

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390445

研究課題名(和文) 骨増生の予知性を高める新規手法の開発とその効果の検討

研究課題名(英文) Development of the novel bone augmentation procedure

研究代表者

鮎川 保則 (AYUKAWA, YASUNORI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：50304697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円、(間接経費) 3,690,000円

研究成果の概要(和文)：補綴治療は歯槽骨・顎骨の状態によって成否が大きく影響される。そのため、補綴前処置としての骨の増生は重要であり、より患者の負担が少ない方法が多方面より模索されてきているが、まだ問題も多い。本研究では、軟組織の治癒を促進し、感染制御可能かつ骨形成を促進することができる手法をスタチン系高脂血症治療薬を用いて開発することを目的とした。その結果、ポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体をシート状に加工したものにスタチンを含浸させ、軟組織、硬組織両者の治癒が促進できることが示唆された。同様に、当研究グループで開発したアパタイト系骨補填材にスタチンを含有することで、骨形成が促進されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The outcome of prosthodontic treatments depends upon both quality and quantity of the alveolar or jaw bone. Thus, bone augmentation procedure as a preprosthodontic treatment is considered to be important and the development of the patient-friendly procedure has been expected. In the present study, we aimed at the establishment of novel procedure by which accelerated healing of both soft and hard tissue could be accomplished using statins, a group of drugs for cholesterol-lowering. As a result, using sheet-like poly(lactide-co-glycolide) with statin both soft and hard tissue healing could be enhanced. In addition, we developed novel statin-impregnated apatite material by which accelerated bone healing was observed.

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：骨増生 インプラント 骨補填材 GBR

1. 研究開始当初の背景

近年では、歯科補綴学関連学会においても再生医学、組織工学を用いた研究に対して賞や助成金を授与するなど、その重要性が高まっている。特に補綴領域では、ブリッジの設計や咬合圧の負担を考えた場合の歯の骨植、安定した義歯、インプラントの初期固定や長期予後など、補綴治療のすべてが歯槽骨・顎骨と非常に強く関連しており、硬組織の再生工学と補綴が切り離せないのは疑う余地がない。

補綴領域に関連する骨の治療は、

- ・骨を削除する治療（例：義歯作製に先立つ鋭縁や骨隆起の除去）
- ・骨を増加させる治療

に分類可能である。特に後者についてはこれまでに多種多様な研究がなされているものの、どの方法にも大きな短所があるため、更なる発展が望まれている領域であるといえる。

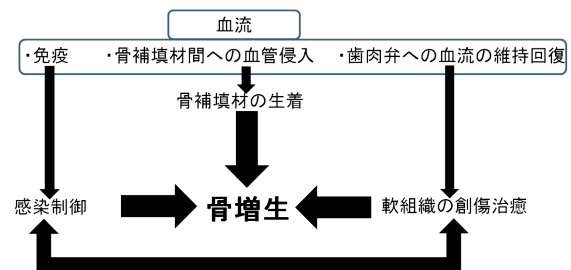
これまでの「骨を増加させるアプローチ」は、骨や骨に類似した物質を移植する手法に限られていた。しかもこれらの手法には種々の欠点がある。一方、これらとは別に、骨誘導能を有する物質の応用についても長い間検討され続けてきた。その嚆矢は BMP-2 の発見 (Urist, 1965) であるが、それ以降今日まで bFGF (Rodan ら, 1989)、TGF- β (Joyce ら, 1990) 等種々のタンパクが骨誘導能を有するとして報告されてきた。しかし、いずれも未だに骨再生治療のゴールドスタンダードとなり得てはいない。また近年、骨誘導を促進する薬剤が報告され、応募者は高脂血症治療薬であるスタチン系薬剤が骨形成を促進することを報告した (Ayukawa ら, 2004, 2008ab, 2009abc, 2010)。また、骨を増加させるアプローチにおいては、移植材の填入に伴う軟組織の不足および血流不全に伴う創の裂開および感染を常に考慮に入れる必要があり、またこのことが骨増生術の成否を大きく左右することは論を待たない。

