

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：31602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791862

研究課題名（和文） スタチンとMTAの併用による歯牙と歯周組織の再生作用

研究課題名（英文） Regenerative effects of statin and MTA on teeth and periodontal tissue.

研究代表者

前田 豊信（MAEDA TOYONOBU）

奥羽大学・歯学部・助教

研究者番号：10382756

研究成果の概要（和文）：MTA セメントとスタチンは、骨芽細胞および未分化間葉系細胞を石灰化に向けて分化を非常に強く誘導した。その石灰化は非常に早くに生じ、アルカリフォスファターゼやオステオポンチン遺伝子発現の有意な促進を介していた。しかし、この石灰化は、コラーゲン蓄積を伴わないものであった。本研究で観察された、スタチンの石灰化促進は、MTA セメントと比較して強いものではなかった。ただし、スタチンには未分化間葉系細胞に対して脂肪細胞の分化を強力に抑制し、骨芽細胞へ誘導する作用があることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Mineral trioxide aggregate and statins strongly induce mineralization in osteoblasts and stem cells. MTA promoted the gene expression of alkaline phosphatase and osteopontin and enhanced alkaline phosphatase activity throughout the culture period, whereas it markedly inhibited the gene expression of type I collagen. In this study, promoted mineralization of statins, was not strong compared with MTA. However, statin stimulated osteoblastic differentiation while inhibited adipocyte differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物系

科研費の分科・細目：医歯薬学・歯学・保存治療系歯学

キーワード：MTAセメント スタチン

## 1. 研究開始当初の背景

スタチン（3 - Hydroxy - 3 - methylglutaryl - CoA（HMG-CoA）reductase inhibitors）は、高脂血症治療として広く臨床で用いられている。このスタ

チンによる、骨芽細胞での BMP-2 発現促進作用は、Mundy らによって、1999 年に報告された。この報告を受け、私は、スタチンが骨芽細胞において BMP-2 のみでなく、アルカリフォスファターゼ・オステオカルシンなどの骨

代謝マーカーの発現促進を伴い、著しい石灰化促進作用があることを示した。これは、MMP-13 の発現抑制による I 型コラーゲンの蓄積が原因の 1 つであり、VEGF の発現亢進を伴うことも示した。この作用機序は、HMG-CoA 還元酵素の阻害により、メバロン酸とゲラニルゲラニルピロリン酸の合成を抑制し、それが Rho のプレニレーション抑制に至っていることがその原因であることを解明した。さらに、スタチンはサイトカインの産生およびその働きを抑制する事が知られており、抗炎症薬としての臨床応用も考えられている。

1993 年に米国で Mahmoud Torabinejad により開発された MTA (Mineral Trioxide Aggregate) セメントは、海外で根管封鎖材としての臨床使用報告が数多くなされている非常に成績の良い材料である。MTA はセメント芽細胞の増殖と石灰化を促進することが分かっているが、この現象は MTA の表面微細構造に起因するところが大きいと考えられている。

歯内療法の成功率は 90%以上とされるが、再歯内療法の成功率は 50~70%と低い。この理由は医原性を含む、根管の形態的要因や細菌学的要因などが考え得る。

そこで、スタチンと MTA と併用すると、その相加効果（または相乗効果）を発揮するであろうことを機体して、これらの作用を詳細に解析した。あわせて、この作用機序の解析を試みた。

## 2. 研究の目的

スタチンは、臨床で汎用されているため、現在市販されているスタチンは、ある一定以上の安全性が確認されている。一方、メバロン酸代謝経路の抑制によって生ずる pleiotropic effects として、抗炎症作用・骨形成促進作用・冠動脈イベントのリスク低下等が多数報告されており、それらの全容解明には未だ至っていない。

また MTA セメントも大変優れた臨床結果を残している。この作用機序に関しては、MTA のアルカリ性によるものや、その表面粒状性によるものなど様々な研究がなされているが、作用機序は依然として不明な部分が多い。

そこで本研究では、次の 3 点を目的とした。第一に MTA セメントの石灰化機序の解析。次にスタチンの pleiotropic effects としての骨形成促進機序・脂肪分化抑制機序の解析。最後にスタチンの歯科臨床応用（特に根管封鎖や歯周組織治癒促進・再生）を目的とし、MTA セメントとスタチンの存在下で、細胞の分化とその石灰化過程につき調査を行った。

