

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462970

研究課題名(和文) 網羅的メタボローム解析によるインプラントリスクファクター検出法の確立

研究課題名(英文) Establishment of implant risk factor detection method by metabolome analysis

研究代表者

鈴木 泰明 (SUZUKI, HIROAKI)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10397812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント治療が普及する中、治療を行う上で様々なリスクファクターをかかえる患者が増えているが、手術の前にそれらを検出し、治療が上手く進められるのか明確に予測・評価し得る科学的指標は現在のところ存在しない。そこで、我々はラット顎骨を用いた新規のインプラント実験法を確立した上で、インプラント治療のリスクファクターとされる疾患モデルラット、本研究では骨粗鬆症ラットを作製して埋入実験を行った。解析の新たな手法として、これらのラットより採取した血液から分離した低分子代謝物をメタボローム解析に供し、これまでになかった新規バイオマーカー候補物質を同定することが出来た。

研究成果の概要(英文)：While implant treatment is becoming widespread, there are an increasing number of patients with various risk factors for treatment. However, there are currently no scientific indicators that can be clearly predicted and evaluated to detect them before surgery and whether treatment will proceed well. Therefore, we first established a novel implant experiment method using the rat mandible, and then produced a disease model rat (in this study, osteoporotic rats), which is considered to be a risk factor of implant treatment and carried out an implantation experiment. As a new analytical method, low molecular metabolic product separated from the blood of these rats were provided for metabolome analysis. As a result, we were able to identify substances that are likely candidates for novel biomarkers.

研究分野：口腔外科学

キーワード：歯科インプラント リスクファクター メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

近年、歯科臨床においては歯牙欠損部位に歯科用インプラントを埋入することが多くなってきたり、咀嚼機能の回復を図るうえで、高い予知性を有するインプラント治療は揺るぎない地位を占めるようになってきた。その反面、義歯やブリッジと比較して、インプラント体自体に脱落を生じると、患者とのトラブルにつながりやすく、実際そのような事例は増加してきている。これには、様々なリスクファクターの存在により、結果としてインプラント治療を失敗させてしまうケースも相当あるからと思われる。治療に対する知識、技術の不足といった術者側のリスクファクターは、個々の能力や習熟度も関係するため普遍的評価を与えることは困難である。一方で患者側の因子として、全身的・局所的にリスクになるとと思われる疾患や病態を有する者には術前に血液・尿検査などの一般臨床検査で精査がなされ、その判断を行っている。しかしながら、これら臨床検査の真の意味合いは口腔外科手術によって全身状態の悪化を生じないか評価するためのものであり、インプラント治療の特殊性、すなわち異物として顎骨に埋入されるインプラント体の骨結合（以下 osseointegration）の獲得・維持を妨げるリスクファクターを見極めるためのものでは決していない。

これまで osseointegration に関する研究は、国内外多数の研究者により基礎的臨床的に様々な報告がなされ、その獲得・維持を妨げるリスクファクターに関する研究も進んできているが、患者側の全身的・局所的因子が実際どのようなレベルにあればリスクと成り得るのか、明確な指標を示した研究はこれまで見当たらない。そこで、本研究では osseointegration に負の影響を与えることが従来より危惧されている全身的、局所的因子をリスクファクターとして研究対象に取り上げ、その検出に新たな視点となるメタボローム解析を取り入れることを着想した。

近年、質量分析装置の発達に伴い、臨床現場で入手される体液や組織中の微量な蛋白質、ペプチドが高感度に解析できるようになった。生体内には有機酸、アミノ酸など多くの低分子が存在し、その種類は数千種にのぼる。これらは、生命の様々な代謝活動により作り出された代謝産物であり、この代謝産物の網羅的分析が非常に重要となっている。当初は代謝活動の活発な各種がんの早期診断に関する研究への応用からその解析が始まり、我々も、口腔がん早期発見スクリーニング法の開発を目指して研究を開始した。この成果として、従来の腫瘍マーカーよりも高い感度を示す数種類のバイオマーカー候補物質を選定、精度の高い新規口腔がんスクリーニング法構築の可能性を論文にまとめて報告した。