補綴領域における骨増生を総括すると、「骨増生は軟組織の創の閉鎖と感染のコントロール、補綴材の生着によって左右される」ということになる。前述のようにこれまで我々はスタチン系薬剤による骨形成の促進について検討してきた。加えて、ごく最近の知見によると、スタチン系薬剤は皮膚の創傷における上皮化を促進することにより、軟組織の創傷治癒を促進する、(Vukelic ら, 2010)、あるいは小腸吻合術時の治癒を促進する (Karadeniz ら, 2009) など、軟組織に対する創傷治癒効果が報告されている。また、血管誘導能を有する VEGF の分泌を促進することが知られている (Bitto ら, 2008)。さらに別の研究によると、スタチン服用者は周術期における敗血症やそれに伴う死亡のリスクが有意に低いというシステムチックレビューやメタアナリシス (Brookes ら, Tleyjeh ら, Debesh ら, Donnino ら, いずれも 2009)

が複数報告されており、単離した菌による in vitro 研究によると、MRSA や VRE 等の耐性菌に対しても抗菌効果を示したという (Jerwood ら, 2008)。つまりスタチン系薬剤は、骨誘導能を有し、血管新生能を有するうえ、軟組織の創傷治癒に促進的効果を有し、かつ感染コントロールにも有効であるという、骨増生には理想的な薬剤ということになる。

2. 研究の目的

本研究では、スタチン系薬剤が口腔領域の「骨増生に対する問題点をすべて克服」する助けと成りうるかについて検討を行う。下図は、骨増生の成否を左右する要素である。



この視点から骨再生を見た場合、スタチン系薬剤は骨増生を新たなステージに引き上げる「万能薬」と見なすことができる。

これまでの我々の研究成果である、生体吸収性キャリアからのスタチンのコントロールドリリリース (Masuzaki ら, Biomaterials, 2010)、生体骨を模倣する細胞挙動を有する新規リン酸カルシウム系骨補綴材 (Suzuki ら, Dent Mater J, 2005) の二点より、具体的にはこのノウハウを用いた、生体内分解性を有するスタチン徐放性 GBR 膜、あるいはこのノウハウより、スタチンを徐放する生体内骨置換性補綴材を検討し、その有効性を検証する。

3. 研究の方法

< 1. 新たに考案したスタチン含有炭酸アパタイトに関する研究 >

セッコウに蒸留水を加えたものに種々の量のスタチンを混和し、リン酸塩存在下で水熱処理し、スタチン含有炭酸アパタイト顆粒を得た。これをラット脛骨に埋入し、4 週後に種々の解析を行った。

< 2. スタチンが口腔軟組織構成細胞に与える影響に関する研究 (細胞実験) >

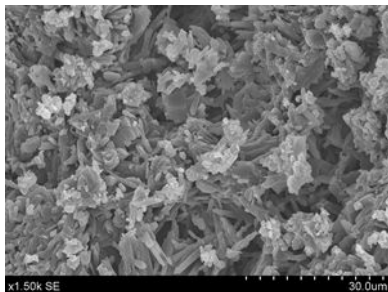
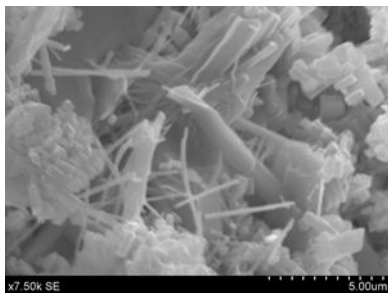
口腔上皮細胞様細胞 GE1 と線維芽細胞用細胞 NIH3T3 を用い、種々の濃度のスタチン存在下で培養し、細胞増殖率を測定した。また、スクラッチテストによる細胞移動量を計測した。また、細胞接着に関連する分子の発現状態を観察するために、GE1 においてはインテグリン $\alpha 4$, NIH3T3 に関して

はピンキュリン免疫蛍光染色を行った。

< 3 . フルバスタチンの軟組織創傷治癒に対する効果に関する研究 (動物実験) >
軟組織創傷治癒モデルとして、ラットの抜歯窩モデルを用いた。ラット第一臼歯を抜去後、種々の濃度のスタチンを担体とともに抜歯窩近傍に単回注射した。その後抜歯窩をマイクロCTおよび組織標本にて観察、評価した。

