

# 学位論文内容の要約

愛知学院大学

甲 第 672 号	論文提出者 鳥居 亮太
論文題目 チタン上で培養した非肥満型2型糖尿病ラット骨髄 由来骨芽細胞様細胞の増殖、分化に関する研究	

## I. 緒言

歯科医療における欠損補綴の選択肢としてのインプラント治療は、インプラント表面構造の研究によりインプラント体へのオッセオインテグレーションが効果的に獲得できるようになり、近年インプラント治療の需要は増えてきている。これに伴い、適応症例の拡大や、困難な症例での良好な予後が求められるようになってきた。糖尿病はインプラント治療のリスクファクターであり、健常者に比べオッセオインテグレーションの獲得が難しくインプラント治療が困難と言われている<sup>1)</sup>。また、糖尿病は骨の治癒不全を起こすことが知られており<sup>2-6)</sup>、糖尿病患者のインプラント治療の成功率は正常患者よりも低いと報告されている<sup>7,8)</sup>。しかしながら、他の報告ではインプラント治療の予後不良において糖尿病との関連はないとも言われている<sup>9,10)</sup>。

現在、日本人の中で“糖尿病が強く疑われる人”と“糖尿病の可能性を否定できない人”の数は、それぞれ約890万人と約1,320万人であると報告されている<sup>11)</sup>。糖尿病はインスリンの絶対的あるいは相対的不足によって起こる代謝性の疾患である。糖、炭水化物をはじめとして脂質、タンパク質の代謝不全をきたし、神経障害、網膜症、腎症などの全身合併症を引き起こす。1型糖尿病（インスリン依存型糖尿病）は、自己免疫機序で膵β細胞が破壊され、絶対的なインスリンの不足をきたし発症する。2型糖尿病（インスリン非依存型糖尿病）は、遺伝因子を背景に、生活習慣の影響を受け、インスリン分泌の低下とインスリン感受性の低下が起こり、結果としてインスリンの相対的な不足をきたして発症すると報告されている<sup>12-14)</sup>。また、2型糖尿病は成人発症糖尿病とも呼ばれ、日本人糖尿病患者の90～95%を占めている。

オッセオインテグレーションの獲得には骨芽細胞の増殖と分化が関わっているが、糖尿病が骨芽細胞の増殖や分化におよぼす影響については、未だ不明な点が多い。そこで、チタン上における骨髄由来骨芽細胞様細胞の増殖、分化におよぼす糖尿病の影響を検索する目的で、2型糖尿病疾患モデルであるGoto-Kakizaki (GK)ラットと、対照としてWistar/STラットを使用して実験を行った。GKラットは東北大学の後藤・柿崎らが2型糖尿病は多因子(ポリジーン)疾患であるという作業仮説のもと、Jcl:Wistarラットを用いて経口ブドウ糖負荷試験を行い、耐糖能の低下している個体による選抜交配を重ねることによって確立された系統<sup>15)</sup>であり、日本人に多い非肥満型2型糖尿病のモデルとして広く使用されている<sup>16-20)</sup>。現在までにGKラットの骨形態および代謝異常についてはいくつかの報告がみられるが<sup>21-26)</sup>、間葉系幹細胞由来骨芽細胞様細胞を用いたチタン上での増殖、分化に関する報告はほとんどみられない。

本研究では、GKラット大腿骨から間葉系幹細胞を採取し、低グルコースの $\alpha$ -MEM培養液を用いて分化させた骨芽細胞様細胞をチタンディスク上で培養し、その増殖能および分化能について検討を行った。チタンは、機械研磨、硫酸処理、フッ化水素酸処理の3種類の異なる表面を用い、チタンの表面性状が2型糖尿病骨芽細胞様細胞に及ぼす影響について分析を行い、糖尿病患者へのインプラント治療の可能性について病理生化学的に検討した。

## II. 材料および方法

### 1. チタンディスクと表面処理

チタン(西村金属、鯖江、日本)は厚さ1 mm、直径20 mmの第2種純チタンディスク(機械研磨)を使用した。また機械研磨に67%硫酸を

120℃、75秒間反応させ酸処理を行ったもの（硫酸処理）と、40%フッ化水素酸を室温、30秒間反応させ酸処理を行ったもの（フッ化水素酸処理）を用いた。

3種類のチタンディスクの表面性状は、白金スパッタコーティングにて蒸着し、走査型電子顕微鏡（SEM）（JXA-8530FA、日本電子、東京、日本）を用いて観察を行った。

## 2. 細胞培養

8週齢雄性GKラット（SLC、浜松、日本）（糖尿病群）、および同週齢の雄性Wistar/STラット（SLC）（対照群）を用い、エーテル吸入麻酔下にて屠殺し、大腿骨からSaruwatariら<sup>27)</sup>の方法で間葉系幹細胞を採取した。採取した細胞は $\alpha$ -MEM Basal medium（低グルコース）（Gibco、California、USA）に $10^{-6}$  M Dexamethasone（Sigma、Missouri、USA）、1 M  $\beta$ -Glycerophosphate（Sigma）、5 mg/ml Ascorbic acid（Sigma）、0.85% Antibiotic-Antimycotic（Gibco）、15%ウシ胎児血清（FBS）（Biowest、Nuaille、France）を加えた分化誘導培地を用いて37℃、5%CO<sub>2</sub>下のインキュベータで直径100 mmのシャーレを用いて培養を行った。その後、80%コンフルエントになったところで継代を行い、培養7日目にポリスチレン製の12 well細胞培養プレートに3種類のチタンディスクを置き、細胞を $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>の濃度で播種して培養を行った。

