様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月 ２９ 日現在

機関番号：１７１０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４６３０９０

研究課題名（和文）骨再生への新しいアプローチ　－炭酸リチウム局所投与が骨形成促進に与える影響－

研究課題名（英文）A new approach to the bone regeneration -the effect of local lithium administration for facilitating bone regeneration-

研究代表者
佐々木　匡理（Sasaki, Masanori）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：３０３４６８０３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：骨再生に重要なWntシグナルは、グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3（GSK3）により調節されている。我々はGSK-3阻害薬であるリチウムに着目し、骨再生促進を試みた。動物実験では、リチウムは新生骨を形成促進することが分かった。臨床試験では炭酸リチウムをインプラント埋入の為の抜歯窩に投与し、安全性および骨形成促進能の有無について評価を行った。炭酸リチウムの抜歯窩投与は、有害事象を生じなかった。血中のリチウム濃度もすべての症例において検出限界以下の量であり、炭酸リチウム局所投与における安全性が確認された。しかし、炭酸リチウムの骨形成促進効果の判定は被験者数を重ね、さらなる研究が必要と考えている。

研究成果の概要（英文）：Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is known to be a key enzyme for regulating Wnt signaling pathway which is an important role of bone regeneration. We focused on “lithium”, GSK-3 inhibitor, and attempted to accelerate bone regeneration by local application of lithium. In in vivo experiment using rodents, our results demonstrated that lithium could facilitate bone formation. Subsequently, we evaluated whether lithium application into extraction sites of teeth would be safe and effective on bone healing in a clinical trial. Local application of lithium carbonate did not cause adverse events in the process of bone healing. Serum lithium concentrations also were lower than a detection limit in all research subjects. These result suggested that safety of local lithium application was confirmed. However, further study would be necessary to evaluate an effectiveness of local lithium application for facilitating bone regeneration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨再生　歯科インプラント　Wnt/β-catenin 経路

１．研究開始当初の背景

骨形成に関わる細胞内シグナル経路で、骨の恒常性維持に不可欠とされている Wnt/β-catenin シグナル伝達経路は、グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3（GSK3）により細胞内のβ-catenin 量が調節されていることで、このシグナルは活性化される。そこでわれわれは GSK-3 阻害薬であるリチウムに着目し、骨再生促進を試みた。骨再生は厳密に調節されている生物学的プロセスであり、高度に組織化された物理的および一連の細胞経路が関与している。骨を形成する骨芽細胞と骨を吸収する破骨細胞の２種類の細胞が新生骨形成に不可欠である。GSK-3 阻害薬であるリチウム（LiCl: lithium chloride)（ナカライテスク，京都，日本）は、マウス前骨芽細胞株 C3H10T1/2 細胞を用いた実験において、骨芽細胞の分化を誘導し von kossa 染色にて石灰化が亢進されていることが分かった。また、マウス前破骨細胞株 RAW-D 細胞を用いた実験では、TRAP 染色にて破骨細胞の分化を抑制することがわかった。こうした結果より、GSK-3 阻害薬であるリチウムは骨形成促進作用が見られることがこれまでの研究で明らかになってきた。そこで、Wnt/ β-catenin シグナル伝達経路を活性化する炭酸リチウムの局所投与による骨再生効果を明らかにするため、動物実験モデルと臨床試験において骨形成に及ぼす影響の解析を行った。

２．研究の目的

口腔外科領域における様々な疾患では、その治癒過程において骨再生が大変重要である。Wnt/β-catenin 経路は骨形成に関与していることが知られており、様々な骨形成促進を試みる臨床試験が行われているが、現在局所的に Wnt/β-catenin 経路を活性化させ骨形成を促進させる試みは行われていない。本研究では、Wnt/β-catenin 経路を活性化しうる炭酸リチウムを、1）動物実験モデルの人為的骨欠損部への局所投与、2）歯科インプラント埋入のための抜歯窩へ局所投与し（臨床試験承認済み)、炭酸リチウムによる骨形成促進効果について解析を行っていく。本研究の結果をもとに、骨再生を期待する様々な口腔外科疾患に対して、炭酸リチウムの臨床応用を最終目標としている。