最新のメタボローム研究の流れとして、がん以外の様々な炎症性疾患や各種代謝性疾

患などにもその解析の裾野は広げられ注目を集めていることから、我々はインプラントのリスクファクターとされる疾患に対しメタボローム解析を用い、osseointegrationを阻害する特異的バイオマーカーを同定、インプラント治療の術前にリスクファクターとなる疾患をこれまでの臨床検査値とは異なる指標で評価出来るか、研究を進める。

2. 研究の目的

本研究は、インプラント治療を進めるにあたってリスクファクターとされる疾患に対し、メタボローム解析という全く新たな手法を適用することで、インプラント体と骨との osseointegration を阻害する特異的バイオマーカーを同定し、簡便で確実なインプラント術前のリスクファクターの検出・評価・診断システムの確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、予備実験の段階で今後の研究遂行の基盤となるラット顎骨を用いた新規のマイクロインプラント体埋入実験法をまず確立し、次に、糖尿病、歯周病、骨粗鬆症の各種疾患モデルラットを用いた埋入実験およびメタボローム解析により、最も解析感度の特異性を有していた下記、骨粗鬆症モデルラットに絞って研究をさらに進めることとした。

実験に供した動物は、雌の Wistar 系ラットで、その卵巣を摘出して 8 週間飼育・経過させたラットを骨粗鬆症モデルラット群（下記(1)の詳細を参照）とし、卵巣摘出なしの群をコントロール群とした。

(1) 骨粗鬆症モデルラット作製

雌 Wistar 系ラット（250-350g、6-8 週間程度）に 27G 注射針を用いて塩酸メドミジン（0.15mg/kg）+ ミダゾラム（2mg/kg）+ ブトルファノール（2.5mg/kg）による腹腔内麻酔を行った後、背部皮膚（腎臓相当部のやや腰部寄り）、広背筋～胸腰筋部を 5mm 程度切開、ゾンデにより卵巣を引っ張り出し卵巣-子宮結合部を結紮、卵巣部を摘出した。切開部は生食で洗浄後、筋層、皮膚の順に縫合して切開部位を閉創。術後は鎮痛目的にブレンロフィン（0.15mg/kg）を 1 日 2 回、12 時間ごとに 2 日間、皮下注射にて投与した。

(2) マイクロインプラント体の埋入実験

卵巣摘出を行わなかったコントロール群のラットとともに、上記(1)で卵巣摘出した骨粗鬆症モデルラットを術後 8 週間飼育し、各群のラットへ 27G 注射針による塩酸メドミジン（0.15mg/kg）+ ミダゾラム（2mg/kg）+ ブトルファノール（2.5mg/kg）での腹腔内麻酔下、局所鎮痛を目的に 27G 注射針にて 8 万分の 1 エピネフリン含有 2% リドカイン（4mg/kg）をインプラント埋入部歯肉に注射投与した。この時点で、術前（インプラント体埋入前）のメタボローム解析用の試料として尾部より採血（ラットを固定し部分的に尾

を温める。尾の両側にある尾静脈に27G針を刺入し、尾をしごくことにより1~1.5mlを目標に採血を実施。

局所麻酔の奏功後に前歯(切歯)~臼歯部の歯間空隙に歯肉粘膜切開を加え、生理食塩水を滴下しながら直径1.0mmサイズのスチールバーでインプラント埋入窩を形成、ドライバーでマイクロインプラント体を埋入し、5-0 ナイロン糸にて縫合、処置を終了。埋入後は鎮痛のためブプレノルフィン(0.15mg/kg)を1日2回、12時間ごとに皮下注射で2日間投与した。

埋入から8週間待機の後、27G注射針を用い塩酸メドミジン(0.15mg/kg)+ミダゾラム(2mg/kg)+ブトルファノール(2.5mg/kg)による腹腔内麻酔を実施し、術後のメタボローム解析試料として尾部から採血を行った。



