

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390518

研究課題名（和文）ドラッグデリバリーシステムを用いた新規骨再生法の開発とその細胞内メカニズムの解明

研究課題名（英文）Development of novel bone regeneration procedure using drug delivery system and elucidation of its intracellular mechanism

研究代表者

古谷野 潔（KOYANO KIYOSHI）

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号：50195872

研究成果の概要：

我々はこれまでに、高脂血症治療薬 statin の局所投与において、骨芽細胞促進・破骨細胞抑制効果を確認した。しかし局所投与では、薬剤を局所に長期間とどめることが困難であるため、強い骨増生効果は得られなかった。そこで statin の局所投与が最大限の効果を発揮するためには、適切なドラッグデリバリーシステムおよび足場が必要であるとの仮説のもと、研究を行った。その結果、適切な条件下では、スタチンは局所（注射）投与によって骨形成を促進できることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2007 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム、スタチン、インプラント、骨増生

1. 研究開始当初の背景

歯や義歯/インプラントの予後を左右する非常に重要な因子として、歯槽骨/顎骨がある。歯や義歯、インプラントはいずれも骨に支持されているため、骨の維持・再生は口腔領域で最も早期に克服すべき課題の一つである。これまでに我々は、高脂血症治療薬である statin の全身投与が、i. インプラント周囲の骨形成に非常に有効であることを報告した（Clin Oral Implants Res, 2004）。さらに、我々は骨粗鬆症の中でも低回転型と呼ば

れるものはインプラント周囲骨形成が劣ることを見出しているが（J Biomed Mater Res, 2004）ii. この低回転型骨粗鬆症においても statin がインプラント周囲骨形成を著しく改善したことを報告した（第 111 回日本補綴歯科学会、第 13 回 European Association for Osseointegration(EAO)にて発表、EAO では Best Oral Award 受賞）。また、現在 statin の局所投与による骨増生効果を検討しており、骨芽細胞の分化増殖促進、および破骨細胞の分化抑制効果を確認している（第 113 回

日本補綴歯科学会にて発表、Dentsply 賞受賞)。しかし、局所投与においては、薬剤を局所に長期間とどめることが困難であるため、全身投与ほどの骨増生効果は得られていない。ティッシュエンジニアリングの三要素とは、細胞、活性物質（成長因子など）、足場であり、この3つの要素が高次元で融合することによって良好な組織再生が得られるとされている。現状では、体外で自己の細胞を培養、増殖させて使用する組織再生（骨造成）も報告されているが、より容易に、例えば診療室で骨造成を図るには、細胞は生体から供給されることを前提とし、活性物質と足場を体外から供給するという方法が実現性が高いと考えられる。

そこで本研究では、statinの局所投与が最大限の効果を発揮するためには、適切なドラッグデリバリーシステム(DDS)および足場(scaffold: Sc)が必要であるとの仮説を立て、研究を行うこととした。

2. 研究の目的

1. 種々のDDS, Scと数種のstatinを検討し、最適な担体を決定する。このとき、現在までに提案されているDDSやScによる効果はあまり高くないことが予備実験で明らかであるため、新たな発想からDDS, Scを考慮する。
2. 大動物を使用し、顎骨に人工欠損を作製して欠損の修復程度を組織学的に検討する。また、エムドゲイン®やGTR法等、歯周病により吸収された歯槽骨の回復に用いられる手法は多数あるが、本方法がそれらの手法の代替となりうるかについても検討する。その際、併せて歯根膜がどのように回復するかについても検討する。さらに、この薬剤の骨に対する作用機序については、概略では明らかになっているが(Gタンパク活性化抑制によるBMP-2過剰発現、破骨細胞活性化抑制)、実際に細胞内シグナル伝達を詳細に分析することによって、全く新しい手法による骨増生の可能性を探る。

以上のことにより、口腔領域におけるstatinの臨床応用を検討することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

実験1 statinを種々のドラッグデリバリーシステム(DDS)や足場(Scaffold: Sc)を用いて局所投与し、組織学的反応を観察する。

statinの局所投与に最も有効な方法を探るために、種々のDDS, Scとの組み合わせを行い、最適な組み合わせを決定する。statin×DDS×Scの組み合わせは多数に上るが、各々の組み合わせにおけるstatinの経時的徐放量を、in vitro環境で計測する。このあと徐放速度等で効果が期待できる組み合わせについてラットに応用する。

実験2 実験1にて適当であると考えられたstatin, DDS, Scの組み合わせを用いて、イヌ顎骨に形成した骨欠損(抜歯窩)に局所投与、反応を観察する。

イヌ第一大臼歯を抜歯し、実験1で決定したstatin, DDS, Scの組み合わせを抜歯窩に局所投与する。アッセイ項目は実験1と同様骨塩量定量、再生皮質骨厚さ、海綿骨密度、骨芽細胞・破骨細胞数測定とする。また、スタチン投与によりどのような点に影響があったかについて検討する。

実験3 in vitro, in vivo(人工骨欠損モデル、骨折モデル)において、statinが骨芽細胞系、破骨細胞系にどのような影響を与えているか、分子生物学的に検討する。

骨芽細胞は、smadを介したシグナリングを通じて分化を促進し、MAP-kinaseを介したシグナリングを通じて増殖を促進している。また、破骨細胞に関しては、RANK-RANKL系、LPS, TNFによる促進が知られているが、それぞれ細胞内のシグナル伝達経路が異なる。骨芽細胞、破骨細胞それぞれに関し、どのシグナル伝達経路が活性化/遮断されているのかを検討することにより、statinの骨芽細胞促進、破骨細胞抑制機構を検討する。方法としては、それぞれのシグナル伝達経路に特徴的な分子を同定するため、Realtime PCR法を用いてin vitroにて検討する。

