

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 30 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390446

研究課題名(和文)スタチン徐放性を制御した新機軸「母床骨改善型インプラント」の開発

研究課題名(英文)Development of novel implants with local administration of fluvastatin-gelatin complex

研究代表者

吉成 正雄(Yoshinari, Masao)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10085839

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 6,100,000円

研究成果の概要(和文):スタチンの局所投与システムを見出すことにより、特に老人性骨粗鬆症患者の母床骨の改善に有効な「母床骨改善型インプラント」を開発することを目的とした。フルバスタチンが塩基性ゼラチンと静電的に結合することを利用したフルバスタチン・ゼラチンハイドロゲル複合体は、フルバスタチンの徐放性が制御できることが明らかとなり、フルバスタチンの局所投与の可能性が見出された。また、フルバスタチン・ゼラチンハイドロゲル複合体は低代謝型の老人性骨粗鬆症モデル動物の骨形成を促進した。

以上より、フルバスタチン・ゼラチンハイドロゲル複合体を利用した局所投与は、低代謝型骨粗鬆症患者の骨形成に有効であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文): Statins were recently reported to promote the differentiation of osteoblasts produced by the stimulation of BMP-2. This study aimed to clarify the efficacy of a local administration of fluvastatin, hydrophilic statin, on the healing of bone defects in low-turnover osteoporosis patients using a fluvastatin-gelatin complex.

Fluvastatin was released gradually from fluvastatin-gelatin complex with the dissolving gelatin that enabled the local administration of the fluvastatin. The fluvastatin-gelatin complex enhanced the bone formation in low-turnover osteoporosis animals, indicating that the fluvastatin-gelatin complex is promising carrier for facilitating the bone formation in low-turnover osteoporosis patients.

研究分野：歯科材料学・インプラント学

キーワード：フルバスタチン 局所投与 薬剤徐放 低代謝型骨粗鬆症 骨形成促進 インプラント 母床骨改善

1. 研究開始当初の背景

高脂血症治療薬スタチンは、骨芽細胞への分化決定シグナルである BMP-2 の生合成を促進すること、また、血管内皮増殖因子 (VEGF) の遺伝子発現を著明に促進させることが報告されている。これにより、様々な問題点を有する生理活性タンパク質の直接利用の弊害が回避でき、スタチンは骨増生に有効な薬剤として期待が集まっている。しかし、*in vivo* の系では骨形成能が劣る、hPTH (1-34) などのホルモンとの併用でなければ骨粗鬆症の治療に役立たないとの報告もみられ、*in vitro* 研究と *in vivo* 研究の乖離が大きい。この原因として、親水性(疎水性)、半減期が異なるスタチンの種類が数多くある、使用するスタチンの至適濃度が定まっていない、スタチンの徐放性を適切に制御する担体が開発されていない、適切な局所投与時期が見つかっていない、ことなどが挙げられている。申請者は Simvastatin をインプラント表面に固定する技術を開発し (Biomedical Res、2006)、骨形成情况进行を評価した。しかし、インプラント周囲のみに新生骨が認められ、母床骨を改善するまでには至らなかったことから、徐放システムの必要性を痛感した。そこで、シクロデキストリンの包接システムを利用し、スタチンの徐放性をコントロールする方法を開発した (Dental Materials J、2007、論文賞)。また、生体適合性の優れたゼラチンを使用してもスタチンの担持・徐放が可能になることを確認した。これにスタチンを担持した複合体を、ラット頭蓋冠およびラット頸骨に移植したところ、明らかな新生骨の増生が認められた。さらには、低代謝回転型骨粗鬆症モデルラット (SHR) を用い、スタチン投与の影響を探索した結果、明らかな骨増生を認めた。このように、予備実験においては、スタチンの局所投与方法とその効果を骨粗鬆症モデルラットでも確認している。

