

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293408

研究課題名(和文) 骨質(コラーゲン)が骨代謝に及ぼす影響とそのメカニズムを探る

研究課題名(英文) Research on the Effect of Bone Quality (Collagen) on Bone Metabolism and Its Mechanism

研究代表者

魚島 勝美 (Uoshima, Katsumi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50213400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨組織のコラーゲンクロスリンク形成不全が骨芽細胞/破骨細胞の活性に及ぼす影響を解析するために、まず培養細胞を用いたIn Vitroの実験を行った。その結果、細胞培養系において、マトリックス中のクロスリンク量の減少は骨芽細胞の活性を上昇させ、破骨細胞の活性を低下させた。in vivoでは血清中骨形成マーカーは増加し、骨吸収マーカーは減少の傾向を示した。さらに、クロスリンク形成不全動物モデルによる骨移植実験とインプラント埋入実験を行ったところ、クロスリンク形成不全動物では移植骨周辺の骨形成がコントロールに比較して早く、埋入したインプラント周囲でも、比較的早期から未成熟な骨が大量に形成された。

研究成果の概要(英文)：An in Vitro experiment using cultured cells was first conducted in order to analyze the influence of bone tissue collagen crosslink formation failure on osteoblast / osteoclast activity. As a result, in the cell culture system, the decrease in the amount of crosslink in the matrix increased the activity of osteoblasts and decreased the activity of osteoclasts. Serum bone formation markers increased in vivo and bone resorption markers tended to decrease. Furthermore, bone grafting experiments and implant installation experiments using an animal model of cross link formation failure resulted in bone formation around transplanted bone faster than control. A large amount of immature bone was formed around the implants earlier than the control.

研究分野：補綴歯科学

キーワード：コラーゲン クロスリンク 骨質 骨移植 デンタルインプラント

1. 研究開始当初の背景

インプラントをはじめとした補綴治療の成否に密接に関連する骨強度は骨密度と骨質によって規定される。このうち骨密度については臨床的な意義が明確になっているのに対し、骨質についてはその定義や意義が未だ不明確で、骨質が生体においてどのような形で治療の結果やQOLに結びつくのかは解明されていない。特にインプラント治療の際には、患者の骨の状態が治療結果に直接結び付くという点で、骨代謝を把握し、これをコントロールすることの意義は大きい。骨質は骨代謝に影響を与える可能性が高く、これを理解することは臨床的に大きな意味を持つ。例えば、骨増成のゴールドスタンダードと考えられている自家骨移植の際には、移植骨の30%程度が吸収され、ドナーサイトとしてどの部位を選択するかによって、移植後の吸収率が異なるのも臨床的には良く知られるところである。この原因として骨質の関与が明確になれば、移植骨のドナーサイト選択の基準も明確に示される可能性がある。

骨質を規定する大きな要素として骨基質に含まれる有機成分の多くを占めるコラーゲンが挙げられるが(NIH コンセンサス会議2000)、コラーゲンの特性と骨代謝の関連についてはほとんど研究されていない。コラーゲン分子は複数で2次構造として架橋構造(クロスリンク)を構成することにより生体内で機能している。同一個体内でも組織によって、あるいは骨の部位によってもクロスリンクのあり方は異なるとされている。つまり、骨のクロスリンクが骨代謝に与える影響を検索することで、部位特異的な骨代謝の違いが理解できる可能性が高いということである。実際にインテグリンや、ある種のチロシンキナーゼ型受容体がコラーゲン分子をリガンドとして細胞内にシグナルを送るメカニズムも報告されている(Leitinger Bet al, 2003)

