

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670824

研究課題名(和文) 骨関連細胞ネットワークによるオッセオインテグレーション獲得機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of osseointegration induced by enhanced osteocyte network via mechanical repetitive loading

研究代表者

澤瀬 隆 (SAWASE, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：80253681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント治療は、失われた歯を回復して、機能的および審美的に満足をもたらしてくれる治療法のひとつです。インプラントの長期成功のためには、力がインプラント周囲骨にどのような影響を与えるかを知る必要があるものの、現在までそのような研究はほとんど行われてきませんでした。そこで本研究は、荷重がインプラント周囲骨細胞に与える影響を動物と細胞を用いて明らかにすることを目的としました。その結果、繰り返し荷重は、骨細胞ネットワークに影響を与え、しかも骨細胞を細胞死から遠ざけるように働くことで骨細胞ネットワークを増大させ、骨形成や骨微細構造の改質に影響を及ぼしている可能性が示唆されました。

研究成果の概要(英文)：Implant therapy is one of available options for replacing missing teeth. The clarification of load effect on bone around dental implants plays an important role in Long-term success for implant treatment. However, studies to address the load effect on bone around implants have not been developed. The aim of this study was to investigate the influence of mechanical repetitive loading on osteocyte network around dental implants in vivo and in vitro. Mechanical repetitive loading developed osteocyte networks and suppressed osteocyte apoptosis, affecting bone formation and bone microstructure around implants.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：デンタルインプラント 骨細胞 荷重 オステオネットワーク

1. 研究開始当初の背景

デンタルインプラントは現在、欠損の回復に欠かせない補綴治療の選択肢として広く認識されている。インプラント治療の成功の鍵を握る要素はオッセオインテグレーションの獲得にあると考えられているが、オッセオインテグレーションは、「荷重下のインプラントと骨組織との機能的かつ構造的結合」であると定義されている (Brånemark PI 教授による定義)¹。ところが現在までのオッセオインテグレーションの概念に関する研究は、静的状態での組織形態学的解析や材料学的研究が主流であり、真の意味でのオッセオインテグレーションを明らかにする荷重負荷環境での研究はほとんど行われてこなかった。通常、荷重下の骨組織は、Wolffの法則²に従って海綿骨梁が秩序を持って配列しており、これは荷重環境下におかれたインプラント周囲の骨組織に関しても同様であると考えられる。

近年、荷重に対する骨組織の反応には、骨細胞が極めて重要な役割を果たすことが報告されている。しかし、荷重環境下のインプラント周囲骨組織における骨細胞を含む骨関連細胞が、実際荷重に対してどのような影響を受けているかを解明した報告は国内外でほとんど認められず、オッセオインテグレーション獲得のためにどのような分子生物学的機序が働いているかは不明である。ところがインプラント研究以外の骨研究領域では、Bonewald LFらがマウス骨細胞の分離培養技術を確立³して以来、精力的に骨細胞の研究が行われ始め、近年では骨細胞が樹状突起を介して骨芽細胞と機能的に連絡すること⁴、骨髄に存在する破骨細胞前駆細胞に強力に働きかけて骨吸収を調節すること⁵、ならびに骨髄間葉系幹細胞に働きかけてその分化を調節することなどが次々と報告され、さらにマウスを用いた無重力再現実験では、骨細胞が荷重に対する感受性を有し、骨芽細胞へ情報を伝達

して骨産生を調節することが報告されている⁶。したがって骨細胞が骨代謝および荷重負荷に対し、中心的な役割を果たしていることが予想される。

2. 研究の目的

インプラント周囲骨の骨細胞が機械受容器として機能し、骨細胞、骨芽細胞ならびに破骨細胞の細胞挙動に影響を与えてオッセオインテグレーションの調節を行う、という仮説を立て、インプラントに対する荷重と骨形成/吸収の関係を、骨細胞を中心に文政生物学的ならびに組織化学的に解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

当初の研究計画

圧受容器としての骨細胞の機能と、各種細胞との相互作用を解明するため、以下の検索を行う計画であった。

- 1) ラット第一大臼歯部を抜歯してインプラントを埋入後、A. 荷重を加えない、B. 適切な荷重を加えた、C. 過大な荷重を加えた際のインプラント周囲骨における、
 - a) MicroCT 解析と組織形態学的解析による比較検討を行う。
 - b) 骨細胞と各種細胞の相互作用を示す特異的蛋白質を検出する免疫組織化学的手法による比較検討を行う。