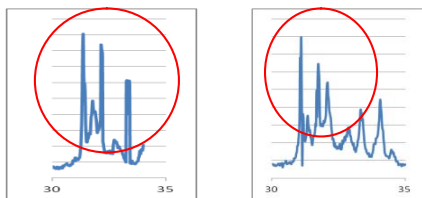
4 . 研究成果

< 1 . 新たに考案したスタチン含有炭酸アパタイトに関する研究 >
水熱処理後の顆粒をSEMで観察すると、水熱処理前のセッコウでは見られなかった針状結晶が観察された。針状結晶はスタチン含有群においても見られた。



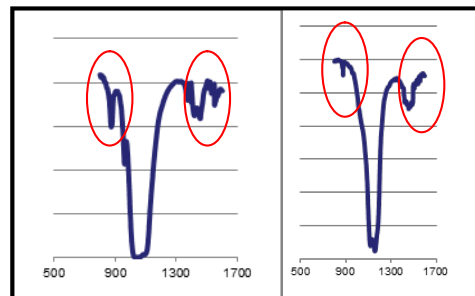
(上: セッコウを水熱処理した後のSEM像; 下: スタチン含有セッコウを水熱処理した後のSEM像)

また、XRD解析によると、水熱処理後のセッコウ、およびスタチン含有群において、アパタイト構造を有していることが示唆された。



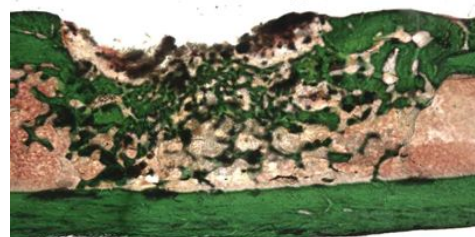
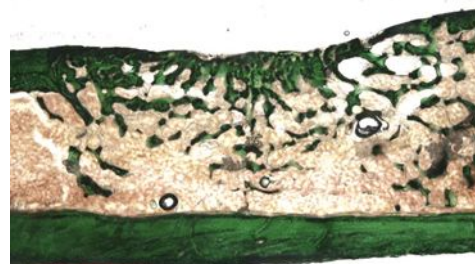
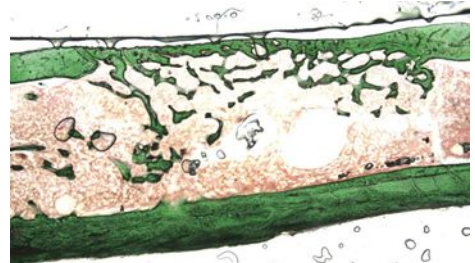
(左: セッコウを水熱処理した後にXRDで観察されたアパタイトピーク (丸印); 右: スタチン含有セッコウを水熱処理した後にXRDで観察されたアパタイトピーク (丸印))

さらにこれらの顆粒をFT-IR法を用いて解析したところ、水熱処理後のセッコウおよびスタチン含有群において炭酸イオンのピークを認めた。このことより、セッコウを上記の手法で水熱処理したものは炭酸アパタイトであること、その系にスタチンを添加するとスタチン含有炭酸アパタイトが作製できることが明らかになった。



(左: セッコウを水熱処理した後にFT-IRで観察された炭酸基のピーク (丸印); 右: スタチン含有セッコウを水熱処理した後にFT-IRで観察された炭酸基のピーク (丸印))