2. 研究の目的

現在、口腔インプラントを老齢・骨粗鬆症患者へ適用するために、インプラント周囲母床骨を改善する治療法が求められている。その中で、骨形成能を有するとされるスタチンの臨床応用が期待されているが、スタチンの種類は数多くあり、それらの至適濃度、局所投与方法、徐放性制御技術が定まっていない。また、増生された骨がインプラント埋入に必要な骨質(強度)を有しているかについての検討も行われておらず、本剤の有効性を確認するまでには至っていない。本研究は、上記問題点を一つ一つ検証して、母床骨の改善に有効なスタチン徐放システムを見出すことにより、新機軸「母床骨改善型インプラント」

を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 材料

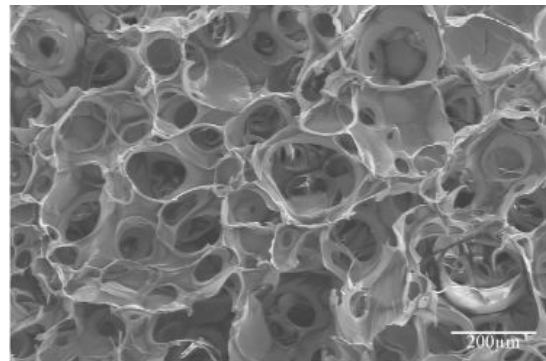
親水性(疎水性)、半減期の異なる以下のスタチンを用いる。Simvastatin (疎水性、半減期 2.0h)、Fluvastatin (疎水性、半減期 0.9h)

2) フルバスタチン濃度が細胞増殖・分化に与える影響 (*in vitro* 試験)

老人性骨粗鬆症モデルマウス (SAMP6) と正常マウス (SAMR1) の大腿骨より骨髓細胞を採取し、通常培地にて継代培養を行った。その後、フルバスタチンを各濃度; 0 μ M (cont), 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1.0 μ M を添加し、骨髓細胞を培養した (n=5)。1, 3, 7, 14 日目に、細胞増殖を WST1 法にて、7, 14 日目に細胞分化の指標であるアルカリフォスファターゼ活性を測定した。また、免疫組織化学染色による評価を行った。

3) フルバスタチン・ゼラチンハイドロゲル複合体の作製およびフルバスタチンの徐放特性 (*in vitro* 試験)

(1) フルバスタチンが塩基性ゼラチンと静電的に結合することを利用し、ゼラチンの架橋度を変化させスタチンを担持したハイドロゲル担体を作製した (下図)。



(2) 担体からのスタチン徐放特性を、可視・紫外線分光光度計を使用して測定した。

4) フルバスタチン・ゼラチンハイドロゲル複合体の骨形成能の検討 (*in vivo* 試験)

(1) 低代謝回転型骨粗鬆症のモデルとして高血圧自然発症ラットおよびマウス (SHR, SAMP6) を、高代謝回転型骨粗鬆症のモデルとして卵巣除去ラット (OVX) を用いる。

(2) フルバスタチン・ゼラチンハイドロゲル複合体、および側壁に孔を設けたチタン箔のシリンダー中にスタチンを担持した複合体を注入して作製した。

(3) 対象とする実験動物の頸骨、あるいは頭蓋冠にフルバスタチン・ゼラチンハイドロゲル複合体を埋入し、以下の骨形成能の評価を行った

実験動物用マイクロ CT (R-mCT) による骨形成能の評価 (骨密度変化)