- 2) ラットから骨細胞、骨芽細胞、ならびに破骨細胞をそれぞれ分離培養し、荷重による細胞動態の変化を解析し、さらには骨細胞との相互作用を、共培養で明らかにする。

実際に行った研究

研究を行っていく間に種々の問題点が発生したことから、それらを解決しながら研究

目的を達成するために、以下の方法で実際には研究を行った。

上記1)の *in vivo* 研究に関して

ラットを用いたインプラントの開発までには至ったが、ラット顎骨における解剖学的制約から埋入後のインプラント成功率が上昇せず、たとえ成功しても研究結果に影響を与える可能性が現時点では否定できなかったことから、家兔の脛骨を使用し、ヒトで使用するサイズのインプラントを埋入後、当講座が開発した荷重負荷試験装置で一定の荷重（規則的な繰り返し荷重）を加え、光学顕微鏡による組織形態学的解析、MicroCT による3次元構造解析、ならびに走査型電子顕微鏡による骨細胞の超微細構造学的解析を行った。

上記2)の *in vitro* 研究に関して

ラット骨芽細胞を頭蓋骨から分離培養し、さらに3次元培養を行って骨芽細胞を骨細胞様細胞へと分化させ、既成の荷重試験装置を用いて圧縮と進展刺激を付与後、荷重に関する各種遺伝子の発現変化と細胞の形態変化を定量解析した。

4. 研究成果

In vivo 研究⁷ [図とグラフは参考文献7（申請者らの研究業績論文）より引用]

(1) 規則的な繰り返し荷重は、骨 - インプラント接触率を増大させる。

規則的な繰り返し荷重は、骨 - インプラント接触率を有意に増大させたことから、オッセオインテグレーションが亢進されていることが分かった(図1、2)。

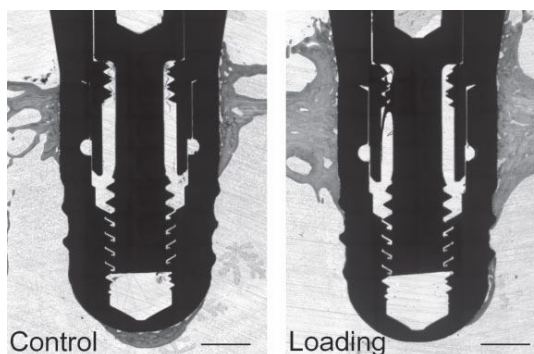
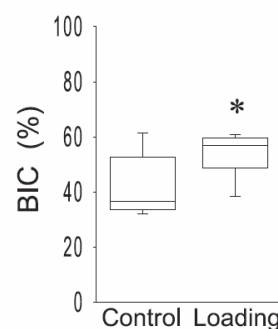


図1: 代表組織像(Control : 対照群、Loading : 荷重付与群)

図2: 骨 インプラント接触率 (BIC: 骨 - インプラント接触率、Control : 対照群、Loading : 荷重付与群)



(2) 規則的な繰り返し荷重は、インプラント周囲骨の骨構造を変化させる。

規則的な繰り返し荷重は、インプラント周囲骨組織の骨量と骨密度を有意に増大し、骨梁数を成熟させることが分かった(図3、4)。

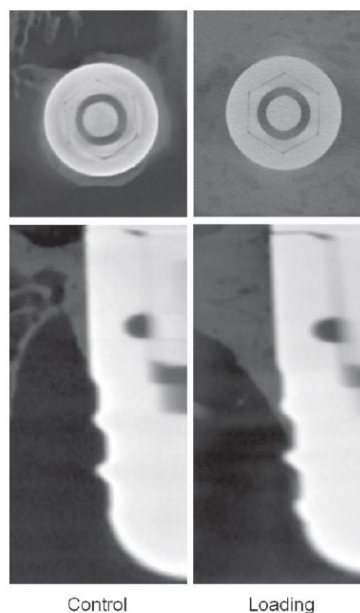


図3: MicroCT による代表撮影像 (Control : 対照群、Loading : 荷重付与群)

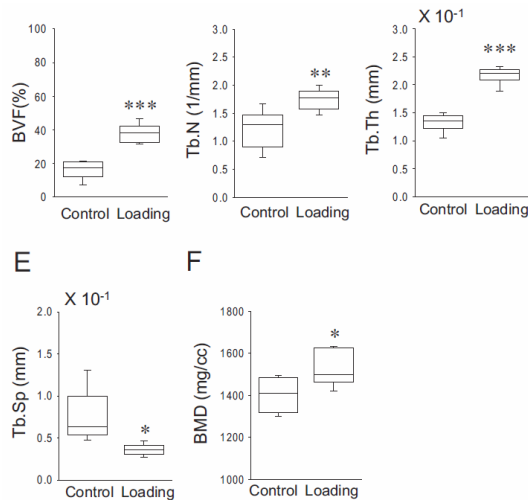


図 4 : MicroCT による 3 次元的構造解析結果 (Control : 対照群、Loading : 荷重付与群、BVF : 骨量、Tb.N : 骨梁数、Tb.Th : 骨梁厚さ、Tb.Sp : 骨梁間隙量、BMD : 骨密度)