３．研究の方法

炭酸リチウムの局所投与による骨形成促進効果を明らかにすることを目的とし、動物実験モデルと臨床試験において炭酸リチウムの局所投与による骨形成状態の解析を以下の方法にて行った。

（１）動物実験モデルにおいて、炭酸リチウム局所投与の骨形成作用における影響の評価を、以下のように行った。Wister ラット雄 11 週齢の脛骨に、人為的に歯科用のバーで φ5 ㎜×1 ㎜×1.5 ㎜の骨欠損を作製し、同部に炭酸リチウム（Li2CO3: lithium carbonate）（West-Ward Pharmaceutical Corp, Eatontown, New Jersey）10 ｍM を含有したマトリゲルを局所投与し、吸収性のコラーゲン膜（コーケンティッシュガイド：高研，東京，日本）で被覆した。コントロール群では PBS 含有したマトリゲルを局所投与した（図 1)。石灰化速度算出のため屠殺 5 日前と 1 日前に 2 ％炭酸水素ナトリウムで溶解したカルセイン（10 mg/kg）を皮下注射した。ラットは 14 日後に安楽死させて、脛骨を摘出しマイクロ CT 解析と非脱灰標本（Villanueva Bone staining）による骨形態計測を行った。

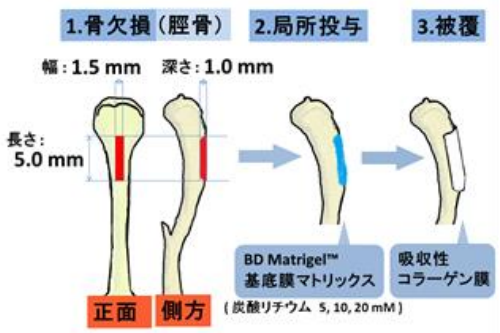

図1 人為的骨欠損作製と炭酸リチウム局所投与方法

（２）臨床試験では、九州大学病院インプラントセンターにて臼歯抜歯後にインプラント埋入術を施行する 20 歳以上 70 歳未満の日本人を対象として、申請者らがすでに申請、承認を得た臨床試験「歯科インプラント埋入のための抜歯窩への炭酸リチウム局所単回投与の安全性および骨形成促進作用を評価する日本人成人を対象とした用量漸増比較試験」を行い、炭酸リチウムの骨形成への関与について解析を行っていった。

用量漸増試験として以下に示すステップに沿って、安全性を確認しながら行う（表 1)。成人を対象とし、ステップ 0（プラセボ投与群)、ステップ 1～3（炭酸リチウム投与群）各ステップ 3 名計 12 名で試験を行う。

表1　用量漸増試験の各ステップと炭酸リチウム含有濃度

ステップ 0：プラセボ 群 3 名
ステップ 1：炭酸リチウム 1 mM 群 3 名（炭酸リチウム総量約 74 μg)
ステップ 2：炭酸リチウム 3 mM 群 3 名（炭酸リチウム総量約 222 μg)
ステップ 3：炭酸リチウム 10 mM 群 3 名（炭酸リチウム総量約 740 μg)

表2　臨床試験スケジュール

	事前検査	抜歯施行	観察期間（20～24 週間）					
			抜歯施行翌日	1 週後	4 週後	8 週後	12～16 週後 インプラント埋入	埋入 8 週後
試験薬投与		●						
問診・アンケート	●			●			●	
採血		●	●	●				
単純X線写真	●	●			●	●	●	
CT 撮影	●						●	
骨組織採取							●	
2 次手術								●
ISQ 値測定							●	●