病理組織学的評価
免疫組織学的評価（骨形成・吸収・血管新生に関わるマーカー）

4. 研究成果

1) フルバスタチン濃度が細胞増殖・分化に与える影響

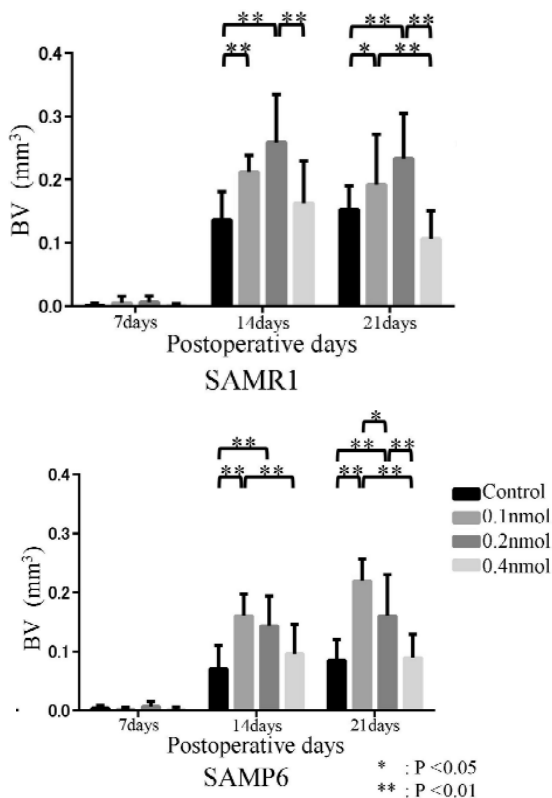
細胞増殖はフルバスタチンの濃度により差は認められなかった。アルカリフォスファターゼ活性は SAMR1 と SAMP6 から採取した細胞ともにフルバスタチン添加群で高くなる傾向がみられたが、至適濃度は SAMR1 と SAMP6 で異なった。

2) 徐放性を制御したフルバスタチン・ゼラチンハイドロゲル複合体の作製

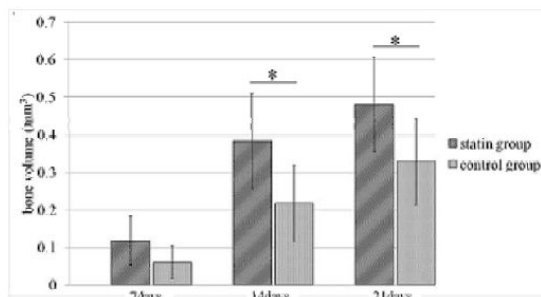
フルバスタチンが塩基性ゼラチンと静電的に結合することを利用し、フルバスタチン・ゼラチンハイドロゲル複合体の作製し、その架橋度を変化させることにより、フルバスタチンの徐放性が制御できることが明らかとなった。このことにより、フルバスタチンの局所投与の可能性が見出された。

3) フルバスタチン・ゼラチンハイドロゲル複合体の骨形成能

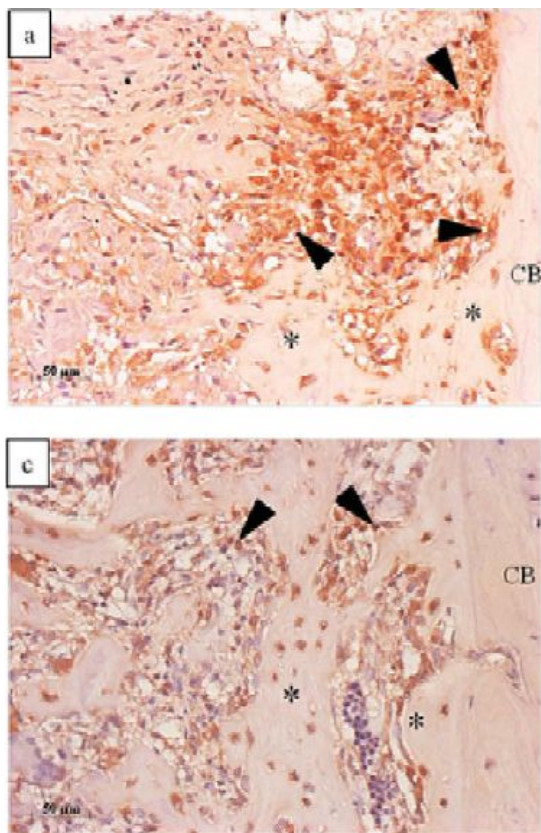
低代謝型の老人性骨粗鬆症モデルマウスに、フルバスタチン・ゼラチンハイドロゲル複合体を応用し、フルバスタチン局所投与が骨形成に及ぼす効果を評価した結果、フルバスタチン局所投与により骨形成が促進された。また、正常のラットにおける骨代謝に効果的なフルバスタチン濃度と比較して、低代謝型の老人性骨粗鬆症モデルラットでは低濃度でより効果的であることが明らかになった（下図）。