2. 研究の目的

骨組織代謝の制御メカニズムに関しては多くの報告があるが、いわゆる骨質の関与は明確にされていない。骨質はコラーゲン分子、微細構造や形態、石灰化などからなると考えられているが、未だ漠然としている。本研究では骨質の本態をコラーゲンの特性と捉え、そのクロスリンク(架橋構造)に注目して、これがどのように骨代謝に影響を及ぼすかを詳しく検索することを目的とする。本研究は以下の具体的な4つの課題から構成される。1. コラーゲンクロスリンクが骨芽細胞に与える影響の検索 2. 破骨細胞に与える影響の検索 3. 移植骨のコラーゲンクロスリンクがその生着・代謝に与える影響の検索 4. コラーゲン架橋構造の操作による新規人

工骨・生体材料の開発 この研究成果は骨移植や骨粗鬆症治療の臨床にとって大きな意義を持つ。

3. 研究の方法

(1) in vitro においてコラーゲンクロスリンクが骨芽細胞および破骨細胞に与える影響

MC3T3-E1(骨芽細胞)をコラーゲンクロスリンクの阻害剤であるaminopropionitrile(BAPN)存在下(0.5, 1, 2 mM)に2週間培養し、細胞を除去した後のプレート上に形成されたコラーゲンマトリックスをEPMA, HPLC, SDS-PAGEにて分析した。このマトリックス上に再度MC3T3-E1とRAW264.7(破骨細胞)を播種し、さらに2週間分化培地により培養して、それぞれの細胞の分化を検索した。

(2) in vivo においてコラーゲンクロスリンクが骨代謝に与える影響

マウスBAPNを含有する飼料を8週間与え、骨量の変化および血清中の骨代謝マーカー量の変化を検索した。

(3) in vivo においてコラーゲンクロスリンクが移植骨および周囲骨組織に与える影響

ラットに0.2%PABNを含有する水を4週間与え、その後に頭蓋骨から採取した骨片を移植する実験を行い、組織学的に検索した。下図の如く、BAPN投与ラットから正常ラットへ、正常ラットからBAPN投与ラットへ、BAPN投与ラットからBAPN投与ラットへ、正常ラットから正常ラットへ、の4種類で実験を行った(図1)。

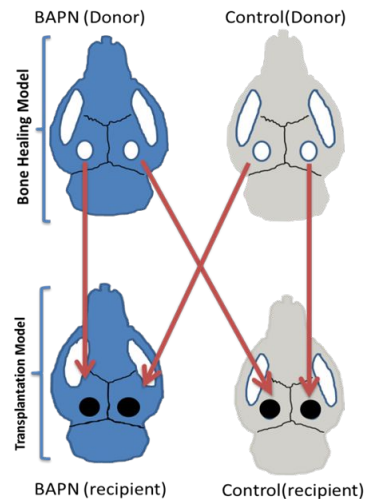


図1

(4) in vivo においてコラーゲンクロスリンクが埋入当初にインプラント周囲骨組織に与える影響

ラットに0.2%PABNを含有する水を4週間与え、その後頸骨に直径1.8mm、長さ2mmの純チタン製インプラントを埋入して、組織学的に検索した。

#### 4. 研究成果

##### (1)

細胞培養系において、マトリックス中のクロスリンク量の減少は骨芽細胞の活性を上昇させ、破骨細胞の活性を低下させた。特に2 mMの濃度でBAPNを加えた場合にこの効果が顕著であった。

##### (2)

クロスリンク形成不全動物モデルにおいて、BAPN添加は骨量に影響を及ぼさなかったが、血清中骨形成マーカーは増加し、骨吸収マーカーは減少の傾向を示した。

##### (3)

骨片を採取した後の骨欠損領域における骨形成

BAPN投与ラットでは術後1週間で未熟な骨組織が形成され、4週間後には欠損部分のほとんどの領域に骨が形成されていたのに対し、正常ラットでは4週間後にも欠損部に骨形成はほとんど見られなかった。

移植骨片周囲の骨形成

1週間後および4週間後ではBAPN投与ラットと正常ラットとの間に組織学的な差は見られなかったが、2週間後では、正常ラットの骨片をBAPN投与ラットに移植した場合、移植骨片が移植された側の頭蓋骨に生着している領域が多く見られた(図2)。このことから、in vivoにおいても、コラーゲンクロスリンクの減少が周囲での骨形成を促進する可能性が見出された。

