

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462977

研究課題名(和文) 終末糖化産物(AGEs)はインプラントのリスク評価に有用か

研究課題名(英文) Does Advanced Glycation End products (AGEs) is useful for risk management of implant treatment ?

研究代表者

佐々木 穂高 (Sasaki, Hodaka)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：50433959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：終末糖化産物(AGEs)の蓄積が、骨質低下に影響することが知られている。しかし、AGEsが骨結合が重要となるインプラント治療に影響するかについては知られていない。本研究は、糖尿病モデルラットを用いてインプラントとAGEsの関係を明らかにすることである。対照群と比較して、実験群では、骨欠損部やインプラント周囲の新生骨量に著明な違いは認められなかった。しかし、実験群ではインプラント頸部皮質骨にAGEsの局在発現を認めた。本研究の結果から、AGEsの蓄積は早期のオッセオインテグレーションには影響を及ぼさなかったが、インプラント頸部が炎症の起点となることから長期的な予後に関与する可能性が示唆された。

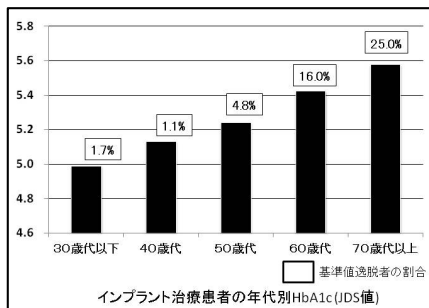
研究成果の概要(英文)：Recently, Advanced Glycation End products (AGEs) known to accumulate in bone collagen by diabetes mellitus was reported to have a relationship with reduction of bone quality. However, it was not clarified the correlation between accumulation of AGEs and implant treatment success due to established osseointegration. The aim of this study was to investigate the effect of accumulation of AGEs during osseointegration using diabetes mellitus model rats. There were no significant differences between new bone formation in the bone defect area and around implant body of experimental group and those of control groups. On the other hands, positive immunoreaction of AGEs was recognized at the implant neck area of cortical bone in experimental group. From those result, accumulation of AGEs does not have relationship with early stage of osteointegration. However, AGEs is suggest to effect the long-term success rate, because implant neck area was known to be starting point of peri-implantitis.

研究分野：口腔インプラント

キーワード：インプラント 終末糖化産物 糖尿病モデルラット AGEs

1. 研究開始当初の背景

近年、インプラント治療患者の高齢化に伴い、様々な合併症が問題となっている。特に、インプラント治療の成功には、骨組織とのオッセオインテグレーション(骨結合)の獲得・維持が重要となることから、加齢に伴う骨代謝異常によって発症する“骨粗鬆症”は、インプラント治療のリスクとなることが示唆されている。骨粗鬆症は“骨密度(BMD)”の低下だけでなく“骨質”の低下が関与することが知られており、骨折のリスク因子の一つとして知られている。骨質の低下に関与する因子として、骨芽細胞の機能低下などの骨代謝関連以外に、コラーゲンの**終末糖化産物(AGEs)**の蓄積の関与が注目を浴びている。AGEsは、生体内における非酵素的な糖化反応(Glycation)によって生成される最終生成物である。このAGEsは、特異的に認識されるAGEs受容体を介して腎臓、肝臓、皮膚、眼、血管などの老化に関与することが報告されている。一方、骨組織に対してAGEsは、骨芽細胞の機能低下やコラーゲン分子への脆弱な架橋=非生理的架橋(ペントシジン)が形成されることで、骨折のリスクが増加することが知られている。東京歯科大学口腔インプラント科において術前に行った臨床検査で、糖尿病の指標であるHbA1c値(JDS値)は患者の年齢とともに増加し、70歳代で2割以上が基準値を逸脱していた(下図)。



このことから、これらの患者の顎骨組織にはAGEsが蓄積し骨質が低下していることで、好中球の機能低下や創傷の治癒不要だけでなく、骨組織レベルにおいてもインプラント治療に対するリスクが高くなっていると考えられる。しかしながら現在までに、AGEsの発現・蓄積がインプラントにおけるオッセオインテグレーション(骨結合)に対してどのように影響するかについては、報告がなされていない。そこで本研究では、AGEsの蓄積が骨欠損治癒やインプラント治療に予後に影響するかについて、検討することにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病患者の骨組織における**AGEsの蓄積がインプラント治療のリスク評価に有用**となるかを明らかにすることである。

将来的にヒトを対象とした評価を行なえるように、本研究ではストレプトゾシン(STZ)投与による**型糖尿病モデル動物**を用いて、骨梁構造 骨治癒過程 インプラント埋入後のオッセオインテグレーションの3項目について、比較・検討を行った。

3. 研究の方法

1) 糖尿モデルラット作成方法の確立と大腿骨骨梁構造の評価

実験群である糖尿病モデルを作成する為に、SD系ラット(雄性・4週齢)に対してストレプトゾシン(STZ)を腹腔内(70 mg/kg)もしくは尾静脈内(65 mg/kg)を投与、対照群には生理食塩水を投与した。投与後4週間まで、血糖値の計測ならびに大腿骨骨頭のマイクロCT撮影を行った。

2) 骨欠損モデルによる骨治癒過程の評価

1)の実験結果より、実験群には、STZの尾静脈内投与(65 mg/kg)を行って2週後に、血糖値が300mg/dl以上であったものを用いた。全身麻酔下にて、大腿骨に直径0.8 mmのラウンドバーにて、反対側皮質骨に到達するまでの骨欠損を形成し、術後4週までマイクロCT撮影ならびに病理組織学的評価のための試料採取を行った。

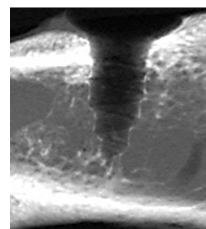
3) インプラント埋入によるオッセオインテグレーションの評価

2)の実験方法に準じて骨欠損を形成後、直径、1.55 mm; 長さ、4 mmのチタン製スクリーを埋入し、術後4週までマイクロCT撮影、病理組織学的評価のための試料採取ならびに心臓採血を行った。

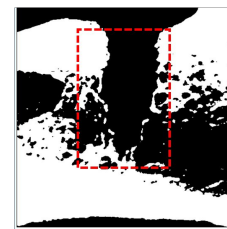
a) マイクロCTによる評価

マイクロCT撮影前に埋入したインプラントをドライバーにて除去した。インプラント中心軸より2mmを関心領域とし、二値化した後に計測を行った(下図参照)。

マイクロCT



二値化データ



b) 病理組織形態学的な評価

脱灰後にインプラントをドライバーにて除去し、通法に従ってパラフィン切片を作成しH-E染色後に観察した。

c) 免疫組織化学染色によるAGEsの発現・局在の評価

b)にて作成した薄切標本とAGEs抗体を用いて、蛍光免疫組織化学染色を通法に従って行い観察した。

d) 血清中AGEs量とインプラント周囲骨形成との相関性評価

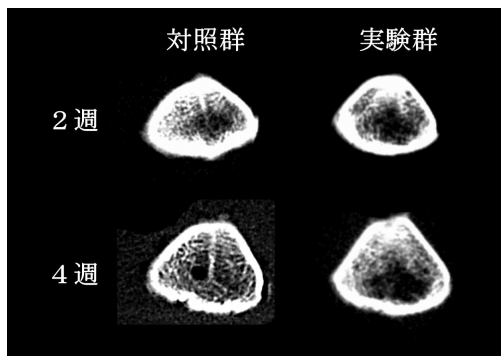
採血した血清からELISA法にて定量したAGEsとインプラント周囲骨形成量を線形回帰分析にて評価した。

4. 研究成果

1) 糖尿モデルラット作成方法の確立と大腿骨梁構造の評価

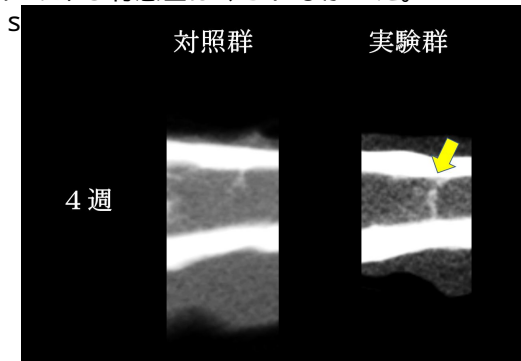
STZ 投与 1 週後で腹腔内投与群、尾静脈投与群のいずれも 75%以上が血糖値 300mg /dl 以上となり、投与後 4 週間で 90%以上が最大測定値 500 mg/dl 以上を示した。一方で対照群は継続的に血糖値が上昇したが、全て 300 mg/dl 以下であった。

大腿骨頭部のマイクロ CT 所見では、投与後 2 週から実験群は対照群と比較して、骨梁が少なる傾向がみられたが、骨梁構造解析において骨量単位 (BV/TV)、骨梁幅 (Tb.Th)、骨梁数 (Tb.N) いずれも有意な差は認められなかった。



2) 骨欠損モデルによる骨治癒過程の評価

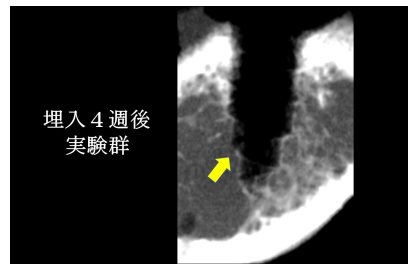
術後 2 週例より対照群、実験群ともに骨欠損部海綿骨領域に新生骨による不透過像が認められた。術後 4 週例では、対照群では新生骨の骨梁構造が消失したのに対して、実験群では新生骨による不透過像が残存 (下図矢印) している割合が高かった。骨梁構造解析における有意差はみられなかった。



3) インプラント埋入によるオッセオインテグレーションの評価

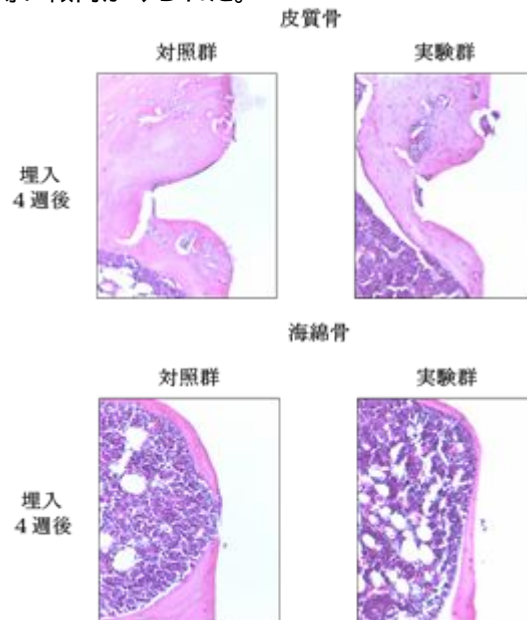
a) マイクロ CT による評価

インプラント埋入 2 週後では、対照群・実験群ともにインプラント周囲には皮質骨内面から連続した新生骨梁の形成が認められた。埋入 4 週後では、対照群・実験群ともに一部の新生骨梁が消失、インプラントの形状に沿った連続的な骨形成が観察された (右上図矢印)。二値化後の関心領域における新生骨量は、経時的な減少がみられたが両群間での有意差は認められなかった。



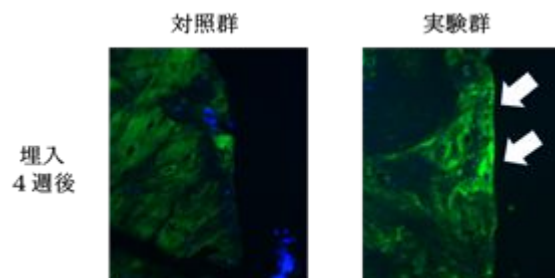
b) 病理組織形態学的な評価

埋入 2 週後では、対照群・実験群ともに内骨膜からインプラント周囲に沿って形成された幼弱な新生骨が認められた。インプラント周囲の新生骨は経時的に緻密化し、埋入 4 週後では両群ともに層板構造を呈した成熟骨となっていた。対照群では、インプラント周囲骨の表層にも骨小腔に細胞を伴った骨構造がみられたのに対し、実験群では細胞成分が乏しい無定形構造を呈した部位が多い傾向がみられた。また、海綿骨部のインプラント周囲骨は対照群と比較して実験群では薄い傾向がみられた。



c) 免疫組織化学染色による AGEs の発現・局在の評価

AGEs 抗体による免疫組織化学染色では、対照群では既存骨、新生骨の殆どに陽性像が認められなかった。一方、実験群では、既存骨の基質に弱い陽性反応がみられるとともにインプラント頸部の皮質骨表層に強い陽性像 (下図矢印) が観察された。



d)血清中 AGEs 量とインプラント周囲骨形成との相関性評価

血清中の AGEs 値は、実験群の方が対照群よりも高い傾向がみられた。しかしながら、インプラント周囲骨形成量と血清中の AGEs 値に正ならびに負の相関関係は認められなかった。

4) 考察

本研究では、糖尿病モデルラットにおける終末糖化産物(AGEs)の蓄積が、早期のオッセオインテグレーションの成立に対しては大きく影響を及ぼさなかった。しかしながら、糖尿病群ではインプラント頸部の骨表層に AGEs の蓄積が認められ、同部がインプラント周囲炎の起点となることから、長期的なインプラント予後に対して、関与することが示唆される。今後は、オッセオインテグレーションの長期的な維持やインプラント周囲炎との関連性を明らかにすることで、終末糖化産物の蓄積評価が、インプラントの長期的予後の有効な評価方法になると考えられる。

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3件)

Monden K, Sasaki H, Yoshinari M, Yajima Y
Effect of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) with different frequency on bone defect healing
Journal of Hard Tissue Biology, 24(2):189-198
2015.4

Ohira T, Tanabe K, Sasaki H, Yoshinari M, Yajima M
Effect of locally applied fluvastatin in low-turnover osteoporosis model mouse with femur bone defect
Journal of Hard Tissue Biology 24(2):147-154
2015.4

Matsuda H, Fufuya F, Sasaki H, Takanashi T, Morioka T, Miura T, Yoshinari M, Yajima Y
Comparison of Surface Morphology and Healing in Rat Calvaria Bone Defects between Ultrasonic Surgical Method and Rotary Cutting Method
Journal of Hard Tissue Biology 24(3):267-276
2015.7

[学会発表](計3件)

小林孝誌, 佐々木穂高, 真壁康, 法月良江, 矢島安朝

インプラント治療患者における糖代謝検査と骨代謝マーカー検査の比較検討

第 45 回日本口腔インプラント学会学術大会

森田純晴, 松永智, 佐々木穂高, 矢島安朝, 阿部伸一

骨粗鬆症モデルマウスにおける顎骨および脛骨の形態変化

第 45 回日本口腔インプラント学会学術大会

中野遼太郎, 佐々木穂高, 中島孝輔, 小林孝誌, 真壁康, 法月良江, 古谷義隆, 矢島安朝
インプラント治療患者における糖代謝検査と骨代謝マーカー検査の比較検討

第 19 回日本顎顔面インプラント総会・学術大会

Takahashi Y, Sasaki H, Yajima Y, Yshonari M
The Effects of Fluvastatin on Bone Marrow Cells of Senescence Accelerated Mouse (SAMP6)

93rd General Session & Exhibition of the IADR

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 穂高 (SASAKI, Hodka)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：5 0 4 3 3 9 5 9

(2)研究分担者

松永 智 (MATSUNAGA, Satoru)

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：7 0 4 5 3 7 5 1

大野 建州 (ONO, Tatsukuni)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：8 0 4 3 5 6 3 5

(3)連携研究者

守 源太郎 (MORI, Gentaro)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：3 0 7 3 3 7 4 5

(4)研究協力者

小林 孝誌 (KOBAYASHI, Takaumi)

東京歯科大学・歯学部・大学院生