

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 29 日現在

機関番号：32667

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893264

研究課題名(和文) シンバスタチン徐放による直接覆髄モデルラットの修復象牙質促進効果評価

研究課題名(英文) The evaluation of the promotion of secondary dentin by controlling release of simvastatin

研究代表者

宮澤 敦子 (Miyazawa, Atsuko)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：00706997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：難水溶性のシンバスタチン(ST)を徐放するために、まず、乳酸オリゴマーグラフトゼラチンを使用しシンバスタチンミセル(ST Mi)を作製した。また、ST Miをゼラチンハイドロゲル(GH)に内包し、シンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲル(ST Mi/GH)を作製した。この時、架橋度をコントロールすることで分解性と徐放性の異なる多様なST Mi/GHを作製した。最も象牙芽細胞分化に効果的なST Mi/GHを検討するためin vitroの歯髄細胞との共培養実験を行ったところ、2週間分解性で最も高い分化能を示した。現在2週間分解性のST Mi/GHを用いてラット直接覆髄モデルで評価を行っている。

研究成果の概要(英文)：Simvastatin (ST) was incorporated into the micelles of gelatin grafted with L-lactic acid oligomers (LAo) to allow water-solubilization. The simvastatin-LAo-grafted gelatin (LAo-g-gelatin) micelles were mixed with gelatin, followed by chemical crosslinking to form gelatin hydrogels (ST Mi/GH). The ST Mi were released from the gelatin hydrogel granules (GH) through enzymatic degradation. From the in vitro experiments, the most effective ST Mi/GH for odontoblastic differentiation was that of 2 weeks degradation. In addition, the ST in the micelle form exhibited biological activities to induce ALP activity, calcium deposition and BMP-2 production in vitro. Now the in vivo experiments are evaluated. The quality and quantity of dentin tissue formed should be evaluated using dental pulp capping models and comparing with those of other pulp-capping materials.

研究分野：drug delivery system

キーワード：徐放 シンバスタチン 歯髄細胞 象牙芽細胞 硬組織再生

1. 研究開始当初の背景

今回は開発したシンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲルを使用し、ラットの臼歯部直接覆髄モデルにおける修復象牙質形成促進の評価ならびに形成された修復象牙質の性質について、既存の直接覆髄材との比較・検討を行う。ゼラチンハイドロゲルを使用した薬剤の局所徐放は、生体内のコラゲナーゼによるゼラチンハイドロゲルの分解と共に、ゼラチンハイドロゲルに内包された薬剤が放出するというメカニズムによって行われる。薬剤の局所徐放を行うことにより、より低濃度で長期間、効率的に薬剤を作用させることが可能となり、それに伴い副作用も軽減されるという利点がある。さらに、生体安定性、生体吸収性を持つゼラチンハイドロゲルの架橋度をコントロールすることによりゼラチンハイドロゲルの分解速度をコントロールすることができる。そのため多様な徐放プロファイルを再現することが可能となる。そこで、今回のラット直接覆髄モデルで使用するゼラチンハイドロゲルの徐放プロファイルを変化させることで修復象牙質の形成促進、ならびに形成された修復象牙質の性質にどのような違いがあるのかも比較する。また、シンバスタチンの徐放プロファイルを変化させることによって歯髄細胞から象牙芽細胞への分化度がどのように変化するかを歯髄細胞とシンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲルの共培養によって *in vitro* で評価する。さらに、シンバスタチンには骨形成能の他に血管新生作用、抗炎症作用、神経細胞の新生作用などの報告もされている。そのため、修復象牙質の形成促進のみでなく、様々な目的でこのシンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲルを使用することが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