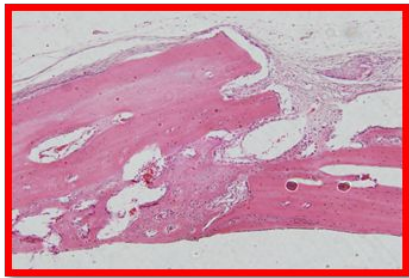


図2

##### (4)

BAPN投与ラット(図3B)頸骨に対するインプラント埋入では、正常ラット(図3A)

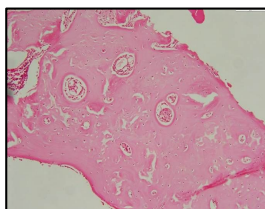


図3A

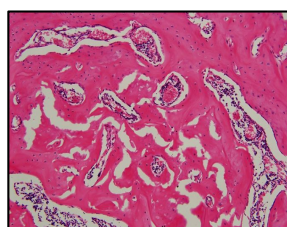


図3B

に比較してインプラント埋入部位から離れた部位での骨組織の代謝が活発であった。しかしながら、埋入したインプラント表面周囲での骨形成はBAPN投与ラットでは少なく(図4)、結果としてオッセオインテグレーションの成立には不利な状態であった。

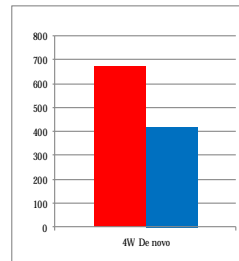


図4 BIC  
赤：正常ラット  
青：BAPN投与ラット

#### 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 0件)

[学会発表](計 6件)

井田貴子, 加来 賢, 北見恩美, JM Rosales Rocabado, 魚島勝美: 骨強度に重要なコラーゲン架橋の変化は骨代謝に影響を及ぼす, 第48回新潟歯学会 総会, 新潟, 2015年4月18日

Ida T, Kaku M, Rosales Rocabado JM, Uoshima K., Osteoblastic Differentiation of BMSCs on Different Degree of Enzymatic Collagen Crosslinks. International Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment, Lombok, Indonesia, Jan 10, 2016

井田貴子, 加来 賢, 北見恩美, JM Rosales Rocabado, 魚島勝美: コラーゲン・クロスリンクの変化は骨代謝に影響を及ぼす, 第47回日本結合組織学会学術大会, 東京, 2015年5月15日

井田貴子, 加来 賢, 北見恩美, JM Rosales Rocabado, 魚島勝美: コラーゲン架橋の変化は骨強度のみならず骨代謝に影響を及ぼす, 第124回日本補綴歯科学会学術大会, 大宮, 2015年5月30日

Suliman M, Nagasawa M, Mizushima K, Uoshima K: The influences of collagen

crosslink in bone matrix on adjacent tissue reactions. 第46回日本口腔インプラント学会学術大会, 名古屋, 2016年9月18日  
Suliman M, Nagasawa M, Alomari F, Uoshima K: Collagen quality might influence tissue response at implant site and surrounding tissues in vivo. 26th annual scientific meeting of the European association for osseointegration, Madrid, 2017. 10. 5-7.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

魚島 勝美 (UOSHIMA Katsumi)  
新潟大学大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 50213400

### (2) 研究分担者

加来 賢 (KAKU Masaru)  
新潟大学大学院医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号: 30547542

秋葉 陽介 (AKIBA Yosuke)  
新潟大学医歯学総合病院・講師  
研究者番号: 70547512

長澤 麻沙子 (NAGASAWA Masako)

新潟大学大学院医歯学総合研究科・助教  
研究者番号: 40612239

青柳 裕仁 (AOYAGI Yujin)  
新潟大学大学院医歯学総合研究科・助教  
研究者番号: 30460140

### (3) 研究協力者

Suliman Mubarak (MUBARAK Suliman)