尾静脈からの採血



骨粗鬆症ラット作製(卵巣摘出)



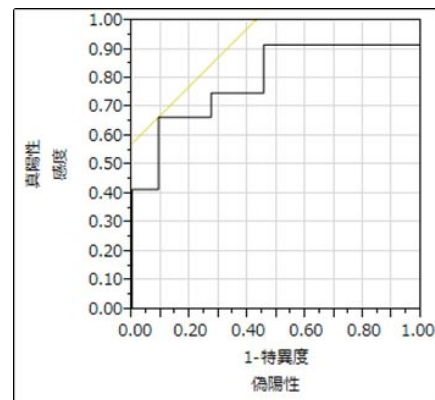
マイクロインプラント体の埋入

4. 研究成果

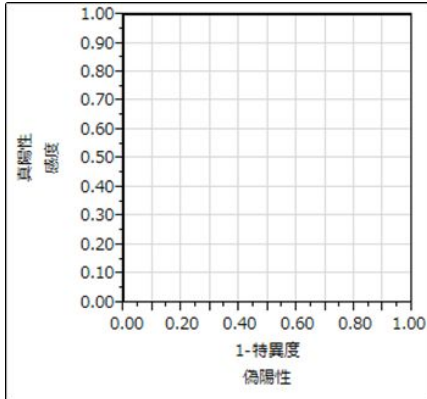
GC/MSにより、約100種類の水溶性代謝物の同定が可能であった。卵巣摘出群とコントロール群とを比較した結果、Pyruvate+Oxalacetic acid、Lactic acid、Glycolic acid、Alanine(2TMS)_Major、2-HydroxyButyrate、2-Aminoisobutyrate、3-Hydroxy-Butyrate、2-Aminobutyric acid、2-Aminoethanol、Glycerol、Phosphate、Glycine(3TMS)_Major、Succinic acid(or aldehyde)、Serine(3TMS)_Major、Threonine(3TMS)、b-Alanine、Hydrocinnamate、Malic acid、Pyroglutamic acid、b-Glutamic acid、Glutamic acid、p-Hydroxybenzoic acid、Xylose_2_Major、Lauric acid、Ribose、Taurine、Xylitol、Phthalic acid、Rhamnose_1_Major、Ribitol、Aconitate、Glutamine(3TMS)、Methoxy-4-Hydroxyphenylacetate、O-Phosphoethanolamine、Citric acid + Isocitric acid、Ornithine、Citrulline、Tagatose_2(or Psicose_2)_Major、Fructose_2_Minor、Mannose_1_Major、Glucose_1_Major、Galactose_2_Minor、Lysine(4TMS)_Major、Gulcono-1,4-lactone、Galactosamine_1_Major、Glucuronate_1_Major、Cysteic acid、1-Hexadecanol、Palmitoleate、Inositol、Dopa、Uric acid、N-a-Acetyl-L-Lysine_2_Major、Heptadecanoate、Tryptophan、Cysteine+Cystineにおいて、統計学的に有意な差が認められた。そのうち、骨粗鬆症患者でこれまでに報告されている結果と合致するものが次のように得られた。骨粗鬆症下において、3-hydroxybutyric acidが優位に上昇、Lysine、alanine、citric acid、succinct acidが優位に減少していた。