現在、臨床現場において偶発的露髄が生じた際、水酸化カルシウム製剤である Dycal[®] が使用されていることが多い。しかし、水酸化カルシウムは強アルカリ性であるために直下の歯髄に壊死層を形成したり、修復された象牙質が脆かったり、炎症反応を惹起したりと様々な欠点が挙げられている。そこで申請者は新しい直接覆髄剤として脂質異常症の治療薬であるシンバスタチンを使用し修復象牙質の形成を試みた。また、歯髄細胞から象牙芽細胞への分化には骨形成タンパク質 (BMP) -2 (以下 BMP-2 とする) が必要となるが、シンバスタチンは骨形成能を示す際にも BMP-2 の発現を促進することがわかっている。そこで本研究では、直接覆髄モデルラットを用いて歯髄細胞にシンバスタチンを局所徐放することにより、BMP-2 の発現をさらに促進させて修復象牙質の形成促進を試みる。

3. 研究の方法

(1) シンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲルの作製

乳酸オリゴマーグラフトゼラチンでシンバスタチンを水可溶化しシンバスタチンミセルを作製する。水可溶化には分子量 1000 の乳酸オリゴマーと等電点 5.0 の牛骨由来ゼラチンで作製した乳酸オリゴマーグラフトゼラチンを使用する。シンバスタチンミセルを等電点 9.0 豚皮由来のゼラチンに内包しグルタルアルデヒドで化学架橋をすることでシンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲルを作製する。この際、今回は直接覆髄モデルラットを使用して動物実験を行うため、操作性を重視した形状にする。

グルタルアルデヒドの架橋度を変化させることで徐放のプロファイルを変化させる。

(2) シンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲルの分解性試験ならびにシンバスタチン徐放試験

シンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲルの分解性試験と徐放試験を *in vitro* で行う。ゼラチンハイドロゲルの架橋度を変化させることでゼラチンの分解性が変化し、それに伴いシンバスタチンの徐放性が変化することを確認する。*in vitro* ではコラゲナーゼを用いてゼラチンの分解性ならびにシンバスタチンの徐放性の相関評価を行う。シンバスタチンの定量は吸光度計ならびに高速液クロマトグラフィーを使用する。

(3) シンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲルを用いた歯髄細胞培養実験

シンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲルとマウスの歯髄細胞を共培養する。

どの段階で歯髄細胞に与えるシンバスタチンの作用が最も効果的に象牙芽細胞への分化を導くのかをマウス歯髄細胞を用いて比較・検討する。評価は ELISA 法とリアルタイム RT-PCR 法で象牙芽細胞の分化マーカーを用いて行う。

(4) 直接覆髄モデルラットを用いた修復象牙質の形成促進効果評価

ラットの上顎臼歯部に露髄部を形成し、既報告の方法に従い直接覆髄モデルラットを作製する。覆髄材としては、本研究で作製する架橋度の異なるシンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲル、コントロールとしては現在臨床現場で使用されている水酸化カルシウム製剤である Dycal[®] を使用する。評価は露髄部の組織学的染色により修復象牙質の形成量、また形成された修復象牙質の質についてはアパタイトの配行性や強度の比較も行う。

4. 研究成果

(1) シンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲル作製のために乳酸オリゴマーグラフトゼラチンを作製した。次に作製した乳酸オリゴマーグラフトゼラチンを用いて難水溶性のシンバスタチンを水可溶化しシンバスタチンミセルを作製した。その後、シンバスタチンミセルを等電点9.0豚皮由来のゼラチンに内包しグルタルアルデヒドで化学架橋することでシンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲルを作製した。この時グルタルアルデヒドの濃度を変化させることによってさまざまな分解性のシンバスタチンミセル含有ゼラチンを作製し、シンバスタチンの徐放期間をコントロールした。

