

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592972

研究課題名(和文)スタチン投与中止がインプラント周囲骨に与える影響

研究課題名(英文)Influences of discontinuation of statin on bone formation around implants

研究代表者

李 憲起 (LI, Xianqi)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師

研究者番号：60350831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：高脂血症の治療薬として臨床で広く用いられているスタチンは、インプラント周囲骨形成を促すことが報告されている。その一方で、近年スタチンの多面的作用により、投与中止後炎症性マーカーの異常上昇というリバウンド現象が誘発されることが明らかとなってきた。本研究では、インプラント周囲骨の形成促進に有用なスタチンの投与法を確立するために、シンバスタチンの短期投与と中止がインプラント周囲骨に与える影響について、ラットインプラント植立モデルを用いて検討したところ、シンバスタチンの短期投与中止がインプラント周囲骨密度や骨梁構造に影響を与え、結果としてインプラント初期固定に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Statins had been widely used for treatment of hyperlipemia and also was reported to promote bone formation. On the other hand, recent studies indicate that some of "pleiotropic" effects of statins induce abnormal rise in inflammatory factor as rebound phenomenon after discontinuation. In this study, in order to establish effectual medication for bone formation around implants, we evaluated the influence of short-term dose and discontinuation of statin using rat implant model. The results showed that short-term dose and discontinuation of statin had an influence on implant fixed early, because of decreasing of bone density and bone trabecula around implants.

研究分野：医歯薬学

キーワード：インプラント スタチン 骨形成 骨代謝 チタン 炎症サイトカイン リバウンド 骨芽細胞

### 1. 研究開始当初の背景

高脂血症治療薬として臨床で広く用いられている statin は、骨芽細胞への分化を促進して骨形成を増加させるとともに、破骨細胞分化阻害効果を有している。したがって、骨形成を積極的に促進する理想的な骨粗鬆症治療薬として注目されている。一方、高脂血症患者へのシンバスタチン投与中止直後より、血中の IL-6 などの骨吸収性サイトカインが一過性に異常上昇するリバウンド現象を誘発することが報告されている (Clin Chim Acta 366:269-273, 2006)。歯科インプラントにおいても、全身および局所への statin 投与により、インプラント周囲骨形成が促進されることが注目されている (J Oral Rehabil 37:123-30, 2010)。statin 投与により、BMP-2 のような骨形成促進因子の発現が増加し、IL-6 や腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) といった骨吸収性サイトカインの発現は抑制される (Circulation 108:839-843, 2003)。また、投与中止により IL-6 や TNF- $\alpha$  の発現は増加する。一方、血清中の IL-6 や TNF- $\alpha$  レベルの上昇は、骨密度を低下させることが知られている。しかしながら、いずれの研究においても、statin 投与中止により IL-6 などといった骨吸収性サイトカインのリバウンド現象を誘発するかどうか、あるいは投与中止がインプラント体と母床骨とのオッセオインテグレーション (osseointegration) にどのような影響を与えるかについては報告していない。

われわれはインプラント植立モデルを用いて、statin 投与した実験を行ったところ、Statin を投与中止後 3 日目までの時点で、対照群に比較して、インプラント周囲の骨小梁は有意に増加し、骨量計測でも有意に高い値を示され、しかしながら、Statin を投与中止後 7 日目以降では逆にインプラント周囲の骨小梁は減少し、骨量も有意に減少したことが示された (投稿中)。すなわち、statin の服用を中止することが、既に埋入されたインプラントに悪影響を与える可能性が推測され、今後、statin は広く臨床で使用される可能性があるため、投与中止が、インプラント周囲骨に与える影響を検討することは重要な課題と考えられる。

### 2. 研究の目的

statin は骨芽細胞の分化と機能を促進して骨形成を増加させ、また、NF- $\kappa$ B 活性抑制を介した骨吸収炎症サイトカイン IL-6 など産生抑制より骨吸収を抑えんと考えられる。statin 中止により、抑制された NF- $\kappa$ B 活性が再び活性化し、その結果、炎症性・骨吸収性サイトカイン IL-6・IL-1・TNF- $\alpha$ 、増殖因子 PDGF・FGF などの産生が亢進する。また、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) やカテプシンなどの基質分解酵素の産生も誘導され、また、炎

症性・骨吸収性サイトカイン IL-6・IL-1・TNF- $\alpha$  などの刺激によって間葉系細胞・骨芽細胞の RANKL シグナルを促進する。その結果、骨形成と骨吸収のバランスが骨吸収側に傾き、インプラント周囲骨の骨量が減少されていると推測される。今後社会の高齢化が進むため、statin 服用患者の増加が見込まれる。また、歯科インプラントを受ける患者も年々増加している。statin 服用患者におけるインプラント治療の問題点とその機序を明らかにすることで、より安全なインプラント治療の確立につながることを期待される。また、その知見は歯科領域のみでなく、整形外科など関連領域における骨関連手術の治療成績向上にも寄与するものと考えている。本研究では、骨代謝に着目し、statin 投与中止直後のリバウンド現象がインプラント周囲骨に与える影響とそのメカニズムについて検討を行う。