## 3. 血糖値の測定

屠殺前に対照群と糖尿病群のラット尾静脈より血液を採取し、血糖試験測定器 (メディセーフ®ミニGR-102、TERUMO、東京、日本) にて血糖値を測定した (n=4)。

#### 4. 細胞数

培養1、3日目に培養液を除去しPBSで洗浄後、0.1%コラゲナーゼ (Sigma)、0.25%トリプシンEDTA溶液を加え、37°Cで15分間放置して細胞を剥離させ、15 ml コニカルチューブ (TPP、Trasadingen、Switzerland) に入れた後、1,500 rpmにて遠心分離させた。培養液を加えて懸濁した後、細胞懸濁液を血球計算盤に滴下し、位相差顕微鏡を用いて細胞数を計測した (n=3)。

#### 5. Alkaline Phosphatase (ALP) 染色

培養3、7、14日目に培養液を除去しPBSで洗浄後、基質として0.9 mM Naphthol AS-MX Phosphate (Sigma)、染色液として1.8 mM Fast Red TR (Sigma) を120 mM Tris buffer (pH 7.6) に溶解した染色液を用いて37°Cで30分間反応させた。染色後のチタンディスクをデジタルカメラ (IXY DIGITAL 820IS、Canon、東京、日本) で撮影し、得られた画像データについてImageJ (NIH、Bethesda、USA) を用いて解析し、染色された面積率をもって陽性率とした (n=3)。

#### 6. von Kossa染色

培養14、21、28日目に培養液を除去しPBSで洗浄後、10%ホルマリンで固定し、基質として5%硝酸銀 (関東化学、東京、日本) を入れ、UVライトで40分間反応させた。蒸留水で洗浄後、5%チオ硫酸ナトリウ

ム (米山化学、大阪、日本) で反応を停止させた。染色後のチタンディスクをデジタルカメラで撮影し、得られた画像データについてImageJ (NIH) を用いて解析し、染色された面積率をもって陽性率とした (n=3)。

#### 7. SEMによる石灰化結節の観察

培養21、28日目に培養液を除去しPBSで洗浄後、2.5%グルタルアルデヒド (米山化学) による前固定を2時間、1%オスミウム (TAAB、Berkshire、UK) による後固定を2時間、エタノールの上昇系列脱水 (50、70、80、90、100%) を各10分間行った。乾燥後、白金スパッタコーティングにより蒸着し、SEMにて石灰化結節を観察した。

#### 8. Real-time PCRによる遺伝子解析

ALP染色、von Kossa染色において糖尿病群、対照群間で有意差を認められた機械研磨、フッ化水素酸処理について、Real-time PCR法を用いて遺伝子発現の検索を行った。

培養1、3、7、14、21日目に培養液を除去しPBSで洗浄後、TRIzol®Plus RNA Purification Kit (invitrogen、Carlsbad、USA)、Pure Link® DNase Kit (invitrogen) にて細胞溶解ならびにRNA精製を行った。続いて、Power SYBR® Green Cell-to-CT™ Kit (Applied Biosystems、Carlsbad、USA) を用いて逆転写を行い、cDNAを合成した。7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて、Alkaline Phosphatase (ALP)、Collagen I (Col)、Osteopontin (OPN)、Osteocalcin (OCN)、Runx2 (Runx)、Osterix (Ox)、ハウスキーピング遺伝子である18S rRNA (18S) についてReal-time PCRを行った。目的遺伝子の発現量は、18Sの発現量により補正した。1群あたり3wellの細胞を用いて遺伝子検索を行った (n=3)。

## 9. 統計分析

血糖値、細胞数、染色によるタンパク発現、Real-time PCRによる遺伝子発現の各データは、それぞれ統計学的解析としてStudent's t-test (Microsoft Excel for Mac 2004 Version 11.6) を行い、有意水準を5%とした。

本実験における実験動物の扱いは、愛知学院大学歯学部動物実験指針に従って行い、愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認（承認番号104）を受けた。

## Ⅲ. 結果

### 1. チタンディスク表面像

機械研磨では平滑な面に切削溝がみられ、溝の幅は $0.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$ であった。

硫酸処理では微小な孔を形成した粗面がみられ、孔の直径は $1.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$ であった。

フッ化水素酸処理では、くさび状の窪みがみられ、幅は最小で $1.7 \pm 0.8 \mu\text{m}$ 、最大で $8.8 \pm 3.1 \mu\text{m}$ であった。

### 2. 血糖値

屠殺前のラットの平均血糖値は、対照群 $104.5 \text{ mg/dl}$ 、糖尿病群 $201.8 \text{ mg/dl}$ であり、糖尿病群は対照群に比べて有意に高く、約2倍であった。

### 3. 細胞数

機械研磨における細胞数は、培養1日目の対照群では $17.0 \times 10^4$  cells/mm<sup>2</sup>、糖尿病群では $9.3 \times 10^4$  cells/mm<sup>2</sup>であり、糖尿病群は対照群より少なく、有意な差を認めたが、培養3日目の対照群では $45.8 \times 10^4$  cells/mm<sup>2</sup>、糖尿病群では $98.6 \times 10^4$  cells/mm<sup>2</sup>となり、糖尿病群は対照群より有意に多く、約2倍であった。

硫酸処理における細胞数は、培養1日目の対照群では $5.8 \times 10^4$  cells/mm<sup>2</sup>、糖尿病群では $5.5 \times 10^4$  cells/mm<sup>2</sup>、培養3日目の対照群では $18.3 \times 10^4$  cells/mm<sup>2</sup>、糖尿病群では $19.4 \times 10^4$  cells/mm<sup>2</sup>となり、培養1、3日目ともに糖尿病群と対照群で有意な差はみられなかった。