現在、歯牙を含む硬組織の再生医療の研究は非常に進んでいるが、「石灰化を早める」ことは非常に重要なものであると考える。

## 3. 研究の方法

本研究では、結果を鮮明にするために、株化された培養細胞と、骨髄由来の未分化間葉系細胞をおもに用いた。

最初に培養上清にスタチン、または、各種キナーゼのインヒビターなどを添加して、phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) や Protein kinase A が石灰化と脂肪分化に与える影響について解析を行った。このことで、一般的な細胞分化の中での、PI3K の役割を解析しようと試みた。

次に、MTA セメントの主要な作用である、石灰化促進機構を解析した。当初は、より臨床的な再現実験を考え、硬化させた MTA セメントを disk 状にして、その周囲または表面で細胞培養を行った。これにより MTA セメントを足場として、細胞の接着と分化に及ぼす影響を形態的・機能的に解明を試みた。

さらに、局所から少し離れた場所に作用する MTA の影響を考慮し、コロイド状にした MTA セメントを培養上清中に添加した。そして、石灰化促進能、および分化マーカーの発現を解析した。この結果を上記のものと比較検討を行うと共に、この作用機序の発現に関して、各種インヒビターを用いて、網羅的に解析を行った。

最後にこれらの結果をもとに、MTA セメントとスタチンとの併用を行い、その石灰化形成促進能について、評価を行った。MTA セメントとスタチンで、強く影響を及ぼす分化段階が異なるために、非常にゆっくりと分化する骨芽細胞を用いて、分化ステージごとに、与えられる影響について、詳細に比較検討した。

## 4. 研究成果

細胞培養上清中に添加したスタチンは、多分化能を持つ間葉細胞に対して、脂肪分化能を強く抑制をした。これは脂肪滴の蓄積も抑制を伴うものであった。さらに、Ccaat-enhancer-binding proteins beta、Lipoprotein lipase などの分化マーカーの発現抑制も著しく抑制した。ところが、これらの細胞に対して、同じスタチンは骨形成・石灰化粒の形成を促進させた。また、骨形成マーカーの発現も BMP-2 の誘導を伴い、促進させた。これにはオステオカルシンも含まれた。そこで PI3K のインヒビターである LY29402 を添加すると、これらの作用は著しく抑制を受けた。この結果から、PI3K は、BMP-2 あるいは C/EBP  $\beta$  などの、初期分化マーカー誘導を増強させる役割があると推察される (Fig. 1、2)。