### 3. 研究の方法

(1) ラットインプラント植立モデルにおいて statin が骨代謝に与える影響の検討：  
シンバスタチン短期間投与がインプラント周囲骨に与える影響の検討：Wistar 系ラット脛骨におけるインプラント植立モデルを用いて、ミニインプラントを植立する同時にシンバスタチンを一週間投与する。投与 0、3、7 日目、及び投与中止後 3、7、10、14、21、28 日に動物用 micro-CT を用いて、インプラント周囲骨の構造について経時的に観察し、骨量変化および新生骨とインプラントの骨接触率を計測した。

シンバスタチン長期間投与がインプラント周囲骨に与える影響の検討：インプラントを植立すると同時にシンバスタチンを 1 ヶ月間投与する。投与 0、3、7、10、15、20、30 日目、及び投与中止後 3、7、10、14、21、28 日目に、動物用 micro-CT を用いて、インプラント周囲骨の構造について経時的に観察し、骨量変化および新生骨とインプラントの骨接触率を計測した。

以上の解析により変化の見られるポイントを絞り込み、非脱灰および脱灰標本作製する。インプラント体周囲の骨の誘導、形成などの骨代謝について、組織学的、および免疫組織化学的 (Osterix、OC、DMP など) に解析を行った。

(2) Statin 投与による宿主ラットの反応の検索：

投与前後・投与中止による脾臓から分離した単球培養上清及び血清中の IL-6、IL-1、TNF- $\alpha$  ならびに NF- $\kappa$ B、AP-1 濃度を ELISA で定量した。

(3) *in vitro* 解析と Statin による骨リモデリング調節経路の検討：

まず、皮質骨由来細胞培養を行うため、マウス大腿骨を無菌的に摘出し、骨髓を洗浄し、骨を 1~2 mm 程度に細切した。回収した骨片と細胞溶液を 6 ウェルプレート上に

播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベートした。2 継代目の皮質骨由来細胞播種翌日より培地を骨分化誘導培地 (α-MEM+10% FBS+1% ペニシリンおよびストレプトマイシン溶液 +100nM デキサメタゾン+50 μM L-アスコルビン酸エステルマグネシウム塩 n 水和物+10 mM グリセリンホスフェート ニナトリウム塩)、シンバスタチンを添加した増殖培地を用いて 14 日間誘導培養した。培養後 24、72 時間、1 週目および 2 週目において MTT Assay を用いて付着細胞数を調べ、さらにアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性および酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRACP) 活性を ALP & TRACP Assay にて測定した。また、培養上清中の IL-6、IL-1、TNF-α ならびに転写因子 NF-κB の濃度を ELISA で定量した。

以上の方法によって statin による骨代謝に与える影響を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 組織学的評価

シンバスタチン短期投与群 (Sim 1W) では、投与中止直後 (Day 7) において樹枝状、島状の骨新生がインプラント体周囲に認められ、コントロール群に比較して活発な骨形成が認められた。一方、投与中止後 7 日目 (Day 7) と 21 日目 (Day 28) においては、明らかな差は認められなかった。

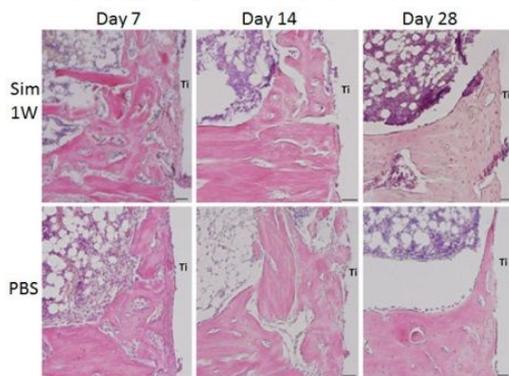


Fig 1. Histological evaluation

##### (2) 骨形態計測

短期 (7 日間) シンバスタチン投与群では、投与中止時 (Day 7)、コントロール群

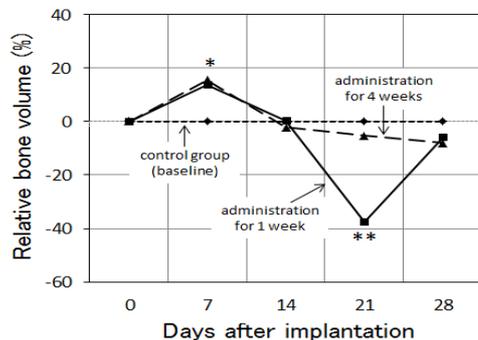


Fig 2. The relative changes in the amount of regenerated mineralized tissue around the implant

と比較して、インプラント周囲の骨量は増加した。投与中止後 7 日目以降では、逆にインプラント周囲の骨量は減少し、投与中止後 14 日目 (Day 21) では、インプラント周囲の骨量も有意に減少した。投与中止後 21 日目 (Day 28) においては、シンバスタチン投与群はコントロール群と比較して、明らかな骨量の差は認められなかった。長期 (Sim 4W: 28 日間) シンバスタチン投与群では、コントロール群と比較してインプラント周囲の骨量が有意差は認められなかった。