フッ化水素酸処理における細胞数は、培養1日目の対照群では $3.3 \times 10^4$  cells/mm<sup>2</sup>、糖尿病群では $4.5 \times 10^4$  cells/mm<sup>2</sup>、培養3日目の対照群では $18.7 \times 10^4$  cells/mm<sup>2</sup>、糖尿病群では $20.3 \times 10^4$  cells/mm<sup>2</sup>となり、培養1、3日目ともに糖尿病群と対照群で有意な差はみられなかった。

また、表面処理の違いによる細胞数の比較を行ったところ、培養1、3日目それぞれにおいて、対照群、糖尿病群ともに機械研磨での細胞数は硫酸処理、フッ化水素酸処理よりも有意に多かった。

#### 4. Alkaline Phosphatase (ALP) 染色

機械研磨のALP染色陽性率は、培養3日目の対照群では4.1%、糖尿病群では1.3%であり、糖尿病群は対照群より陽性率が有意に低かった。

培養7日目の対照群では31.1%、糖尿病群では9.9%であり、糖尿病群は対照群より陽性率が有意に低かった。しかし、培養14日目の対照群では30.1%、糖尿病群では62.3%であり、糖尿病群は対照群より陽性率が有意に高かった。

硫酸処理のALP染色陽性率は、培養3日目の対照群では1.3%、糖尿病群では1.1%、培養7日目の対照群では2.3%、糖尿病群では1.4%、培養14日目の対照群では6.1%、糖尿病群では2.5%であり、実験期間を通して陽性率が3種類のチタン中最も低く、糖尿病群と対照群の陽性率に有意な差はみられなかった。

フッ化水素酸処理のALP染色陽性率は、培養3日目の対照群では6.3%、糖尿病群では1.7%、培養7日目の対照群では17.3%、糖尿病群では2.4%、培養14日目の対照群では29.2%、糖尿病群では20.4%であり、培養3、7、14日目ともに糖尿病群は対照群より陽性率が有意に低かった。しかし、糖尿病群では培養14日目において対照群の培養7日目以上の陽性率であった。

培養3日目のALP染色における単位細胞当たりのALP活性は、機械研磨の対照群では5.6、糖尿病群では3.8であり、糖尿病群は対照群よりALP活性が有意に低かった。硫酸処理では対照群、糖尿病群ともに0.7であり、3種類のチタンのうち活性が最も低く、糖尿病群、対照群の陽性率に有意差はみられなかった。また、フッ化水素酸処理の対照群では35.1、糖尿病群では10.3であり、糖尿病群は対照群より有意にALP活性が低かった。

## 5. von Kossa染色

機械研磨のvon Kossa染色陽性率は、培養14日目の対照群では5.9%、糖尿病群では4.9%、培養21日目の対照群では7.2%、糖尿病群では7.1%、培養28日目の対照群では9.9%、糖尿病群では10.1%であり、培養14日目において糖尿病群では対照群より陽性率が有意に低かったが、培養21、28日目において対照群とほぼ同等の陽性率を示した。

硫酸処理のvon Kossa染色陽性率は、培養14日目の対照群では2.5%、糖尿病群では2.2%、培養21日目の対照群では3.1%、糖尿病群では3.1%、培養28日目の対照群では7.3%、糖尿病群では5.7%であり、培養14、21、28日目のいずれにおいても糖尿病群、対照群の陽性率に有意差はみられなかったが、培養28日目において糖尿病群、対照群ともに培養14日目と比べて約3倍の陽性率であった。

フッ化水素酸処理のvon Kossa染色陽性率は、培養14日目の対照群では5.1%、糖尿病群では0.9%、培養21日目の対照群では6.5%、糖尿病群では3.4%、培養28日目の対照群では9.1%、糖尿病群では5.3%であり、培養14、21、28日目のいずれにおいても糖尿病群は対照群より陽性率が有意に低かった。また、培養28日目の糖尿病群では培養14日目の約5倍の陽性率であった。

## 6. SEMによる石灰化結節の観察

培養21日目の機械研磨では、糖尿病群では対照群より石灰化結節数はわずかに少ない程度であった。培養21日目の硫酸処理では、糖尿病群は対照群に比べて石灰化結節は小さかった。培養21日目のフッ化水素酸処理では、糖尿病群は対照群に比べて石灰化結節は少なく、小さかった。培養28日目の機械研磨では、糖尿病群は対照群とほぼ同等の石灰化結節数が認められた。培養28日目の硫酸処理、フッ化水素酸処理では、糖尿病群は対照群に比べて石灰化結節は少なく、小さかった。

## 7. Real-time PCRによる遺伝子解析

各遺伝子の発現量は、機械研磨、フッ化水素酸処理の2種のチタン表面処理における培養1日目の対照群の発現量を1とした場合の相対量で示した。

#### 1) Alkaline Phosphatase (ALP)

機械研磨での相対発現量は、培養1日目において糖尿病群では0.1、培養3日目において対照群では1.9、糖尿病群では0.3、培養7日目において対照群では1.9、糖尿病群では1.3、培養14日目において対照群では3.9、糖尿病群では6.4、培養21日目において対照群では2.4、糖尿病群では2.0であった。培養1、3日目において糖尿病群は対照群より有意に低く、1/10.0倍、1/6.3倍の発現量であったが、培養14日目において糖尿病群は対照群より有意に高く、1.6倍の発現量であった。

