

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 25 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861897

研究課題名(和文)スタチン系薬剤の徐放システムによる顎骨再生とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文)Regeneration of jaw bone using sustained release system of statins; the mechanism of osteogenesis by statins

研究代表者

田辺 耕士(TANABE, Koji)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80638156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、高脂血症治療薬(スタチン系薬剤)の1つであるフルバスタチンを用いて、新しい骨再生材料の開発を行った。フルバスタチンを含むゼラチンハイドロゲル・スポンジを作成し、薬剤溶出特性を調べた。フルバスタチン含有ゼラチンハイドロゲル・スポンジは、水中で急速に溶解したが、ゼラチンとフルバスタチンの分子は結合した状態にあり、結合状態でも薬理活性を有していることが明らかとなった。さらに動物実験では、フルバスタチン含有ゼラチンハイドロゲル・スポンジは、低代謝型骨粗鬆症モデル動物において、新生骨の形成量を有意に増加させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop the new osteogenic drugs with the HMG-CoA reductase inhibitors. The fluvastatin-gelatin complex sponge was prepared and investigated in vitro. The results showed that a molecule of gelatin has coupling ability for a specific amount of fluvastatin. In addition, the fluvastatin-gelatin complex had the osteogenic activity through the inhibition of HMG-CoA reductase. In animal experiment, the fluvastatin-gelatin complex sponge significantly enhanced osteogenic effect on low-turnover osteoporosis model mouse.

研究分野：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：スタチン 骨再生 骨補填剤 骨 骨粗鬆症

### 1. 研究開始当初の背景

歯科領域において骨の再建は、抜歯窩やインプラント治療、歯周病治療において重要な課題である。骨欠損部における骨造成術には従来、自家骨移植法やビスホスホネートによる治療が行われてきたが、前者は骨採取が安易には行えず、後者は副作用として感染性の骨壊死が問題となっている。これらの方法に代わる方法として、成長因子を用いる新しい骨再生材料の開発が活発に行われてきた。この成長因子の中で最近注目を集めているのが、骨形態蛋白質-2(BMP-2; bone morphogenetic protein-2)の発現を誘導することで骨再生を促進することが報告されているスタチン系薬剤である。スタチン系薬剤は、長年のわたり高脂血症治療薬として使用されている実績があり、コストや安全性の面からも、臨床応用への期待が高まっている。近年数多くのスタチン系薬剤の骨再生能に関する報告がなされているが、歯科領域において臨床応用には至っていない。その理由の一つとして考えられるのが、スタチン系薬剤応用時に用いる担体開発の難しさである。人の骨の修復は術後1週間程度から始まるため、スタチン系薬剤の効果も骨の修復開始に合わせて作用させることが求められる。しかし、術後1週より毎日局所投与を行うことは临床上困難である。経口投与で血中の薬剤至適濃度(1 $\mu$ M)を保つには、過量投与になるおそれがある。そこで、薬剤徐放性を持つ担体が必要となってくる。担体には長期間薬剤を担持するために、生体による分解に耐えうる強度が求められる。一方で、生体にとってあくまでも異物である担体が長期に残留した場合、治癒の妨げとなってしまう。これまで様々な生体材料を担体として用いた実験が行われてきたが、未だ決定的な担体は開発されるに至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、近年骨再生能が見出され注目を集めている高脂血症治療薬(スタチン系薬剤)を用いて、新しい骨再生材料を開発することである。既に我々の研究により、スタチン系薬剤と薬剤徐放性をもつゼラチンハイドロゲルを組み合わせることで、頭蓋骨膜下で、自然治癒を上回る速度で骨を再生させられることを見出した。しかし、抜歯窩やインプラントといった海綿骨部の骨再生が必要とされる治療に応用するには、骨再生能が十分確認できたとはいえない。そこで、臨床応用に向けた第2段階として、動物の海綿骨部に、このスタチン系薬剤を用いた骨再生材料を適応し、その効果の確認とメカニズムの解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) スタチン系薬剤を含有するゼラチンハイドロゲル・スポンジを作製する。

(2) 得られたゼラチンハイドロゲル・スポンジからの薬剤溶出特性を調べる。純水およびリン酸緩衝液に lipase を混合した溶液にゼラチンハイドロゲル・スポンジを入れ、経時的に両溶液内のスタチン系薬剤の濃度を計測する。

(3) スタチン系薬剤含有ゼラチンハイドロゲル・スポンジの、海綿骨内での効果を確認と、骨再生メカニズムの解明を行う。ラット大腿骨に骨欠損を作製し、マイクロCTを用いて経時的に個体的な観察を行う。同時に別個体で欠損部の切片を作製し、免疫染色法を用いてBMP-2をはじめとした各増殖因子の局在を経時的に検索することで、スタチン系薬剤の骨再生メカニズムの解明を行う。

### 4. 研究成果

スタチン系薬剤の一つであるフルバスタチンを含有するゼラチンハイドロゲル・スポンジを作成し、薬剤溶出特性を調べた。フルバスタチンを含有するゼラチンハイドロゲル・スポンジは水中で急速に溶解したが、スポンジ溶解後もゼラチンとフルバスタチンの分子は結合した状態にあり、ゼラチンは、3mg/ml 当たり 291  $\mu$ M のフルバスタチンを結合できることが明らかとなった。(図1)