実施手順は以下の通りである（表 2）。
1）抜歯当日、約 30 ml 採血を行う。うち約 20 ml を自己フィブリンゲルの作成に使用し、10 ml を腎機能・肝機能検査に使用する。また、表 2 に示すように、再来時採血を行い、リチウム血中濃度測定および腎機能・肝機能検査を行い、安全性を評価する。
2）インプラント埋入予定部位の抜歯を局所麻酔下に行い、抜歯窩に生理食塩水に溶解し、滅菌処理を行った炭酸リチウム（プラセボ群では生理食塩水のみ）を混合させた自己フィブリンゲルを填入して縫合を行う。
3）単純 X 線写真を経時的に撮影し、骨形成状態を評価する。抜歯部位の CT 撮影を 12 週後に行い、インプラント体埋入部位の骨の CT 値（HU:ハンスフィールド値）とインプラント体外周 1mm の領域の CT 値を測定し、その平均値を算出した。
4）インプラント埋入時にトレフィンバーで骨組織を採取し、病理組織学的評価を行った。4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、PBS で洗浄後、10%EDTA 溶液で脱灰を施行。パラフィン包埋し、厚さ 5 μm の切片を作製し、Hematoxylin-Eosin（H-E）染色にて組織学的評価を行い、さらに非脱灰標本を Villanueva bone staining して骨形態計測を施行した。
5）埋入後 8 週で 2 次手術を施行し，共振周波数測定器を用いて、ISQ 値（インプラント安定指数）を測定し、埋入時に測定した ISQ 値との比較検討を行った。

４．研究成果
（１）動物実験モデルによる解析

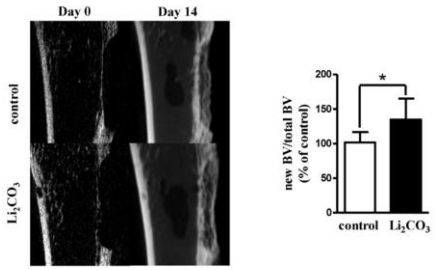

図2 マイクロCTによる骨形成の評価

CT 解析において、炭酸リチウム投与群では、新生骨量がコントロール群と比較して有意に多いことが分かった（図 2）。
非脱灰標本（Villanueva bone staining）による形態計測の結果を図 3 に示す。
欠損部の新生骨形成では、まず骨芽細胞により仮骨を形成する。外側性の仮骨は、自然光で骨面のほとんどが吸収面で、偏光では線維状骨が層板骨に全く置換されておらず、蛍光から石灰化が非常に幼弱であった。骨髄側への内膜骨形成（endosteal bone formation)は、層板骨に置換しており、皮質骨の再生を認めた。リチウムを投与している群ではコントロールに比べて骨が緻密に再生していた（BV/TV）。さらに、類骨形成が多く、骨形成が活発な部位（Endo Cortical Area ）と、構造的に元の皮質骨におおよそ再生されている部位（Intra Cortical Area)に分けて、層板骨と線維状骨の割合を計測した。Endo Cortical Area、Intra Cortical Area いずれにおいても炭酸リチウムを投与した群で層板骨の割合が多かった。また、カルセインによる二重標識を行い、蛍光で石灰化速度（MAR)を測定したところ、Endo Cortical Area、Intra Cortical Area いずれにおいても炭酸リチウムを投与した群で石灰化速度が遅かった。強度のある層板骨を形成するときは石灰化速度が遅くなる。これらのことから、リチウムを投与することで、強度のある骨再生が可能であることが示唆された。さらに、骨欠損周囲の海綿骨においても、炭酸リチウム局所投与で炎症反応による骨吸収が抑制されていることが示唆された。