フッ化水素酸処理での相対発現量は、培養1日目において糖尿病群では0.2、培養3日目において対照群では1.4、糖尿病群では0.2、培養7日目において対照群では1.6、糖尿病群では0.3、培養14日目において対照群は6.6、糖尿病群では1.2、培養21日目において対照群では3.2、糖尿病群では1.3であった。培養1、3、7、14日目において、糖尿病群は対照群より有意に低く、それぞれ1/5.0倍、1/7.0倍、1/5.3倍、1/5.5倍の発現量であった。

#### 2) Collagen I (Col)

機械研磨での相対発現量は、培養1日目において糖尿病群では0.5、培養3日目において対照群では0.8、糖尿病群では0.4、培養7日目において対照群では0.8、糖尿病群では0.9、培養14日目において対照群では2.1、糖尿病群では3.1、培養21日目において対照群では0.8、糖尿病群

では0.7であった。培養1、3日目において糖尿病群は対照群より有意に低く、両日とも1/2.0倍の発現量であったが、培養14日目において糖尿病群は対照群より有意に高く、1.5倍の発現量であった。

フッ化水素酸処理での相対発現量は、培養1日目において糖尿病群では0.5、培養3日目において対照群では0.5、糖尿病群では0.3、培養7日目において対照群では0.6、糖尿病群では0.5、培養14日目において対照群では3.2、糖尿病群では0.5、培養21日目において対照群では1.1、糖尿病群では0.5であった。培養1、3、7、14日目において、糖尿病群は対照群より有意に低く、それぞれ1/2.0倍、1/1.7倍、1/1.2倍、1/6.4倍の発現量であった。

### 3) Osteopontin (OPN)

機械研磨での相対発現量は、培養1日目において糖尿病群では1.5、培養3日目において対照群では1.3、糖尿病群では2.4、培養7日目において対照群では4.2、糖尿病群では7.8、培養14日目において対照群では3.4、糖尿病群では7.4、培養21日目において対照群では9.2、糖尿病群では5.0であった。培養1、3、7、14日目において、糖尿病群は対照群より有意に高く、それぞれ1.5倍、1.8倍、1.9倍、2.2倍の発現量であった。

フッ化水素酸処理での相対発現量は、培養1日目において糖尿病群では2.2、培養3日目において対照群では0.6、糖尿病群では0.8、培養7日目において対照群では1.3、糖尿病群では2.3、培養14日目の対照群では4.0、糖尿病群では1.9、培養21日目において対照群では1.8、糖尿病群では1.7であった。培養1、3日目で糖尿病群は対照群より有意に高

く、それぞれ2.2倍、1.3倍の発現量であったが、培養14日目になると糖尿病群は対照群より有意に低く、1/2.1倍の発現量であった。

#### 4) Osteocalcin (OCN)

機械研磨での相対発現量は、培養1日目において糖尿病群では0.2、培養3日目において対照群では0.6、糖尿病群では0.1、培養7日目において対照群では109.9、糖尿病群では14.7、培養14日目において対照群では1687.1、糖尿病群では2824.0、培養21日目において対照群では765.5、糖尿病群では1178.7であった。培養7日目において糖尿病群は対照群より有意に低く、1/7.3倍の発現量であったが、培養14日目において糖尿病群は対照群より有意に高く、1.7倍の発現量であった。

フッ化水素酸処理での相対発現量は、培養1日目において糖尿病群では0.2、培養3日目において対照群では0.1、糖尿病群では0.2、培養7日目において対照群では10.8、糖尿病群では0.5、培養14日目において対照群では1444.8、糖尿病群では140.5、培養21日目において対照群では1935.6、糖尿病群では184.8であった。培養7、14、21日目において、糖尿病群は対照群より有意に低く、それぞれ1/21.6倍、1/10.2倍、1/10.5倍の発現量であった。

#### 5) Runx2 (Runx)

機械研磨での相対発現量は、培養1日目において糖尿病群では0.6、培養3日目において対照群では1.2、糖尿病群では0.7、培養7日目において対照群では1.2、糖尿病群では1.6、培養14日目において対照群では3.7、糖尿病群では4.7、培養21日目において対照群では2.7、糖尿病群では2.9であった。培養1、3日目において糖尿病群は対照群より有意

に低く、両日とも1/1.7倍の発現量であったが、培養14日目において糖尿病群は対照群より有意に高く、1.3倍の発現量であった。

フッ化水素酸処理での相対発現量は、培養1日目において糖尿病群では0.6、培養3日目において対照群では0.9、糖尿病群では0.7、培養7日目において対照群では0.8、糖尿病群では0.7、培養14日目において対照群では1.9、糖尿病群では1.2、培養21日目において対照群では3.2、糖尿病群では1.2であった。培養1、3、21日目において、糖尿病群は対照群より有意に低く、それぞれ1/1.7倍、1/1.3倍、1/2.7倍の発現量であった。

#### 6) Osterix (Osx)

機械研磨での相対発現量は、培養1日目において糖尿病群では0.6、培養3日目において対照群では0.6、糖尿病群では0.4、培養7日目において対照群では1.7、糖尿病群では2.3、培養14日目において対照群では3.6、糖尿病群では12.8、培養21日目において対照群では1.8、糖尿病群では1.8であった。培養1、3日目において糖尿病群は対照群より有意に低く、それぞれ1/1.7倍、1/1.5倍の発現量であったが、培養7、14日目において糖尿病群は対照群より有意に高く、それぞれ1.4倍、3.6倍の発現量であった。