(3) 規則的繰り返し荷重は、骨細胞数を増大させる。

規則的な繰り返し荷重は、単位面積当たりの骨細胞数を有意に増大させ、骨細胞ネットワークを発達させることが考えられた。

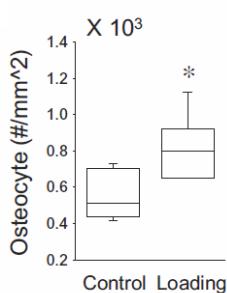


図 5 : トルイジンブルー染色の光学顕微鏡 (Control : 対照群、Loading : 荷重付与群、

上記 *In vivo* 研究の結果から、規則的な繰り返し荷重がもたらすオッセオインテグレーションの亢進と周囲骨組織の骨微細構造の改質をとまなう骨梁増大は、荷重によってもたらされた骨細胞ネットワークの増加が関与している可能性が示唆された。

In vitro 研究

(1) 3次元培養細胞は骨芽細胞を分化させる。

3次元培養がラット培養骨芽細胞に与える影響を検索するため、骨芽細胞と骨細胞の機能や分化に関する遺伝子の検索を行った。骨芽細胞特異的遺伝子 *Runx2* と *Alpl* の発現は2次元培養細胞で有意に高く、骨細胞特異的遺伝子 *Dmp1* と *SOST* の発現と *Tnfsf11* (RANKL の遺伝子名) の発現は、3次元培養細胞で有意に高かった。一方蛍光染色では、3次元培養細胞は2次元培養細胞とは全く形態が異なり、細胞突起を多数出し、一部は近接細胞との連結像を示し骨細胞様細胞の形態を示していた。以上から総合的に判断して、本実験条件で3次元培養した骨芽細胞は骨細胞様細胞に分化したことが分かった。

(2) 繰り返し荷重は骨細胞様細胞のアポトーシスとオートファジーに影響を与える。

荷重と骨細胞の反応性については未解明な部分が多いが、荷重が骨細胞の細胞死に与える影響についてはほとんど分かっていない。もし荷重が骨細胞の細胞死を抑制するのであれば、骨細胞ネットワークが増大し、長期間にわたって骨代謝をコントロールするのではないかと予想できる。

そこで今回は、規則的繰り返し荷重が、アポトーシスに関連する BCL と Caspase ファミリー、ならびにオートファジーに与える影響を検索した。荷重付与後 96 時間で、アポトーシスを促進する *Bcl2l11*、*Bak1*、*Casp7*、*Casp3* の発現が非荷重群と比較して有意に低く、オートファジー関連遺伝子のうち *Ulk1* の発現が有意に高かった。また蛍光染色による細胞定量解析の結果、荷重付与後 96 時間での骨細胞様細胞数は荷重群で有意に増加し、興味深いことに細胞極性は荷重の付与方向に一致する傾向を示していた。以上から、繰り返し荷重による骨細胞様細胞数の増加は、抗アポトーシス作用とオートファジーの活性化の両経路により制御されている可能

性が考えられ、さらには細胞極性にも影響することが示唆された。

以上の *In vivo* と *in vitro* 研究から、規則的な繰り返し荷重は、骨細胞ネットワークに影響を与え、しかも骨細胞を細胞死から遠ざけるように働くことで骨細胞ネットワークを増大させ、骨形成や骨微細構造の改質に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

<参考文献>

1. Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J, Babis GC. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskeletal Neuronal Interact* 2009; **9**: 61-71.
2. Chen JH, Liu C, You L, Simmons CA. Boning up on Wolff's Law: mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. *J Biomech* 2010; **43**: 108-118.
3. Kato Y, Windle JJ, Koop BA, Mundy GR, Bonewald LF. Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Res* 1997; **12**: 2014-2023.
4. Yellowley CE, Li Z, Zhou Z, Jacobs CR, Donahue HJ. Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 2000; **15**: 209-217.
5. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 2011; **17**: 1231-1234.
6. Lloyd SA, Lewis GS, Zhang Y, Paul EM, Donahue HJ. Connexin 43 deficiency attenuates loss of trabecular bone and prevents suppression of cortical bone formation during unloading. *J Bone Miner Res* 2012; **27**: 2359-2372.
7. Kuroshima S, Yasutake M, Tsuiki K, Nakano T, Sawase T. Structural and Qualitative Bone Remodeling around Repetitive Loaded Implants in Rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res* 2015; **in press**.