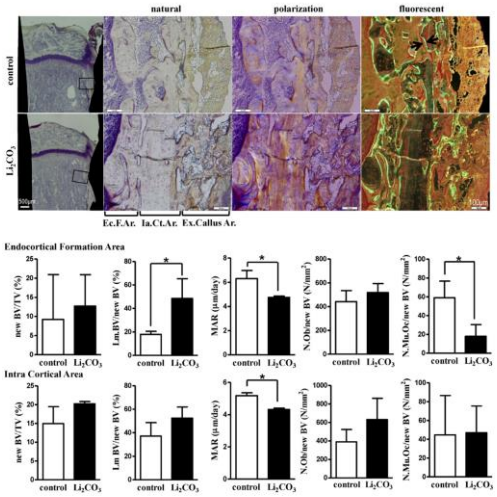

図3 非脱灰標本（Villanueva Bone staining）による骨形態計測

（２）臨床試験では、非投与群（3 人）と炭酸リチウム投与群（7 人）がエントリーしていたが、いずれの群も抜歯後に感染症を起こした症例はなく、治癒経過良好であった。その後、炭酸リチウム投与群の 1 mM 群で 1 人と 3 mM で 1 人が、歯周炎病態の悪化および治療計画変更によりドロップアウトしたため、炭酸リチウム投与群の 1 mM が 2 人、3 mM が 2 人、10 mM が 1 人の計 5 人となった。代表例の臨床試験の流れとその結果を図 4～図 9 に示す。

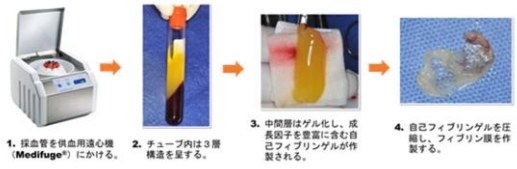

図4 自己フィブリンゲル作製

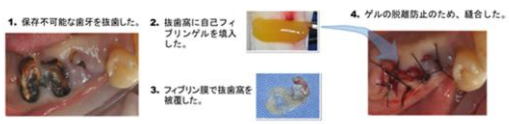

図5 抜歯と同時にフィブリンゲル填入

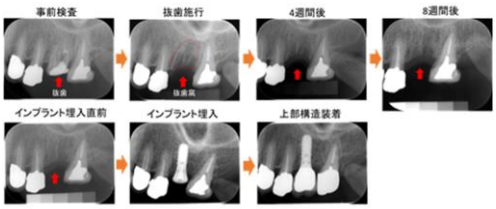

図6　単純X線写真による経時的変化の評価

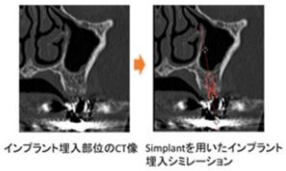

図7　CT画像による骨形成の評価

図8　骨採取による病理組織学的評価

図9　インプラント/骨結合の評価

下表に示すようにインプラント埋入直前の CT より解析した歯槽骨の CT 値は、炭酸リチウム 3 mM の群でややや高い傾向を示したが、炭酸リチウム 1 mM および 10 mM の群ではコントロール群よりも低い結果となった。インプラント埋入時の ISQ 値や埋入トルク値はいずれの群においても大差なく、十分な初期固定を得ることができた。抜歯から埋入までの日数は、炭酸リチウム投与群の 3 mM および 10 mM で短縮する傾向がみられた。

表3　インプラント埋入時評価

	埋入時 ISQ 値	埋入トルク(N)	抜歯から埋入までの日数(日)	インプラント体埋入領域 CT 値	インプラント体外周領域 CT 値
コントロール	78.87	31	156.67	476.99	474.17
炭酸リチウム 1mM	67	15	194.5	329.17	300.4
炭酸リチウム 3mM	78	35	129	513.84	595.72
炭酸リチウム 10mM	75.75	35	134	332.15	317.07

非脱灰標本を Villanueva bone staining し、骨形態計測を施行したデータを下表に示す。
炭酸リチウム投与が高濃度になるにつれ、骨芽細胞数が増加し、類骨量が増加し、骨梁数が増えることで、海綿骨が密になり、骨梁間隙が減少していた。破骨細胞数には明らかな影響は認めなかった。骨強度の指標となる層板骨量に関しては、炭酸リチウム投与によりむしろ減少する傾向となった。