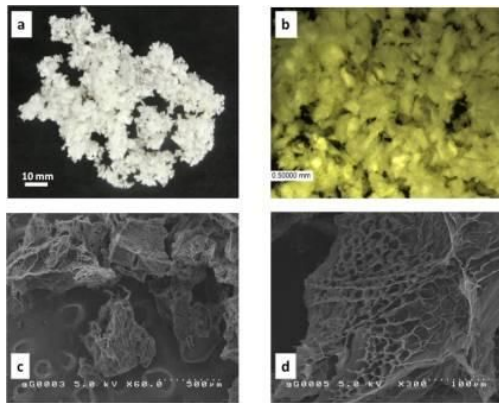


Fig.1 ゼラチンハイドロゲルの表面性状

(2) このさまざまな架橋度のシンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲルを *in vitro* で評価したところ、シンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲルの分解とともにシンバスタチンミセルが徐放されていることが確認された。また、グルタルアルデヒドの濃度（架橋度）によってシンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲルの分解性をシンバスタチンの徐放性がコントロールできることを確認した。

(3) 作製した架橋度の異なるシンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲルとマウス下顎臼歯部より単離した歯髄細胞を共培養することでシンバスタチンミセルの活性を評価した。その結果、2週間分解性（グルタルアルデヒド濃度：0.25vol%）のシンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲルで有意に高いアルカリホスファターゼ活性、カルシウム濃度および BMP-2 濃度を示した。このことから歯髄細胞が象牙芽細胞に分化するのに必要なシンバスタチンの徐放期間は約2週間であるということが分かった。またシンバスタチンが歯髄細胞の BMP-2 分泌を促進することで象牙芽細胞分化に効果的に働くということも確認された。

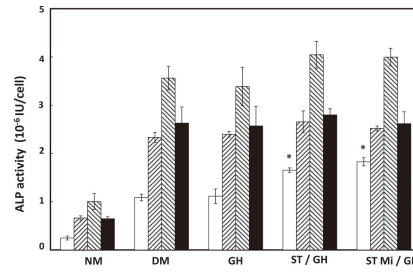


Fig.2 ALP 活性

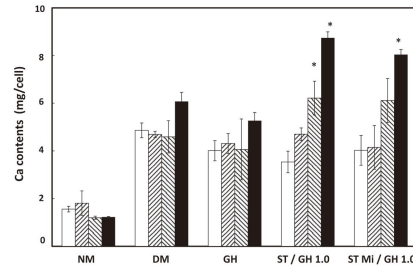


Fig.3 Ca 濃度

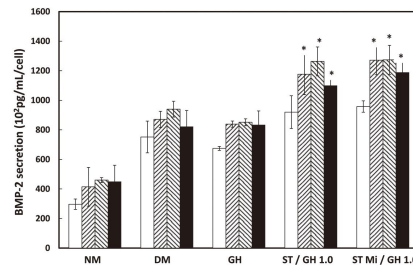


Fig.4 BMP-2 濃度

(4) 現在、ラット直接覆髄モデルでの評価を行っている。直接覆髄材としての操作性についてさらに検討していく必要があると思われる。

(5) また現在、シンバスタチンの BMP-2 分泌促進能に注目し、作製したシンバスタチンミセル含有ゼラチンハイドロゲルの骨再生への応用も視野に入れて研究を進めている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

発表者：宮澤敦子

発表表題：Development of the HA composite for the prevention of BRONJ

学会名：2014 ANNUAL MEETING

発表年月日：2014年9月8日～2014年9月13日

発表場所：Hawaii Convention Center (Honolulu, Hawaii, US)

発表者：宮澤敦子
発表表題：BRONJ 予防のための HA 複
合体の開発
学会名：第 35 回日本炎症・再生学会
発表年月日：2014 年 7 月 1 日～2014 年
7 月 4 日
発表場所：万国津梁館（沖縄県名護市）
発表者：宮澤敦子
発表表題：BRONJ を予防するための HA
複合体の開発
学会名：第 34 回日本歯科薬物療法学会
発表年月日：2014 年 6 月 20 日～2014
年 6 月 21 日

〔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

宮澤敦子 (Atsuko MIYAZAWA)
日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：00706997

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：