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2件)

1. Miyahara K, Watamoto T, Uto Y, Sawase T. Implant Dent. 2015 Apr [Epub ahead of print] (査読有)
2. Kuroshima S, Yasutake M, Tsuiki K, Nakano T, Sawase T: Structural and Qualitative Bone Remodeling around Repetitive Loaded Implants in Rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015 Mar 23. Doi: 10.1111/cid. 12318 [Epub ahead of print] (査読有)

[学会発表](計8件)

1. Kuroshima S, Sasaki M, Sawase T. Altered Osteocyte Communications under Mechanical Loading via Integrated Dental Implants in Rabbits. 93rd General Session & Exhibition of the IADR. 03/13/2015 (Boston, Mass, USA). Presentation number: #2599.
2. 佐々木宗輝, 黒嶋伸一郎, 澤瀬 隆. メカニカルストレスに対するインプラント周囲骨細胞の反応. 第22回顎顔面バイオメカニクス学会学術大会プログラム・抄録集. 平成26年11月22-23日, (株)UK デンタル長崎店(長崎県長崎市). Selected Oral Presentation.
3. 黒嶋伸一郎. 骨質評価が変えるオッセオインテグレーションの新展開 New perspectives in osseointegration by evaluating bone quality around dental implants. 日本口腔インプラント学会, 平成26年9月12日-14日, 東京ビックサイト(東京都江東区).
4. Kuroshima S, Nakano T, Yasutake M, Sasaki M, Sawase T. Mechanical repetitive loading enhances bone quality around dental implants in rabbits. The 9th congress of the Asian Academy of Osseointegration, AAO Program P59, p15, 2014. 07/04-05/2014 (07/04), Hokkaido, Sapporo, Japan.
5. 黒嶋伸一郎, 安武宗徳, 宮原健治, 中野貴由, 澤瀬 隆. 繰り返し荷重によるインプラント周囲骨組織の骨質向上. 第21回顎顔面バイオメカニクス学会学術大会プログラム・抄録集. 平成25年11月16-17日, 東京工業大学(東京都目黒区) Selected Oral Presentation.
6. Kuroshima S, Yasutake M, Ishimoto T, Nakano T, Sawase T. Repetitive loading enhances bone quantity and quality around implant in rabbits. European Association for Osseointegration, 22nd Annual Scientific Meeting 10/17-19/2013 (Dublin, Ireland). EAO Final Programme, p33, Presentation number #138.
7. 黒嶋伸一郎, 安武宗徳, 宮原健治, 中野貴由, 澤瀬 隆. インプラントの繰り返し荷重がもたらすオッセオインテグレーションの亢進と周囲骨組織の骨質向上. 日本口腔インプラント学会誌 第26巻

特別号 . 177 . 平成 25 年 9 月 13 - 15 日 ,
福岡国際会議場(福岡県福岡市).Selected
Oral Presentation

- 8 . 黒嶋伸一郎 , 安武宗徳 , 宮原健治 , 中野
貴由 , 澤瀬 隆 . 規則的荷重負荷で達成
されるオッセオインテグレーションと骨
微細構造の適応変化 . 日本補綴歯科学会
誌 5 . 122 回特別号 243 . 平成 25 年 5 月
18 日 19 日 , 福岡国際会議場 (福岡県福
岡市).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

産業財産権の名称 : 歯科インプラント用フィ
クスチャーおよび歯科インプラント

発明者 : 澤瀬 隆

権利者 : 同上

産業財産権の種類 : 特許出願

番号 : 特願 2014-240346

出願 (取得) 年月日 : 平成 26 年 11 月 27 日

国内 ・ 国外の別 : 国内

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 : なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

澤瀬 隆 (SAWASE , Takashi)

長崎大学 ・ 医歯薬学総合研究科 (歯学系) ・
教授

研究者番号 : 80253681

(2) 研究分担者

黒嶋 伸一郎 (KUROSHIMA , Shinichiro)

長崎大学 ・ 病院 (歯学系) ・ 講師

研究者番号 : 40443915

綿本 隆生 (WATAMOTO , Takao)

長崎大学 ・ 医歯薬学総合研究科 (歯学系) ・
助教

研究者番号 : 60420444