表4　骨形態計測による評価①

	BV/TV	OV/TV	OV/BV	Tb.Th
	骨量(組織量)	類骨量(組織量)	類骨量(骨量)	骨梁幅
	%	%	%	μm
炭酸リチウム 1mM	42.6700	0.7470	2.0434	146.0251
炭酸リチウム 3mM	39.6058	0.788	1.9673	120.1683
炭酸リチウム 10mM	46.3236	2.4096	5.2016	111.2377

表5　骨形態計測による評価②

	N.Ob/BS	N.Oc/BS	Lamellar BV/BV	Tb.N	Tb.Sp
	骨芽細胞数(骨面)	破骨細胞数(骨面)	層板骨量(骨量)	骨梁数	骨梁間隙
	N/mm	N/mm	%	N/mm	μm
炭酸リチウム 1mM	4.3534	0.3584	47.1493	2.8775	235.0060
炭酸リチウム 3mM	3.5725	0.1882	52.3136	3.367	180.9841
炭酸リチウム 10mM	9.576	0.3302	36.4438	4.1643	128.8943

炭酸リチウムを抜歯窩に投与することで、抜歯窩治癒不全、肝機能および腎機能障害などの有害事象を生じることはなかった。血中のリチウム濃度もすべての症例において検出限界以下の量であり、炭酸リチウム局所投与における安全性が確認された。しかしながら、本研究は個体差の非常に大きな実験となるため、炭酸リチウムの骨形成促進効果の判定は被験者数を今後重ねていかなければ、明らかにはできないと考えている。

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　2　件）
① Arioka M, Takahashi-Yanaga F, Sasaki M, Yoshihara T, Morimoto S, Takashima A, Mori Y, Sasaguri T.
Acceleration of bone development and regeneration through the Wnt/β-catenin signaling pathway in mice heterozygously deficient for GSK-3β
Biochemical and Biophysical Research Communications. 440(4): 677-82, 2013.

② Arioka M, Takahashi-Yanaga F, Sasaki M, Yoshihara T, Morimoto S, Hirata M, Mori Y, Sasaguri T.
Acceleration of bone regeneration by local application of lithium: Wnt signal-mediated osteoblastogenesis and Wnt signal-independent suppression of osteoclastogenesis.
Biochem Pharmacol. 90(4):397-405, 2014

〔学会発表〕（計　4　件）
① 有岡将基，　佐々木匡理，　上妻亜也子
Glycogen synthase kinase-3β 阻害薬の骨形成促進薬としての可能性，
第 43 回日本口腔インプラント学会学術大会，福岡　2013.9/13-15.
② 有岡将基，　佐々木匡理，　森悦秀

Glycogen synthase kinase-3β(GSK-3β)阻害薬の骨形成促進薬としての可能性,
第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会,福岡　2013.10/11-13.

③ Arioka M, Takahashi-Yanaga F, Sasaki M, Inoue Y, Sasaguri T.
Acceleration of bone regeneration by local application of GSK-3 inhibitors.
EAO congress ROMA 2014. 9/25-27.

④ 有岡将基、高橋富美、佐々木匡理、上妻亜也子、森悦秀、笹栗俊之
歯科インプラント埋入のための抜歯窩治癒過程の経過観察－炭酸リチウム局所投与の効果評価のためのベースライン調査－
第 35 回日本臨床薬理学会学術総会　松山
2014.　12/5.

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0　件）

○取得状況（計　0　件）

〔その他〕
ホームページ等なし

６．研究組織
(1)研究代表者
佐々木　匡理（SASAKI Masanori）
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：30346803

(2)研究分担者
高橋　富美（TAKAHASHI Fumi）
九州大学・医学（系）研究科（研究院）・講師
研究者番号：　50274436

梶岡　俊一（KAJIOKA Shunichi）
九州大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授
研究者番号：　90274472