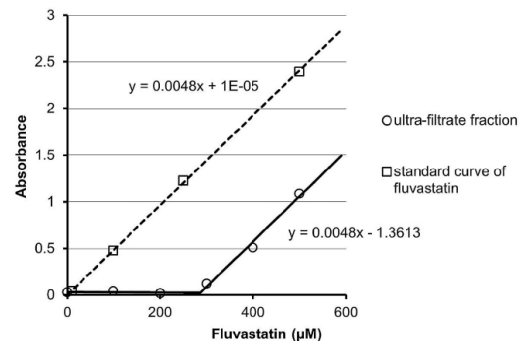


図1

また、結合状態でも薬理活性を有していることが明らかとなった。(図2)

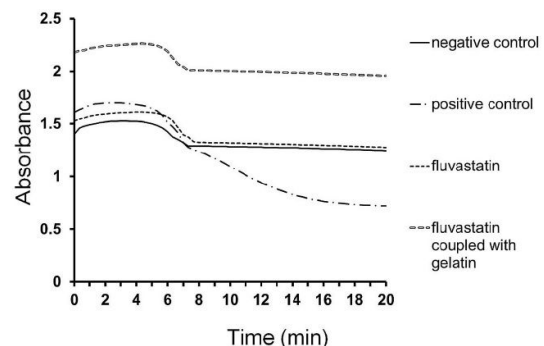


図2

この結果、フルバスタチンは、巨大分子であるゼラチンに結合することで、血流に流されることがなく局所に長期間留まることが明らかとなった。

さらに動物実験を行い、フルバスタチン・ゼラチン結合物の、生体内での骨形成能を検証した。高血圧自然発症ラットを低代謝型骨粗鬆症モデルとして用い、フルバスタチン・ゼラチン結合物を大腿骨に埋入した。骨形成の経時的な観察と定量化を行い、併せて骨形成領域の病理組織学的観察も行った。その結果、観察した全てのラットで、フルバスタチン・ゼラチン結合物が投与された領域で、新生骨形成と骨形成量の増加が有意にみられた。(図3)

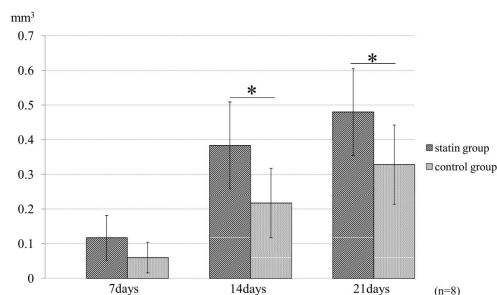


図3

次に、低代謝回転型骨粗鬆症モデルマウスを用いて、効果と濃度依存性についても検討した。正常マウスと低代謝回転型骨粗鬆症モデルマウスに、それぞれ濃度の異なる3種類のフルバスタチン・ゼラチン結合物を埋入し、骨形成の経時的な観察と定量化を行った。その結果、正常マウスと低代謝回転型骨粗鬆症モデルマウスでは、至適濃度が異なることが明らかとなった。(図4)

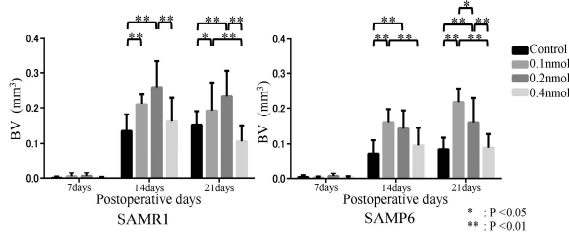


図4

### 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)

Tanabe K, Miura T, Yoshinari M. Electrostatically Coupled State of Fluvastatin with Gelatin in Vitro. Journal of Hard Tissue Biology. 2013;22(4):451-4. 査読有

Yasuda H, Tanabe K, Sato T, Nomoto S, Miura T, Yoshinari M. Osteogenic Effect of Local Administration of Fluvastatin using a Fluvastatin-gelatin Complex in Senile Osteoporosis Model Rat. Journal of Hard Tissue Biology. 2014;23(4):389-98. 査読

有

Ohira T, Tanabe K, Sasaki H, Yoshinari M and Yajima Y. Effect of Locally Applied Fluvastatin in Low-turnover Osteoporosis Model Mouse with Femur Bone Defect. Journal of Hard Tissue Biology. 2015;24(2):in print. 査読有

〔学会発表〕(計 4件)

田辺耕土, 三浦直, 吉成正雄: ラット頭蓋冠におけるフルバスタチンの骨形成促進効果, 歯科学報, 113(2), 2013 (第295回東京歯科大学学会 2013年6月1日、千葉)

H. YASUDA, K. TANABE, M. HARA, T. SATO, M. YOSHINARI Osteogenic effect of fluvastatin local-administration in senile osteoporosis model rat. (2nd Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region. 21-23, August, 2013. Bangkok, Thailand.)

安田博光, 田辺耕土, 佐藤亨, 吉成正雄, : 骨粗鬆症モデルラットの骨形成に及ぼすフルバスタチン局所投与の影響, 日本口腔インプラント学会学会誌第26巻特別号, 270, 2013. (第43回日本口腔インプラント学会学術大会, 2013年9月13-15日、福岡)

大平貴士, 田辺耕土, 佐々木穂高, 吉成正雄, 矢島安朝, : 老人性骨粗鬆症モデルマウス(SAMP6)大腿骨骨欠損の治癒に与えるフルバスタチン局所投与の影響, 日本口腔インプラント学会学会誌第26巻特別号, 277, 2013. (第43回日本口腔インプラント学会学術大会, 2013年9月13-15日、福岡) 〔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:

出願年月日:

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

田辺 耕士 (TANABE, Koji)  
東京歯科大学薬理学講座・助教

研究者番号：80638156

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：