4. 研究成果

まず、種々のDDS, Scと数種のstatinを検討し、最適な担体を決定することに着手した。具体的には、statinの局所投与に最も有効な方法を探るために、種々のDDS, Scとの組み合わせを行い、各々の組み合わせにおけるstatinの経時的徐放量をin vitro環境で計測した。その結果、TCP+コラーゲンの組み合わせ、あるいはPGAが良好な結果を示した。

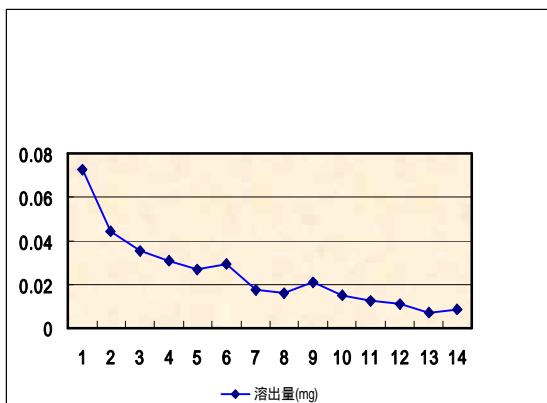


図1 TCP-コラーゲン-フルバスタチン複合体から人工体液 5ml に溶出したフルバスタチン量の経時変化。長期にフルバスタチンが放出されているのが確認できる。

このあと徐放速度等で効果が期待できる組み合わせについて in vivo 環境に応用するべく、ラット頭蓋骨に人工骨欠損を作製・statin×DDS×Sc を填入・1, 2, 4 週間飼育後標本作製再生皮質骨厚さ、海綿骨密度等の測定を行った。その結果、良好な骨再生効果を認めた。

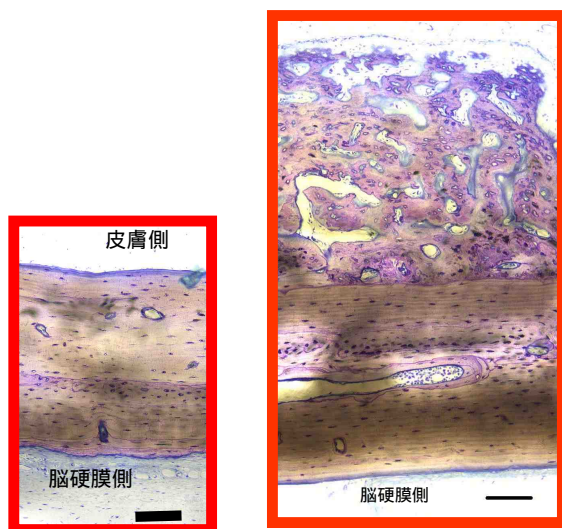


図2 ラット頭蓋骨に TCP-コラーゲン複合体を注入しても骨形成は認められないが(左) TCP-コラーゲン-フルバスタチン複合体を注入すると大量の新生骨が形成される。

次に、イヌ第一臼歯を抜歯し、初年度の実験において決定した statin, DDS, Sc (alpha-TCP+アテロコラーゲン、アルギン酸プロピレングリコール) の組み合わせを抜歯窩に局所投与し、再生皮質骨厚さ、海綿骨密度、骨芽細胞・破骨細胞数測定を行った。また、骨基質タンパク形成の状態を把握するため、骨基質タンパクや炎症性サイトカインの定量を行った。その結果スタチン投与により皮質骨厚さ、骨密度が向上し、抜歯窩の治癒が促進されることが示唆された。また、局所において骨基質タンパク量の増大と炎症性サイトカインの減少が認められた。

さらに、骨芽細胞、破骨細胞それぞれに関し、どのシグナル伝達経路が活性化/遮断されているのかを Realtime PCR 法を用いて in vitro にて検討した。その結果、骨芽細胞系に関しては、スタチンは smad を介したシグナリングを通じて骨芽細胞の分化を促進する可能性が示唆された。一方破骨細胞系に関しては、RANK-RANKL 系、LPS, TNF による促進とスタチンの関連性に関しては一定の見解を得ることができなかった。

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)

Y. Jinno, Y. Ayukawa, Y. Ogino, I. Atsuta, Y. Tsukiyama, K. Koyano. Vertical bone augmentation with fluvastatin in an injectable delivery system: a rat study. Clin Oral Implants Res, in press, 2009.

Y. Moriyama, Y. Ayukawa, Y. Ogino, I. Atsuta, K. Koyano. Topical application of statin affects bone healing around implants, Clin Oral Implants Res, 19, 600-5, 2008.

〔学会発表〕(計4件)

Y. Jinno ら, Vertical Bone Augmentation with Injectable Statin Delivery System, 4th Scientific meeting of the Asian Academy of Osseointegration, 2008,7,19, Hiroshima.

Y. Moriyama ら, Peri-implant osteogenesis is promoted by the local application of statin, 16th European Association for Osseointegration Annual Scientific Meeting, 2007.10.25~27, Barcelona, Spain.

Y. Moriyama ら, Local application of statin enhances osteogenesis around titanium implant, 12th Meeting of the International College of Prosthodontists, 2007.9.5, Fukuoka.

神野洋平ら, 新規ドラッグデリバリーシステムを用いたスタチンによる骨増生, 第37回日本口腔インプラント学会学術大会, 2007.9.15, 熊本.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古谷野 潔 (KOYANO KIYOSHI)
九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号: 50195872

(2) 研究分担者

鮎川 保則 (AYUKAWA YASUNORI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号: 50304697

荻野 洋一郎 (OGINO YOICHIRO)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 50380431

石川 邦夫 (ISHIKAWA KUNIO)
九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号: 90202952