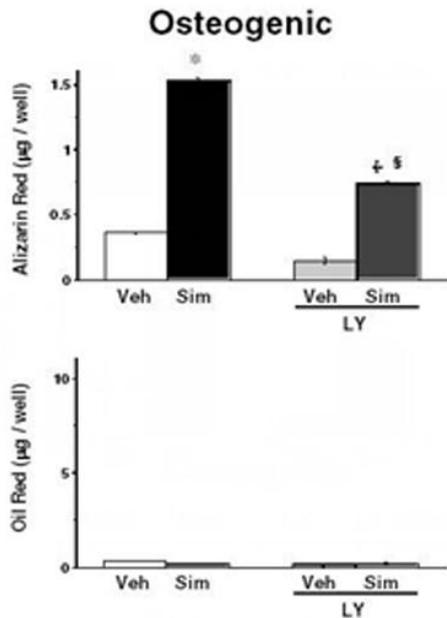


Fig 1

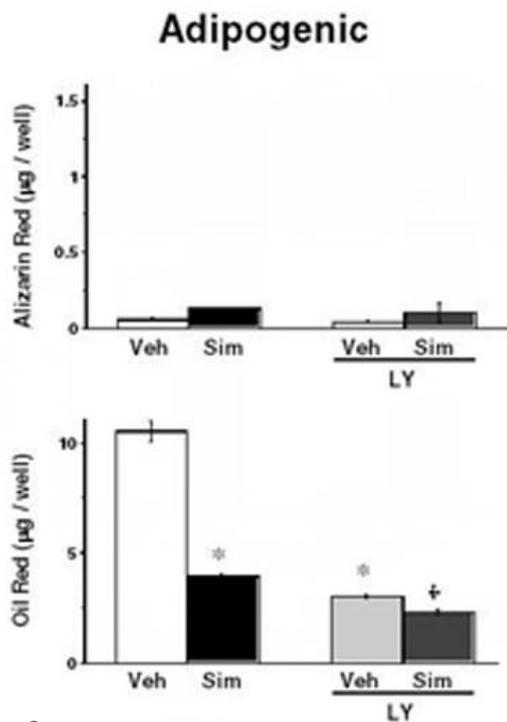


Fig 2

硬化したMTAセメントでは、付近の細胞は、強くアポトーシスが誘導された。しかし、MTAから適切に離れた（このアポトーシスを逃れた）細胞では、非常に初期から、大変強い石灰化促進作用が確認された。

またこれらの細胞の分化マーカーを解析すると、全期にわたり誘導が確認されたが、とりわけ一般的に、後期に誘導されるはずの分化マーカーが、初期に大きく変化することが確認された (Fig 3, 4)。

これはMTAセメントが、単にアルカリ性の性質を有しているからだけではないと考えられる。それは、まず、MTAセメントを十分に浸漬してから使用していること。48時間インキュベーションした培地であっても、pHがインキュベーション前よりも高くなるということは無かったことからである

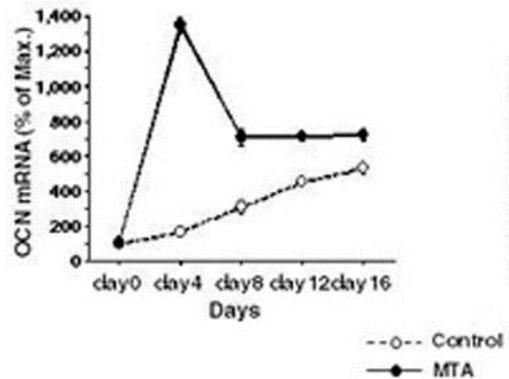


Fig 3

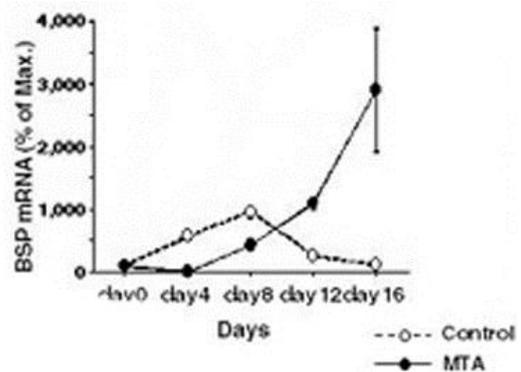


Fig 4

アスコルビン酸とβ-グリセロリン酸を豊富に含む培地で、骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞や、骨髄由来間葉系細胞ST2細胞を培養すると、3-4週間で石灰化が観察される。通常観察されるこの石灰化は、非常に多くのI型コラーゲンの蓄積を伴う。しかし、本研究で観察された、MTAセメントによる石灰化促進では、培養1週間以内に石灰化粒が観察された。さらにこれは、コラーゲンの蓄積を伴うものではなかった (Fig 5)。

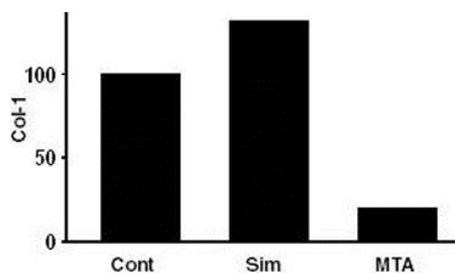


Fig 5

コロイド状にした MTA セメントを添加する場合、濃度によって disk 状に硬化した MTA セメントと同様の効果が観察された。

細胞に傷害の与えない濃度（増殖を阻害しない濃度）まで希釈を行った MTA セメントを添加し、培養を行った場合には、アルカリフォスファターゼやオステオポンチン遺伝子発現など、後期の分化マーカーを、培養の初期ステージから強く誘導することに関しては、上記と同様の結果が観察された。しかし、この条件で培養を行うと、後期（4 週後）では、石灰化の促進が有意に促進することが観察できた。また、ここで観察された石灰化は、I 型コラーゲンの十分な増殖を伴うものであり、より生理的に近いものであることが判明した。