##### (3) 分子生物学的評価

Statin による ALP および TRACP 活性への影響: 皮質骨由来細胞での ALP 活性は、培養 1 日目と 3 日目では、シンバスタチン添加により、分化誘導のみに比べて有意な ALP 活性の増加が認められた。一方、培養 7 日目から、シンバスタチンの添加によって、ALP 活性は分化誘導のみに比べて有意な減少が認められた。また、TRACP 活性は、培養 1 日目では、スタチン添加による差は認められなかったが、3 日目から、分化誘導のみに比べて有意な減少が認められた。

Statin による炎症因子に与える影響: 皮質骨由来細胞の炎症因子産生におよぼすシンバスタチンの経時的な影響を調べた結果、IL-6 および TNF-α 産生量は時間と共に徐々に増加がみられ、IL-1 においては測定検出限界以下のため測定不可であった。転写因子 NF-κB の濃度においては、スタチン添加による差は認められなかった。

##### (4) インプラント周囲骨に対する評価

これらの結果に基づき、シンバスタチンの短期全身投与は、インプラント体周囲の早期骨形成を促進することが示唆された。一方、一過性に投与終了後比較的短期間でインプラント周囲の骨小梁は減少し、骨量も有意に減少した。シンバスタチンの短期投与中止がインプラント周囲骨密度や骨梁構造に影響を与え、結果としてインプラント初期固定に影響を与える可能性が示唆された。

##### (5) 得られた成果の社会へのインパクト

今後社会の高齢化が進むため、statin 服用患者の増加が見込まれる。また、歯科インプラントを受ける患者も年々増加している。本研究の成果は、statin 服用患者におけるインプラント治療の問題点とその機序を明らかにすることで、より安全なインプラント治療の確立につながることを期待される。また、その知見は歯科領域のみでなく、整形外科など関連領域における骨関連手術の治療成績向上にも寄与するものと考えている。

##### < 引用文献 >

Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by

statins. Science. 1999; 286(5446):1946-9.

Ayukawa Y, Ogino Y, Moriyama Y, Atsuta I, Jinno Y, Kihara M, Tsukiyama Y, Koyano K. Simvastatin enhances bone formation around titanium implants in rat tibiae. J Oral Rehabil. 2010; 37(2):123-30.

Li JJ, Li YS, Chu JM, Zhang CY, Wang Y, Huang Y, Chen J, Yuan JQ, Huang YL. Changes of plasma inflammatory markers after withdrawal of statin therapy in patients with hyperlipidemia. Clin Chim Acta. 2006; 366(1-2):269-73.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Y Zhang, X Li, T Chihara, T Mizoguchi, A Hori, N Udagawa, H Nakamura, H Hasegawa, A Taguchi, A Shinohara, H Kagami. Comparing immunocompetent and immunodeficient mice as ectopic transplantation animal models for bone tissue engineering. Oral Dis . 2015. 査読有  
Doi:10.1111/odi.12319

〔学会発表〕(計 6 件)

李 憲起, 千原 隆弘, 楊 静 篠原 淳, 各務秀明. 免疫正常マウスを用いた骨再生過程の解析. 第 18 回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会. 2014 年 11 月 29 日(島根・ビッグハート出雲)

千原隆弘, 李 憲起, 篠原 淳, 各務秀明. 免疫応答が骨再生過程に及ぼす影響に関する検討. 第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2014 年 10 月 18 日(千葉・幕張メッセ)

張 以鳴, 李 憲起, 千原 隆弘, 篠原 淳, 各務 秀明. Effect of immunological reaction on the process of bone regeneration. 第 1 回日本骨免疫会議. 2014 年 7 月 4 日(沖縄万国津梁館・沖縄)

李 憲起, 楊 静, 水木信之, 高田匡基, 篠原 淳, 各務 秀明. スタチン短期投与と中止がインプラント周囲骨に与える影響. 第 17 回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会. 2013 年 11 月 30 日(東京都・日本歯科大学生命歯学部)

李 憲起, 楊 静, 張 以鳴, 八上公利, 各務 秀明. シンバスタチン短期投与がインプラント周囲骨に与える影響. 第 12 回日本再生医療学会総会. 2013 年 3 月 22 日(横浜市・パンフィコ横浜)

李 憲起, 楊 静, 各務秀明. シンバスタチン短期投与がインプラント周囲骨に与える影響. 第 16 回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会. 2012 年 12 月 1 日(北九州市・北九州国際会議場)

## 5 . 研究組織

(1)研究代表者

李 憲起 (LI, Xianqi)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師  
研究者番号：60350831

(2)研究分担者

楊 静 (YANG, Jing )

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師  
研究者番号：50410436

各務 秀明 (KAGAMI, Hideaki)

松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：80242866