フッ化水素酸処理での相対発現量は、培養1日目において糖尿病群では0.4、培養3日目において対照群では0.3、糖尿病群では0.3、培養7日目において対照群では0.9、糖尿病群では0.4、培養14日目において対照群では3.6、糖尿病群では1.0、培養21日目において対照群では1.3、糖尿病群では1.1であった。培養1、7、14日目において、糖尿病群は

対照群より有意に低く、それぞれ1/2.5倍、1/2.3倍、1/3.6倍の発現量であった。

#### IV. 考察

糖尿病は、糖代謝異常を示す全身性疾患であり、骨の創傷治癒不全を伴うため、インプラント治療のリスクファクターと言われている<sup>1)</sup>。本研究では、2型糖尿病疾患モデルであるGKラットを用いて骨髄由来骨芽細胞様細胞の増殖、分化を検討した。GKラットは、Wistar系ラットの中から軽度耐糖能の異常を示すものを選び、選択交配を繰り返すことにより確立された自然発症型2型糖尿病モデルラットであり、その特徴は、非肥満、インスリン抵抗性、インスリン分泌不全を示し、多くの日本人の2型糖尿病に類似しているとされている<sup>28)</sup>。

##### 1. チタン上での骨芽細胞様細胞の増殖能について

機械研磨における細胞数は、培養1日目において糖尿病群は対照群より有意に少なかったが、培養3日目において糖尿病群は対照群より有意に多かった。これにより、糖尿病群の細胞は初期の増殖能は対照群に劣るものの、培養3日目では対照群よりも増殖能が優れていることが示唆された。本実験では、培養液には低グルコースの $\alpha$ -MEMを使用して培養を行った。 $\alpha$ -MEMは、Stannersら<sup>29)</sup>がEagle's MEMを改変し、マウスとハムスターの融合細胞の培養に用いたもので、グルコース含有量は1,000 mg/lであり、低グルコースの培養液に分類されている。したがって、糖尿病群において、培養1日目では細胞増殖能は低いままであったが、培養3日目では低グルコース培養液で培養することによって増殖抑制が軽減し、細胞増殖能が高くなったと考えられた。

培養1、3日目において機械研磨での対照群における細胞数は、硫酸処理、フッ化水素酸処理よりも有意に多くなった。Kuboら<sup>30)</sup>、Attら<sup>31)</sup>は、Sprague-Dawley (SD) ラット骨膜由来骨芽細胞様細胞を培養した *in vitro* の実験において、培養3、6日目において機械研磨の方が硫酸処理よりも細胞数は多かったと報告している。本実験においても同様の結果であり、チタン上での骨芽細胞様細胞における *in vitro* の実験系では機械研磨において増殖能は促進されるものと考えられる。

また、培養1、3日目において機械研磨での糖尿病群における細胞数は、硫酸処理、フッ化水素酸処理よりも有意に多かった。これにより、糖尿病群の細胞でも対照群と同じく *in vitro* の実験系では機械研磨において増殖能が高いことが考えられる。

## 2. チタン上での骨芽細胞様細胞の分化能について

ALP染色、von Kossa染色の結果は、いずれの実験期間においても糖尿病群、対照群ともに機械研磨における陽性率が硫酸処理、フッ化水素酸処理と比べて高かった。Kuboら<sup>30)</sup>、Attら<sup>31)</sup>は、SDラット骨膜由来骨芽細胞様細胞を培養した *in vitro* の実験において、いずれの実験期間においても機械研磨の方が硫酸処理よりもALP染色、von Kossa染色の陽性率は高かったと報告している。さらに、Aitaら<sup>32)</sup> もSDラット骨髄由来骨芽細胞様細胞を用いた *in vitro* の実験において、いずれの実験期間においても機械研磨の方が硫酸処理よりもALP染色、von Kossa染色の陽性率は高かったと報告している。本実験においてもこれらの報告と同様の結果となっており、このことは *in vitro* における実験では機械研磨のような平滑な面においては、酸処理を施した表面よりも骨芽細胞様細胞の分化、石灰化が促進されることを示唆している。

また本研究では、糖尿病群のALP染色および遺伝子発現について検討を行った。機械研磨におけるALP染色および遺伝子発現は、培養14日目で糖尿病群は対照群よりも陽性率および遺伝子発現が有意に高かった。Inabaら<sup>33)</sup>は、*in vitro*の実験でヒトMG-63骨芽細胞様細胞を高グルコース存在下に培養した際に1, 25-dihydroxy-vitaminD<sub>3</sub> (1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) 刺激に対するOCNの分泌が通常の培養と比較して低下していたと報告している。一方、Wangら<sup>25)</sup>は、チタンインプラントを埋入させた*in vivo*の実験で、通常のGKラットとインプラント体周囲にインスリンを局所浸潤させたGKラットのインプラントと骨の接触率をそれぞれ測定したところ、通常のGKラットはインスリンを局所浸潤させたGKラットと比較して埋入2週および6週後のインプラントと骨との接触率が有意に低かったと報告している。これらの報告は、糖尿病による高グルコース環境が骨芽細胞の分化を抑制しているものと考えられているが、これらの報告から本実験結果を考察すると、本実験では低グルコースの培養液α-MEMを使用していることから、糖尿病における高グルコース環境の影響は少なくなっていると考えられる。すなわち、低グルコース培養液で培養したGKラット骨芽細胞様細胞は、培養14日目では糖尿病による分化抑制の影響が弱くなり、分化が促進された可能性が考えられる。