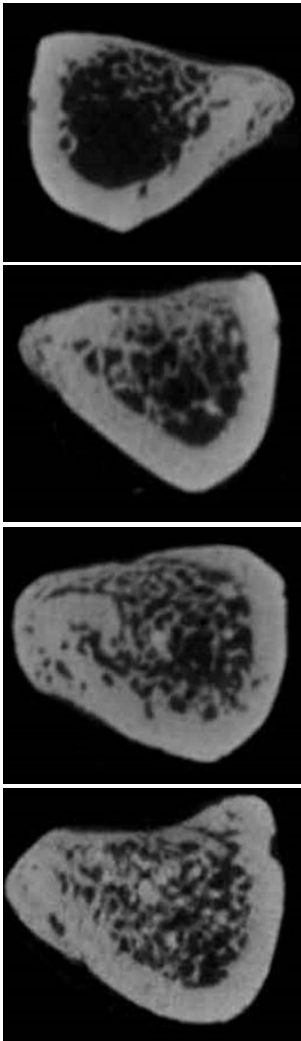
これらの新規に開発した顆粒をラット脛骨に埋入したところ、炭酸アパタイト群、スタチン含有群ともにセッコウ埋入群やコントロール(骨補填材不填入)群より多くの骨形成が見られた。





(上からコントロール(骨補填材無填入)、セッコウ、炭酸アパタイト、スタチン含有炭酸アパタイト)をラット脛骨に填入し、4週経過後の組織像。上2群と比較して、炭酸アパタイト群、スタチン含有炭酸アパタイト群ではより多くの骨が形成されているように見える。)

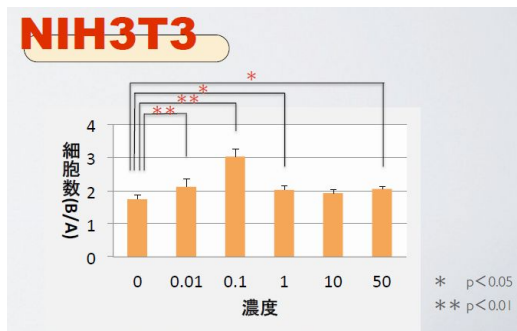
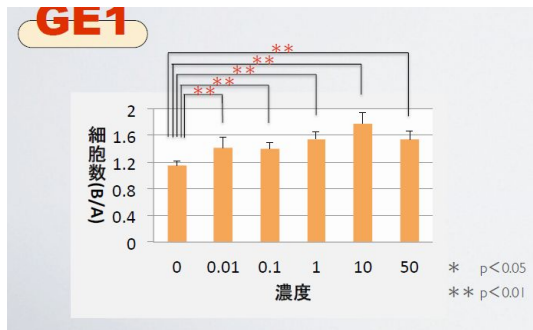
また、CT解析の結果、これらの新生骨はX線不透過性を有していることから、成熟した石灰化骨が形成されていることが明らかになった。



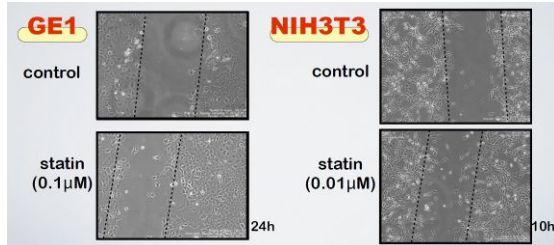
(上からコントロール(骨補填材無填入)、セッコウ、炭酸アパタイト、スタチン含有炭酸アパタイト)をラット脛骨に填入し、4週経過後のマイクロCT像。上2群と比較して、炭酸アパタイト群、スタチン含有炭酸アパタイト群ではより多くの骨が形成されているように見え、またエックス線不透過性が高いことよりこれらの新生骨は石灰化が進んでいることが示唆される。)

< 2 . スタチンが口腔軟組織構成細胞に与える影響に関する研究(細胞実験) >

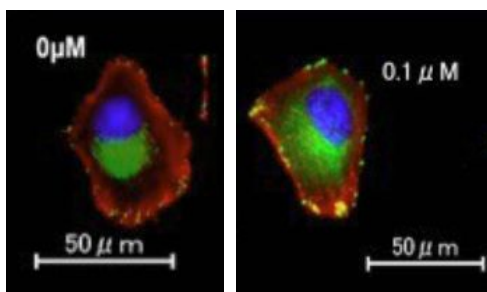
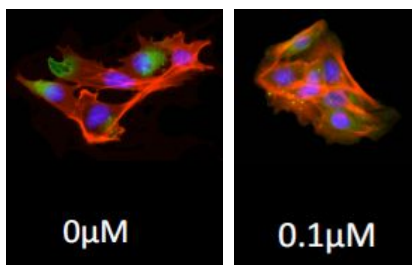
GE1およびNIH3T3はともにスタチンの濃度依存性に増殖率が向上し、いずれも0.1μMのときに最も増殖率が高かった。また、スクラッチテストによる移動量測定では、スタチン添加群では非添加群より多い細胞移動を認めた。免疫蛍光染色の結果、両細胞ともに接着している細胞に関してはスタチンの有無にかかわらず良好な接着関連タンパクの発現が認められた。