5種類のバイオマーカー候補物質のROC曲線を下図に示す。

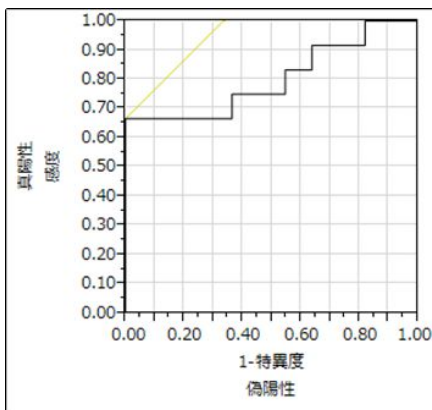
3-Hydroxy-Butyrate



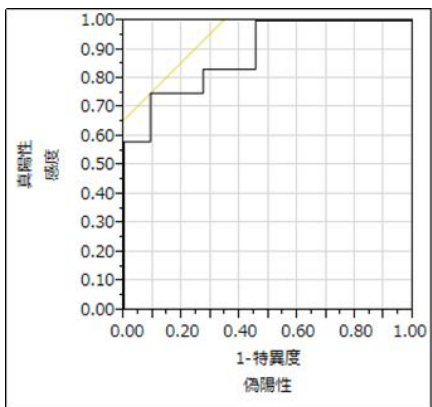
Lysine(4TMS)_Major



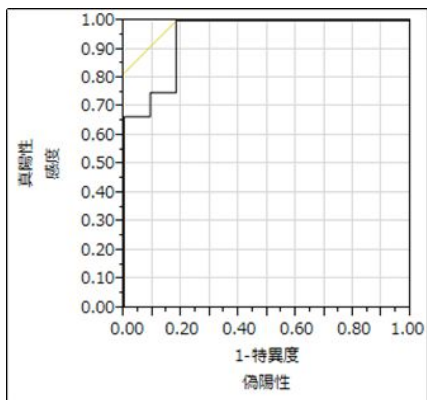
Alanine(2TMS)_Major



Citric acid + Isocitric acid



Succinic acid(or aldehyde)



この結果、それぞれの代謝物の感度は、下表に示すように 66.7~100%と高い値を示し、骨粗鬆症患者でのリスクファクターを考える上で、臨床検査値とは異なる新たなバイオ

Compounds	Sensitivity
3-Hydroxy-Butyrate	66.7
Lysine(4TMS)_Major	100
Alanine(2TMS)_Major	66.7
Citric acid + Isocitric acid	75.0
Succinic acid(or aldehyde)	100

マーカーとなり得る可能性が示唆された。

今後は、さらに実用化に向けてメタボローム解析と他の分子生物学的解析結果との一致性を検討しながら、詳細に研究を行っていく予定である。

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 4 件)

Takahashi D, Suzuki H, Komori T. A clinical study of 103 dental implants in oral cancer patients after jaw resection. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology. 査読有, 2018, 30, 206-211.

Suzuki H, Takahashi D, Matsuo K, Kimoto A, Matsumoto K, Hasegawa T, Akashi M, Komori T. Clinical study of 19 cases resulting in dental implant removal. Kobe J. Med. Sci. 査読有, 2016, 61, 4:E102-108.

Suzuki H, matsumoto K, Enomoto Y, Kakei Y, Akashi M, Komori T. Clinical analysis of change in bone mass following sinus floor elevation. Oral Science in Japan, 2015. 査読無, 2015, 1, 79-82.

Enomoto Y, Suzuki H, Kakei Y, matsumoto K, Kimoto A, Komori T. Clinical study of implant treatment for diabetic patients. Oral Science in Japan, 2014. 査読無, 2014, 1, 49-50.

[学会発表](計 2 件)

鰐淵聡, 鈴木泰明, 榎本由依, 寛康正, 木本明, 近津大地, 古森孝英. 血漿メタボローム解析を用いた骨粗鬆症ラット特異的なバイオマーカーの同定. 第63回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 2018年11月2-4日予定, 幕張メッセ(千葉県).

Suzuki H, Takeuchi J, Matsuo K, Kakei Y, Kimoto A, Hasegawa T, Akashi M, Chikazu D, Komori T. A clinical study of injured

patients treated with dental implants.
The 23rd European Association for cranio
Maxillo-facial Surgery(EACMFS),
2016.9.13, London(UK).

〔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

鈴木 泰明(Suzuki, Hiroaki)
神戸大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10397812

(2)研究分担者

近津 大地(Chikazu, Daichi)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：30343122

(2)研究分担者

木本 明(Kimoto, Akira)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30597167

(2)研究分担者

古森 孝英(Komori, Takahide)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：50251294

(2)研究分担者

浅井 知子(Asai, Tomoko)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90533745