひずみ量0.16, 0.30, 0.38, 0.44, 0.50%で行った。結果はALPの発現はなく、M-CSF, RANKL, VEGFは刺激を与えられなかった方が発現の亢進が認められた。他にRunx2, NOS2など解析したが、n数が少なく統計処理が困難であったため、今後はnを増やすこと、また、インプラント周囲には伸張刺激のみならず圧縮刺激も生じていることから、それらを計測し、総合してインプラント周囲の骨リモデリングメカニズムを解明していく必要があると考える。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1件）

T. Kono, Y. Ayukawa, Y. Moriyama, K. Kurata, H. Takamatsu, K. Koyano. The effect of Low-Magniyude, High-Frequency Vibration Stimuli on the Bone Healing of Rat Linisor Extraction Socket. Journal of Biomechanical Engineering. 2012 (134) 091001-1-6. (査読あり)

〔学会発表〕（計 1件）

河野高志、鮎川保則、森山泰子、古谷野潔、高周波・低振幅の微小振動刺激が骨形成能に与える影響. 2012. 5月、神奈川.

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

○ 取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 森山 泰子
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号：50452769