しかし、培養初期から、MTA セメントとスタチンを同時に添加した場合には、分化・石灰化に対する、相加効果または相乗効果は観察できなかった (Fig6)。

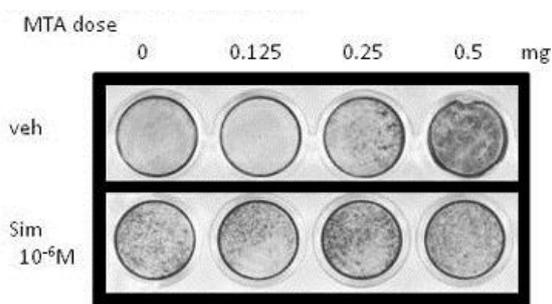


Fig 6

最後に、分化のステージごとに MTA セメントとスタチンが、分化石灰化に及ぼす影響について詳細に解析を行った。その結果、MTA セメントは、骨分化の初期から、強力に後期分化マーカーの発現を促進させることが判明した。すなわち、MTA セメントは、分化の初期に非常に強く影響を及ぼす。これに対して、スタチンは、BMP-2 の誘導なども起こすが、むしろ、分化の中期から後期に与える影響が強かった。これは、BMP-2 非依存性の分化マーカーの誘導によるものであると考えられる。

MTA セメントは、確かに *in vitro* においても、強力な石灰化誘導をしめした。しかし、その石灰化はコラーゲン蓄積を伴わないものである。従って、臨床的に考えると、根周囲の微小な骨吸収に対しては、非常に有効である。しかし、決して万能ではなく、比較的大きな歯槽骨吸収に対しては、MTA セメント単独ではなく、その他のアプローチの併用が必要となってくると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- ① Tsuji K, Maeda T, Kawane T, Matsunuma A, Horiuchi N. Leptin stimulates fibroblast growth factor 23 expression in bone and suppresses renal  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D3 synthesis in leptin-deficient mice. *J Bone Miner Res.* 2010 査読あり 1711-1723.
- ② Maeda T, Horiuchi N. Simvastatin suppresses leptin expression in 3T3-L1 adipocytes via activation of the cyclic AMP-PKA pathway induced by inhibition of protein prenylation. *J Biochem.* 2009 査読あり 771-781

〔学会発表〕 (計 8 件)

- ① 加藤 靖正, 前畑 洋次郎, 前田 豊信, 畑 隆一郎, オステオネクチンノックアウトマウスの肺における遺伝子発現のプロファイル, 第 53 回歯科基礎医学会、平成 23 年
- ② 今井 啓全, 前田 豊信, 山田 眞義, 木村 裕二, 斎藤 高弘, 天野 和義, 酸化チタン含有試作合成 MTA セメントによる MC3T3-E1 細胞の分化促進作用, 135 回日本保存学会、平成 23 年
- ③ 今井 啓全, 千葉 有, 前田 豊信, 山田 眞義, 木村 裕二, 天野 和義, 各種試作合成 MTA セメントによる培養細胞に及ぼす影響, 134 回日本保存学会、平成 23 年
- ④ 山崎 信夫, 今井 啓全, 木村 裕一, 前田 豊信, 天野 和義, 逆根管充填材としての MTA の封鎖性に血液が及ぼす影響, 132 回日本保存学会、平成 22 年
- ⑤ 前田 豊信, 堀内 登, 加藤 靖正, ST2 細胞において Simvastatin は骨分化を促進し 脂肪分化を抑制する, 日本結合組織学会、平成 22 年
- ⑥ 堀内 登, 前田 豊信, レプチンによる骨の FGF23 合成を介した  $1\alpha$ -水酸化酵素発現抑制, 第 31 回東北骨代謝研究会、平成 22 年
- ⑦ 前田 豊信, 堀内 登, スタチンによるレプチンの合成抑制機構, 日本生化学会東北支部 第 75 回例会、平成 21 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前田 豊信 (MAEDA TOYONOBU)  
奥羽大学・歯学部・助教

研究者番号：10382756

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

堀内 登 (Horiuchi Noboru)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：00107294

(平成22年8月10日退職)

加藤 靖正 (Kato Yasumasa)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：50214408

木村 裕一 (Kimura Yuichi)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：60211877