さらに本研究では、糖尿病群のALP染色および遺伝子発現と石灰化の関係について検討を行った。培養14日目における機械研磨でのALP染色陽性率は、糖尿病群では対照群よりも有意に高く、また、培養14日目における機械研磨での遺伝子発現は、糖尿病群では対照群よりも検索したすべての遺伝子において有意に高かった。培養21日目における機械研磨でのvon Kossa染色の結果は、糖尿病群は対照群とほぼ同等の陽性率を示し、培養21日目における機械研磨でのSEMによる石灰化結節の結果は、

糖尿病群は対照群よりもわずかに少ない程度の石灰化結節数であった。さらに、培養28日目における機械研磨でのvon Kossa染色陽性率およびSEMによる石灰化結節の結果は、糖尿病群は対照群とほぼ同等の陽性率および石灰化結節数であった。これは前述の通り、培養14日目において糖尿病群は対照群より高い分化能を示唆しているが、遺伝子発現を石灰化のマーカーとして捉えると、その後の石灰化を検証しているvon Kossa染色とSEMによる石灰化結節の観察における結果は、糖尿病群の方がvon Kossa染色陽性率は高く、石灰化結節数も多くなると考えられる。しかしながら、本実験の培養21日目のvon Kossa染色、培養28日目のvon Kossa染色、SEMによる石灰化結節における結果は、糖尿病群と対照群でほぼ同等であった。これらの結果では、ALP染色、遺伝子発現の結果がvon Kossa染色ならびにSEMによる石灰化結節の結果と一致していないということになる。今回検索した遺伝子発現の中でOCNは、成熟した骨芽細胞により産生されるタンパク質であり、石灰化に関与し<sup>34)</sup>、成熟骨芽細胞から骨細胞へ分化する段階で発現すると言われている<sup>35)</sup>。一方Runx2は、Runxファミリーに属する骨形成に関わる転写因子であり、骨芽細胞分化に必須な役割を果たしている<sup>36)</sup>。さらに、Runx2は早期の骨芽細胞分化には促進的に働くが、後期の骨芽細胞分化および骨細胞への分化を強く抑制することが知られており、Liuら<sup>37)</sup>、Kanataniら<sup>38)</sup>は、マウス骨芽細胞にRunx2を過剰発現させたところ、容易に吸収されるwoven bone様の未熟骨へ分化し、成熟した骨細胞はほとんど存在しなかったと報告している。本実験において、培養14日目における機械研磨のOCN、Runx2は、実験期間を通して最大の発現量があり、糖尿病群は対照群よりも高く発現していた。OCNが高く発現している培養14日目は、成熟骨芽細胞が骨細胞へ分化していく時期であり、同時にRunx2が骨細胞への分化を抑制

している時期であると考えられる。したがって、機械研磨での糖尿病骨芽細胞様細胞はRunx2により分化が抑制され、von Kossa染色とSEMによる石灰化結節の結果は対照群とほぼ同等になったものと考えられた。さらに、Nakamuraら<sup>39)</sup>がGKラット下顎門歯抜歯窩へJIS60種チタン (Ti-6Al-4V) を埋入させた実験で、Wistarラットと比較して除去トルクに有意な差はなかったと報告している。以上のことから、本実験において機械研磨におけるGKラット骨芽細胞様細胞は、培養14日目において低グルコース培養液 $\alpha$ -MEMによって分化が促進され、遺伝子発現が高くなり、その後培養14日目におけるRunx2による分化抑制によって培養28日目における石灰化は対照群と同等になったと考えられる。

酸処理での分化能については、ALP染色、von Kossa染色、SEMによる石灰化結節の観察、遺伝子発現ともにすべての培養期間において糖尿病群は対照群よりもALP染色、von Kossa染色陽性率、遺伝子発現は低く、石灰化結節数は少なかった。これは、前述の機械研磨とは異なる結果であった。Retzeppiら<sup>40)</sup>は、機械研磨にサンドブラスト処理と酸エッチングにて処理を施したインプラントをストレプトゾトシン投与にて糖尿病を惹起させ、インスリン投与を行ってコントロールしたWistarラットと正常なWistarラットの下顎骨にそれぞれ埋入したところ、インスリン投与を行ってコントロールした糖尿病ラットは、正常なWistarラットと比べて埋入90日目におけるインプラントと骨との接触率が低かったと報告している。これは、本実験における硫酸処理、フッ化水素酸処理の結果と類似しており、糖尿病群ではチタンの表面性状によって骨芽細胞の増殖、分化が異なっているものと考えられる。

### 3. 糖尿病患者におけるインプラント治療の可能性と今後の課題について

骨芽細胞様細胞の分化、増殖はチタンの表面性状に影響される<sup>30, 31, 41, 42)</sup>。本実験では、異なる表面のチタン上で糖尿病ラット骨髄由来骨芽細胞様細胞の分化、増殖について検討した。*in vitro*による検索の結果、糖尿病においても低グルコース培養液における機械研磨では対照群と同等の石灰化を示すことが示唆された。これらのことから糖尿病患者では、血糖値のコントロールとインプラント体の表面処理方法の選択や埋入後の治癒期間を長くすることによって、リスクを軽減できると考えられた。今後は *in vivo* において、糖尿病がインプラント周囲の骨形成に及ぼす影響や適したチタンインプラント表面の処理方法について検証を行う必要があると考えられた。