老人性骨粗鬆症モデルラットに対しても同様な結果が得られた（下図）。



また、病理組織学的評価、免疫組織学的評価の結果、フルバスタチンは骨髄中の幹細胞のみではなく、内骨膜の骨芽細胞前駆細胞の分化を促進することが明らかとなった（下図 a: BMP-2 の発現、c: Runx2 の発現）。



以上より、フルバスタチン・ゼラチンハイドロゲル複合体を利用した局所投与は、低代謝型骨粗鬆症に有効であることが明らかとなり、新機軸「母床骨改善型インプラント」の開発の一助になったと考えられる。

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6件)

Tanabe K, Nomoto H, Okumori N, Miura T, Yoshinari M. Osteogenic effect of fluvastatin combined with biodegradable gelatin-hydrogel. Dental Materials Journal, 31(3): 489-493, 2012

Ogasawara R, Furuya Y, Sasaki H, Yoshinari M, Yajima Y. Effects of oral administration of simvastatin on bone formation in senile osteoporosis rat. Journal of Hard Tissue Biology 22: 461-472, 2013

Tanabe K, Miura T, Yoshinari M. Electrostatically coupled state of fluvastatin with gelatin in vitro. Journal of Hard Tissue Biology 22: 451-454, 2013

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 rats. Journal of Hard Tissue Biology 23: 389-398, 2014

Yoneme H, Hakakeyama J, Danjo A, Oida H, Yoshinari M, Aijima R, Murata N, Watanabe T, Oki Y, Kido MA. Milk basic protein supplementation enhances fracture healing in mice. Nutrition 31: 399-405, 2015

Ohira T, Tanabe K, Sasaki H, Yoshinari M, Yajima Y. Effect of locally applied fluvastatin in low-turnover osteoporosis model mouse with femur bone defect. Journal of Hard Tissue Biology, 24 (2): 147-154, 2015

〔学会発表〕(計9件)

Tanabe K, Miura T, Yoshinari M. Local osteogenic effect of fluvastatin on rat calvaria: continuous observation using micro-CT system Sino-Japan Dental Conference, Chengdu, China, 2012 April 26-28

安田博光, 田邊耕士, 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, 第43回口腔インプラント学会、福岡、2013年9月14, 15日

大平貴士, 田邊耕士, 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, 第43回口腔インプラント学会、福岡、2013年9月14, 15日

小笠原龍一, 古谷義隆, 佐々木穂高, 吉成正雄, 矢島安朝. シンバスタチンの経口投与が老人性骨粗鬆症ラットの骨形成に及ぼす影響, 第43回口腔インプラント学会、福岡、2013年9月14, 15日

吉成 正雄. オッセオインテグレーションの本態とそれを決めるインプラント表面因子, 神奈川歯学(0454-8302)48 巻抄録集 Page3(2013.11), 第48回神奈川歯科大学学会総会, 横須賀, 2013年11月30日(特別講演)

Yoshinari M. Influence of surface topography on osteoblast-like cell behavior to zirconia. 18th International Microscopy Congress 2014 (IMC 2014), Prague, Czechoslovakia, September 7-11, 2014

吉成正雄, 武本真治, 木下英明, 長谷川晃嗣, 五十嵐俊男, 河田英司. 表面修飾チタンへの骨関連サイトカインの特異的吸着特性, 第64回日本歯科理工学会秋期学術講演会、広島, 2014

吉成正雄. 「生体多機能化インプラント」を目指して, 第298回東京歯科大学学会総会、東京, 2014年10月18-19日(特別講演)

高橋由香里, 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)の骨髄細胞に対するフルバスタチンの影響, 第298回東京歯科大学学会総会、東京, 2014年10月18-19日

〔図書〕(計1件)

吉成正雄(分担執筆). 「骨研究最前線」第3章 第1節 骨研究からみた最新インプラント治療、133-143(総ページ数430), NTS, 東京, 2013

〔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

吉成 正雄 (YOSHINARI, Masao)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 10085839

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

三浦 直 (MIURA, Tadashi)

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：10266570