

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792069

研究課題名(和文) HDACIによる骨代謝制御を応用した骨増成法の基礎的評価 全身投与と局所投与

研究課題名(英文) Novel Bone Augmentation Technique Using Histone Deacetylase Inhibitor for Osteoblastic Differentiation.

研究代表者

秋葉 陽介 (AKIBA, YOSUKE)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：70547512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACI)は抗癌剤、抗てんかん薬として臨床応用され、クロマチンリモデリングに関与し、遺伝子発現を活性化する。骨形成においてはRunx2の安定化に関与し骨芽細胞の分化を促進する。本研究では、上顎骨円筒形骨欠損修復モデルを用いてHDACIの全身投与における骨形成能の賦活化を検討した。HDACIにはバルプロ酸(VPA)を使用し、投与方法は腹腔内投与、投与期間は円筒形骨欠損形成前7日間とした。VPA全身投与群では窩洞内新生骨形成能促進、円筒形骨欠損治癒促進を示す像が窩洞形成14日から21日後にかけて観察された。本研究より骨増成法におけるHDACIの有効性が示された。

研究成果の概要(英文)：HDACI activates gene expression. Valproic acid (VPA), which exhibits HDACI activity, regulates osteoblast differentiation through Runx2. The present study aimed to evaluate the effects of the systemic administration of VPA on bone regeneration. Wistar rat upper molars were extracted at the age of 4 weeks. Three weeks after extraction, the experimental group received an intraperitoneal injection of VPA for 7 days prior to the preparation of a bone cavity in the first molar area. Rats were sacrificed on days 3, 7, 14, and 21, and samples were prepared for micro-CT and histological analyses. Micro-CT analysis confirmed larger amounts of newly formed bone compared to the control. VPA-treated animals showed significantly higher ALP activities than the control. Conclusion: The systemic administration of VPA accelerated bone regeneration in the rat maxillary bone cavity. VPA treatment may be useful for bone augmentation.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：補綴理工系歯学

キーワード：HDACI エピジェネティクス 再生医学 歯学

1. 研究開始当初の背景

口腔インプラント治療が補綴の一選択肢として受け入れられて久しい。インプラント埋入部位の決定には補綴主導の埋入部位決定が必要となるが、インプラント埋入予定部位に骨量が不足する場合、インプラント埋入予定部位に骨増成法が必要となる。現在、骨増成法において様々な材料や手技が報告されているが、決定的な方法は未だ見出されておらず、より信頼性、予知性と安全性の高い骨増成法の開発が必要とされている。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) は抗癌剤、抗てんかん薬として臨床応用される薬剤である。HDACi は遺伝子発現過程においてクロマチンリモデリングに関与し、遺伝子発現を活性化することが知られている。これはエピジェネティクスと呼ばれる制御機構であり、既存の成長因子添加などよりも上位の制御機構にあり、併用も可能になる。また、遺伝子導入や遺伝子ノックアウトなどの遺伝学的制御機構が不可逆的遺伝子操作であり、一定の危険性をはらむものに対して、転写制御による遺伝子発現制御機構を応用することから、遺伝子配列の不可逆的变化を伴わない比較的安全な制御機構の応用といえることができる。更に薬物動態が速やかで、比較的簡単に制御が可能であるといった利点もある。近年、ユビキチン化の抑制によるプロテアソーム分解に対する抑制効果が知られ、骨形成関連においては Runx2 のプロテアソーム分解抑制による安定化に関与し、骨芽細胞の分化を促進する作用が報告されている。

2. 研究の目的

本研究は HDACi を用いた骨増成法の検討を目的としている。HDACi には細胞の分裂抑制作用が報告され、高濃度での細胞毒性が報告されている。骨増成法に対する応用を考えた場合に直接的な局所投与による

骨芽細胞の分化促進作用を期待した骨増成法も想定可能ではあるが、除法作用を持つキャリアによる持続的な濃度の維持や制御が困難なことから骨形成促進作用と細胞毒性の均衡制御が困難であり、有効な局所貯留が期待できない可能性も高い。そこで本研究では、上顎骨円筒形骨欠損修復モデルを用いて HDACi の全身投与における骨欠損部治癒作用、及びそれに伴う骨形成能の賦活化を検討することとした。

3. 研究の方法

HDACi にはバルプロ酸 (VPA) を用い、投与方法は腹腔内注射とした。投与量は 300 mg/kg/2 回/日、投与期間は上顎骨臼歯部円筒形欠損形成術の術前の 7 日間とした。上顎骨円筒形骨欠損修復モデルは 4 週齢 Wistar 系ラットを用い、上顎左右第一、第二臼歯を麻酔下にて抜歯し、4 週間の抜歯窩治癒を待った。抜歯後、3 週間、7 週齢から 7 日間 HDACi を 300 mg/kg/2 回/日の濃度で腹腔内投与し、対照群には PBS を投与した。抜歯窩治癒後、8 週齢において第一臼歯部を切開、直径 1.7mm の円筒形骨欠損窩洞をピーソリーマにて形成、縫合を行った。窩洞形成 3、7、14、21 日後に標本採取、 μ CT による画像解析を行い新生骨形成による円筒形窩洞の修復像を観察、パラフィン包埋切片を作成し組織学的に検索した。