## V. まとめ

本研究では、異なる表面処理を施したチタン上でGKラット骨髄由来骨芽細胞様細胞の分化、増殖について*in vitro*にて検討を行った。

1. GKラットの骨髄由来骨芽細胞様細胞は、機械研磨で対照群より増殖能が高かった。
2. GKラットの骨髄由来骨芽細胞様細胞は、培養14日目のALP染色において機械研磨では対照群より高い陽性率を示し、硫酸処理では両群の陽性率に有意差がなく、フッ化水素酸処理では対照群より低い陽性率を示した。
3. GKラットの骨髄由来骨芽細胞様細胞は、培養28日目のvon Kossa染色およびSEMによる石灰化結節の観察において、機械研磨では対照群と同等のvon Kossa染色陽性率と石灰化結節を認め、硫酸処理では両群の陽性率に有意差がなく、対照群より小さい石灰化結節を認め、フッ化水素

酸処理では対照群より低いvon Kossa染色陽性率と対照群より少なく、小さい石灰化結節を認めた。

4. GKラットの骨髄由来骨芽細胞様細胞は、培養14日目の遺伝子発現において、機械研磨では対照群より高い遺伝子発現を示し、フッ化水素酸処理では対照群より低い遺伝子発現を示した。
5. GKラット骨髄由来骨芽細胞様細胞は、チタンの表面処理方法の選択や低グルコースの培養液を使用することによって増殖、分化を促進させることが可能であると考えられた。

**謝辞** 稿を終わるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました口腔病理学講座、前田初彦教授に感謝いたします。また、本研究に際してご協力頂いた口腔病理学講座、久保勝俊准教授、杉田好彦准教授、佐藤恵美子講師、吉田和加講師ならびに口腔病理学講座員各位に厚く御礼を申し上げます。

## 文献

- 1) Retzeppi M, Donos N: The effect of diabetes mellitus on osseous healing. Clin Oral Implants Res, **21**: 673-681, 2010.
- 2) Jehle PM, Jehle DR, Mohan S, Bohm BO: Serum levels of insulin-like growth factor system components and relationship to bone metabolism in type 1 and type 2 diabetes mellitus patients. J Endocrinol, **159**: 297-306, 1998.

- 3) Tuominen JT, Impivaara O, Puukka P, Ronnema T: Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **22**: 1196-1200, 1999.
- 4) Ivers RQ, Cumming RG, Mitchell P, Peduto AJ: Diabetes and risk of fracture: The blue mountains eye study. *Diabetes care*, **24**: 1198-1203, 2001.
- 5) Nicodemus KK, Folsom AR: Type 1 and type 2 diabetes and incident hip fractures in postmenopausal women: Iowa women' s health study. *Diabetes Care*, **24**: 1192-1197, 2001.
- 6) Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L: Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. *Diabetologia*, **48**: 1292-1299, 2005.
- 7) Smith RA, Berger R, Dodson TB: Risk factors associated with dental implants in healthy and medically compromised patients. *Int J Maxillofac Implants*, **7**: 367-372, 1992.
- 8) Shernoff AF, Colwell JA, Bingham SF: Implants for type II diabetic patients: Interim report. VA implants in diabetes study group. *Implant Dent*, **3**: 183-185, 1994.
- 9) Khandelwal N, Oates TW, Vargas A, Alexander PP, Schoolfield JD, Alex McMahan C: Conventional SLA and chemically modified SLA implants in patients with poorly controlled type 2 diabetes mellitus

- a randomized controlled trial. Clin Oral Implants Res, **24**(1): 13-19, 2013.
- 10) Casap N, Nimri S, Ziv E, Sela J, Samuni Y: Type 2 diabetes has minimal effect on osseointegration of titanium implants in Psammomys obesus. Clin Oral Implants Res, **19**(5): 458-464, 2008.
- 11) National Institute of Health and Nutrition. Outline for the Results of the National Health and Nutrition Survey Japan, 2007. National Institute of Health and Nutrition, Tokyo, Japan, 2010.  
[http://www0.nih.go.jp/eiken/english/research/project\\_nhns.html](http://www0.nih.go.jp/eiken/english/research/project_nhns.html)
- 12) Morris HF, Ochi S and Winkler S: Implant survival in patients with type 2 diabetes: Placement to 36 months. Ann Periodontol, **5**: 157-165, 2000.
- 13) Moy PK, Medina D, Shetty V, Aghaloo TL: Dental implant failure rates and associated risk factors. Int J Oral Maxillofac Implants, **20**: 569-577, 2005.
- 14) Olson JW, Shernoff AF, Tarlow JL, Colwell JA, Scheetz JP, Bingham SF: Dental endosseous implant assessments in a type 2 diabetic population: A prospective study. Int J Oral Maxillofac Implants, **15**: 811-818, 2000.
- 15) Goto Y, Kakizaki M, Masaki N: Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. Tohoku J Exp Med, **119**(1): 85-90, 1976.

- 16) Kong P, Xie X, Li F, Liu Y, Lu Y: Placenta mesenchymal stem cell accelerates wound healing by enhancing angiogenesis in diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **438**(2): 410-419, 2013.
- 17) Kim MH, Hong SH, Lee MK: Insulin receptor-overexpressing  $\beta$ -cells ameliorate hyperglycemia in diabetic rats through Wnt signaling activation. *PLoS One*, **8**(7): e67802, 2013.
- 18) Oh TJ, Shin JY, Kang GH, Park KS, Cho YM: Effect of the combination of metformin and fenofibrate on glucose homeostasis in diabetic Goto-Kakizaki rats. *Exp Mol Med*, **45**: e30, 2013.
- 19) Hicks S, Labinskyy N, Piteo B, Laurent D, Mathew JE, Gupte SA, Edwards JG: Type II diabetes increases mitochondrial DNA mutations in the left ventricle of the Goto-Kakizaki diabetic rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **304**(7): H903-915, 2013.
- 20) Colombo JS, Balani D, Sloan AJ, Crean SJ, Okazaki J, Waddington RJ: Delayed osteoblast differentiation and altered inflammatory response around implants placed in incisor sockets of type 2 diabetic rats. *Clin Oral Implants Res*, **22**: 578-586, 2011.

- 21) Suzuki K, Goto Y and Toyota T: Spontaneously diabetic GK (Goto-Kakizaki) rats. In Shafrir E and Gordon S eds, Lessons from Animal Diabetes IV. Great Britain Inc (London), 107-111, 1993.
- 22) Ahmad T, Ohlsson C, Sääf M, Östenson C-G, Kreicbergs A: Skeletal changes in type-2 diabetic Goto-Kakizaki rats. J Endocrinol, **178**: 111-116, 2003.
- 23) Yasuda K, Uemura M, Suwa F: Morphological study of the palatal gingiva of the maxillary first molar in the type 2 diabetes mellitus model rat. Okajimas Folia Anat Jpn, **88**: 65-74, 2011.
- 24) Iwama A, Nishigaki N, Nakamura K, Imaizumi I, Shibata N, Yamasaki M, Nakamura H, Kameyama Y, Kapila Y: The effect of high sugar intake on the development of periradicular lesions in rats with type 2 diabetes. J Dent Res, **82**: 322-325, 2003.
- 25) Wang B, Song Y, Wang F, Li D, Zhang H, Ma A, Huang N: Effects of local infiltration of insulin around titanium implants in diabetic rats. British J Oral Maxillofac Surg, **49**: 225-229, 2010.
- 26) Waddington RJ, Alraies A, Colombo JS, Sloan AJ, Okazaki J, Moseley R: Characterization of oxidative stress status during diabetic bone healing. Cells Tissues Organs, **194**: 307-312, 2011.
- 27) Saruwatari L, Aita H, Butz F, Nakamura HK, Ouyang J, Yang Y, Chiou WA, Ogawa T: Osteoblasts generate harder, stiffer, and more delamination-resistant mineralized tissue on titanium than on

- polystyrene, associated with distinct tissue micro- and ultrastructure. *J Bone Miner Res*, **20**: 2002-2016, 2005.
- 28) 鈴木研一, 後藤由夫: 特集: 糖尿病モデル動物の特徴と知見-臨床に何を教えているか-GK ラット *Diabetes Frontier*, **9** (4):459-463, 1998.
- 29) Stanners CP, Eliceiri GL, Green H: Two types of ribosome in mouse-hampster hybrid cells. *Nat New Biol*, **230**: 52-54, 1971.
- 30) Kubo K, Att W, Yamada M, Ohmi K, Tsukimura N, Suzuki T, Maeda H, Ogawa T: Microtopography of titanium suppresses osteoblastic differentiation but enhances chondroblastic differentiation of rat femoral periosteum-derived cells. *J Biomed Mater Res A*, **87** (2): 380-391, 2008.
- 31) Att W, Kubo K, Yamada M, Maeda H, Ogawa T: Biomechanical properties of jaw periosteum-derived mineralized culture on different titanium topography. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **24**: 831-841, 2009.
- 32) Aita H, Hori N, Takeuchi M, Suzuki T, Yamada M, Anpo M, Ogawa T: The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*, **30** (6): 1015-1025, 2009.
- 33) Inaba M, Terada M, Koyama H, Yoshida O, Ishimura E, Kawagishi T, Okuno Y, Nishizawa Y, Otani S, Morii H: Influence of high glucose on 1.25dihydroxyvitaminD<sub>3</sub>-induced effect on human osteoblast-like MG-63 cells. *J Bone Miner Res*, **10**: 1050-1056, 1995.

- 34) Lian JB, Stein GS, Stewart C, Puchacz E, Mackowiak S, Aronow M, Von Deck M, Shalhoub V: Osteocalcin: characterization and regulated expression of the rat gene. *Connect Tissue Res*, **21** (1-4): 61-68, 1989.
- 35) 子守壽文 : 目で見る Bone Biology (第 28 回) Runx2 と Osterix. 骨粗鬆症治療, **10** (4) : 257-260, 2011.
- 36) 子守壽文 : 【骨・軟骨研究の基礎と臨床】基礎編 骨形成研究. *The Bone*, **22** (3) : 281-285, 2008.
- 37) Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Himeno M, Narai S, Yamaguchi A, Komori T: Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol*, **155** :157-166, 2001.
- 38) Kanatani N, Fujita T, Fukuyama R, Liu W, Yoshida CA, Moriishi T, Yamana K, Miyazaki T, Toyosawa S, Komori T: Cbf  $\beta$  regulates Runx2 function isoform-dependently in postnatal bone development. *Dev Biol*, **296**: 48-61, 2006.
- 39) Nakamura H, Nishizaki H, Okazaki J : Implants in mandibular incisor extraction sockets of diabetic aged rats. *J Osaka Dent Univ*, **46** (1) : 121-125, 2012.
- 40) Retzepi M, Lewis MP, Donos N: Effect of diabetes and metabolic control on de novo bone formation following guided bone regeneration.

Clin Oral Implants Res, **21**(1): 71-79, 2010.

41) Sugita Y, Ishizaki K, Iwasa F, Ueno T, Minamikawa H, Yamada M, Suzuki T, Ogawa T: Effects of pico-to-nanometer-thin TiO<sub>2</sub> coating on the biological properties of microroughened titanium. Biomaterials, **32**: 8374-8384, 2011.

42) Sato N, Kubo K, Yamada M, Hori N, Suzuki T, Maeda H, Ogawa T: Osteoblast mechanoresponses on Ti with different surface topographies. J Dent Res, **88**: 812-816, 2009.