(種々の濃度のスタチンを培養液に添加した際のそれぞれの細胞の増殖率。両細胞ともに、スタチン濃度 0.1 μMのときに高い増殖率を示している。)

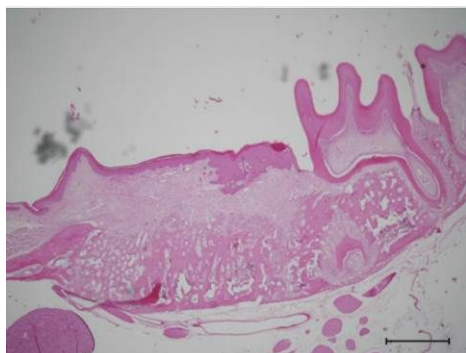
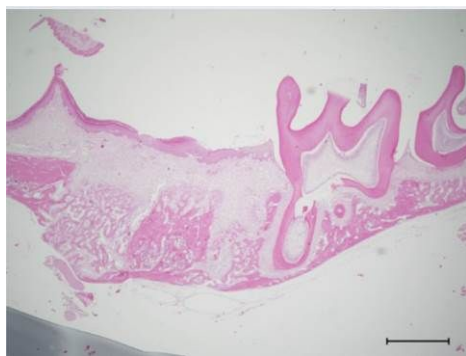


(スクラッチ(点線)によって細胞を排除し、細胞の移動を観察すると、スタチン添加群の方がより多くスクラッチ内に細胞が移動している)



(スタチン非添加(左)および 0.1 μM 添加群における上皮様細胞のインテグリン 4 (上段)、線維芽細胞様細胞のピンキュリン(下段)免疫蛍光染色像。スタチンの有無にかかわらず良好な細胞接着関連タンパクの発現が観察される)

< 3 .フルバスタチンの軟組織創傷治癒に対する効果に関する研究(動物実験)>
 抜歯後7日において、スタチン投与群はコントロール群と比較してより緻密な新生骨形成を認めた。また、上皮の連続性もスタチン投与群の方がより回復の程度が高かった。



(ラット上顎第一臼歯抜去時にキャリア(上)またはスタチン(下)を注射後1週間の組織像。スタチン投与群の方が抜歯窩の骨密度や上皮の連続性において勝っている。)

以上より、スタチンは骨形成を促進する能力と口腔軟組織の治癒促進能力を併せ持つ骨増生材としての可能性を有することが示唆された。

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)

[学会発表](計 件)

安波礼之、鮎川保則、古橋明大、熱田生、古谷野潔 . fluvastatin は口腔軟組織構成細胞の挙動を制御する、日本歯科理工学会夏期セミナー、2012.8.18、長崎市 .

Masuzaki T, Ayukawa Y, Atsuta I, Jinnō Y, Kono T, Koyano K. Newly fabricated osteoconductive carbonate apatite bone graft material. An in vivo study. 22nd Annual Scientific Meeting of the European Association of Osseointegration, October 18, 2013, Dublin, Ireland.

[その他]

ホームページ等

<http://www.implantgishi.dent.kyushu-u.ac.jp/webpages/research.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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

荻野 洋一郎 (OGINO, Yoichiro)
 九州大学・大学院歯学研究院・助教
 研究者番号：50380431
 (平成23年度のみ)

(3)連携研究者

鈴木裕美子 (SUZUKI, Yumiko)
 九州大学・大学病院・学術研究員
 研究者番号：20432916