4. 研究成果

1) 体重変化

上顎骨円筒形骨欠損修復モデル動物において実験期間を通して VPA 投与を行った実験群と対照群間に有意な体重変化の差は見られなかった。比較的高濃度の VPA 投与であっても短期間であなが体重変化に影響を与えない。

2) μ CT 画像解析

上顎骨円筒形骨欠損修復モデルに対する μ CT 画像解析より、上顎骨窩洞形成 7 日後

では実験群、対照群、両群間に新生骨形成に明らかな差が認められなかった。窩洞形成 14 日後において両群に新生骨形成が認められるが形成量は対照群と比較して VPA 投与群に多くみられた。窩洞形成 21 日後においては VPA 投与群、対照群ともに新生骨が観察されたが、VPA 投与群において形成骨の肥厚が観察され、対照群と比較して VPA による新生骨形成、骨欠損修復の促進の可能性が示唆される像が観察された。μCT 画像解析による骨構造解析は骨量、骨梁構造を示す BV/TV、Tb.Th は 14 日、21 日後において VPA 群で有意に高い値を、骨梁間距離を示す Tb.Sp は VPA 投与群で有意に小さい値を示した。

3) 血清中 ALP 活性

血清中の ALP 活性測定では窩洞形成後、実験期間を通して VPA 投与群において対処群より高い ALP 活性が観察された。

4) 組織学的解析

組織学的解析から H-E 染色では窩洞形成 3 日後において両群に明確な差は見られなかった。一方、窩洞形成 7 日後では対照群で窩洞内に炎症性細胞が残留しているのに対し、VPA 投与群では炎症性細胞の消褪と新生骨形成の開始が観察された。窩洞形成 14 日後では両群に新生骨形成が観察されたが、形成量は実験群で多く観察された。窩洞形成 21 日後では VPA 投与群において対照群と比較して有意に高い新生骨形成能を示す新生骨の肥厚が観察された。術後 21 日における強拡大像では、対照群の新生骨形成部位が不連続な類骨様の組織を示すのに対し、VPA 投与群の新生骨形成部では層板構造様の規則的な新生骨形成像を示した。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

Yosuke Akiba, Kaori Eguchi, Rashid

MD Mamunur, Masaru Kaku, Nami Akiba, and Katsumi Uoshima.:" Novel Bone Augmentation Technique Using Histone Deacetylase Inhibitor for Osteoblastic Differentiation." Journal of the Japanese Association for Dental Science Vol.33.44-48 (2014) 査読有

[学会発表](計 6 件)

Kaori Eguchi, Yosuke Akiba, Rashid MD Mamunur, Masaru Kaku, Nami Akiba, and Katsumi Uoshima.:" Histone deacetylase inhibitors treated cells contribute to bone augmentation." American Association Dental Research Annual Meeting (20140319) Charlotte, N.C.U.S.A.

Yosuke Akiba, Kaori Eguchi, Nami Akiba, Masaru Kaku, Katsumi Uoshima.:" Biological Evaluation of Zirconium-dioxide Dental Implant Drill" The 3rd International Symposium on Human Resource Development towards Global Initiative (20131221) Krabi, Thailand

Kaori Eguchi, Yosuke Akiba, Nami Akiba, Masaru Kaku, Katsumi Uoshima.:" Histone deacetylase inhibitors treated cells contribute to bone augmentation." The 3rd International Symposium on Human Resource Development towards Global Initiative (20131221) Krabi Thailand

江口 香里, 秋葉 陽介, 秋葉 奈美, 野澤 恩美, 加来 賢, 魚島 勝美. : HDACi 処理細胞移植による骨増成法の検討“第 55 回歯科基礎医学会学術大

会 (20130920) 岡山
江口香織, 秋葉奈美, マルセロ = ロサ
レス, 加来 賢, 秋葉陽介, 魚島勝
美 .: “ 各種 HDACi の骨分化、骨形成
能に対する効果に関する研究 ” 第 122
回日本補綴歯科学会 (20130518). 福
岡

秋葉陽介, 江口香織, 秋葉奈美, マル
セロ = ロサレス, 加来 賢, 魚島勝
美 .: “ ジルコニア製インプラントドリ
ルの開発と生物学的評価に関する研
究 ” 第 122 回日本補綴歯科学会
(20130518). 福岡

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

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

秋葉 陽介 (Akiba Yosuke)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号 : 70547512

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :