

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861800

研究課題名(和文)局所的フルバスタチン応用による新たな矯正歯科治療の検討

研究課題名(英文)A study on a new orthodontic treatment involving local application of fluvastatin

研究代表者

石井 武展 (ISHII, TAKENOBU)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80433978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨誘導能を持つフルバスタチンの局所応用により歯槽突起頬側への骨形成を人為的に行い、矯正歯科治療における頬側歯根露出などの偶発症の予防の可能性について検討した。本研究では、MC3T3-E1を用いた細胞培養実験と上顎側方拡大実験動物モデルを用いた実験を行った。その結果、フルバスタチンは50nM-100nMで骨芽細胞の石灰化誘導を行うことが証明された。また、動物実験では、この至適濃度を用いた局所応用により上顎歯列側方拡大後の頬側における有意な石灰化を認めた。従って、矯正歯科治療におけるフルバスタチンの局所応用は、頬側歯槽骨の吸収により歯根が露出するなどの偶発症を予防する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fluvastatin induces bone formation. This study topically applied fluvastatin to artificially form bone on the buccal aspect of the maxillary alveolar process, and this study examined whether fluvastatin could be used in orthodontic treatment to prevent accidents such as exposure of the buccal aspect of the tooth root. This study conducted a cell culture experiment involving the MC3T3-E1 and an experiment involving expanding of the maxillary dental arch in an animal model. Results revealed that fluvastatin induces calcification by osteoblasts at concentrations from 50-100 nM. In the animal experiment, local application of the optimal concentration of fluvastatin resulted in significant calcification on the maxillary buccal alveolar process after expanding of the maxillary dental arch. Thus, local application of fluvastatin as part of orthodontic treatment may be able to prevent accidents such as exposure of the root of the tooth due to resorption of the bone of the buccal alveolus.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：フルバスタチン マウス実験モデル 局所投与モデル 頬側歯槽骨吸収 MC3T3-E1 上顎側方拡大装置

1. 研究開始当初の背景

近年、高脂血症治療薬として用いられたスタチン製剤が骨芽細胞に刺激を与え、骨形成因子(BMP-2)を誘導し骨形成に関与することが報告された。これを医科では臨床応用して、骨粗鬆症患者に対する骨密度の増加や閉経後の女性に対する股関節の骨折の危険性を減らせることが報告されている。歯科に関して2004年に鮎川らの報告によれば、インプラント周囲にスタチンを局所応用した場合に破骨細胞活性が有意に減少し、局所の骨形成が実証された。BMP-2等の局所応用により歯周疾患の歯槽骨再生についても近年取り上げられてきたが、臨床応用に対してはスタチン製剤のほうが無害であり安全性に関しても副作用がほとんどないことが示されている。

矯正歯科臨床では、抜歯の判定基準として下顎前歯の角度や叢生の程度により評価する。また、外科的矯正治療の選択基準として、特に骨格性下顎前突での下顎前歯部歯槽骨の厚径が挙げられる。それは下顎前歯部歯槽骨の厚径や上下顎臼歯部歯槽骨の頬側厚径が変化せず、歯槽骨から逸脱した位置に歯を維持できないという基準であり、この部位において骨の添加による厚径の増加が認められる場合には、現在の判断よりも柔軟な治療計画が得られる。

つまり、歯槽骨の厚径のコントロールが可能となると、非抜歯治療の適応範囲や外科的矯正治療適応の基準などの治療計画立案に関する診断体系が変わることが想像される。これは今後の歯科矯正学分野において学術的に極めて重要な部分であり、本研究により偶発症の予防も可能となりうる。

2. 研究の目的

本研究は、骨誘導能を持つスタチンの局所応用により、歯槽突起とくに外側への骨形成を人為的に行い、矯正歯科治療における外科的侵襲の回避(便宜抜歯や外科的矯正治療)および偶発症の予防(歯肉退縮に伴う根面露出)の可能性について検討することである。

とくに、本研究では細胞培養実験にて、スタチンの *in vitro* での濃度別効果を判定し、その後、実験動物モデルを用いて、実験群には上顎臼歯部頬側にスタチンによる人為的な骨造成を行い、対照群、偽実験群とともに拡大装置を装着する。その結果、対照群、偽実験群に比べ実験群でより拡大されるとともに、歯根の露出を認めず安全な拡大が可能であるという仮説を証明する。

3. 研究の方法

(1)フルバスタチンの至適濃度を知るために、MC3T3-E1を用いた細胞培養実験を行った。培養条件として10% FBS,

1%Penicillin/Streptomycinを含むDMEMに石灰化誘導培地として50ug/mlのアスコルビン酸と5mMβ-グリセロリン酸を添加したものをを用いた。石灰化誘導培地に10nM-5uMまでの濃度を振ったフルバスタチンを添加した。細胞増殖試験として96wellに2x10⁵cells/wellによる培養開始から48時間後のWST-1を用いた細胞増殖実験、培養から14日目のMC3T3-E1細胞の骨芽細胞分化マーカーであるALP, OPN, BSP, OCNのmRNAを定量評価するためのreal-time PCR、培養後7日目のALP活性試験およびALP染色、培養後21日目のアリザリンR染色による石灰化試験を行った。

(2)実験動物を用いたフルバスタチンの局所応用効果を見るために、10週齢雄性C57BL6/Jによる歯の移動モデルを作成した。マウス上顎口蓋側に幅径4mmの.012”ステンレススチール製の拡大装置を歯科用レジンにてイソフルランによる吸入麻酔下に装着し、2週間拡大を行い評価した(図1A)。拡大装置を装着しない対照群、上顎に拡大装置を装着した群、上顎に拡大装置を装着し前述の細胞培養実験で得られた至適濃度のフルバスタチンを48時間ごとに上顎口蓋側歯肉に局所投与した群の3群を作製した(図1B)。これらの群における評価方法としては、拡大後の拡大量の比較、拡大後に骨格標本を作成しトルイジンブルー染色を施し上顎頬側歯槽骨から露出した歯根面積の測定、拡大後1週間経過時にアリザリンレッドS、屠殺前日にカルセインをラベリングし、非脱灰切片標本を作成し、共焦点レーザー顕微鏡にて石灰化の程度を観察した。

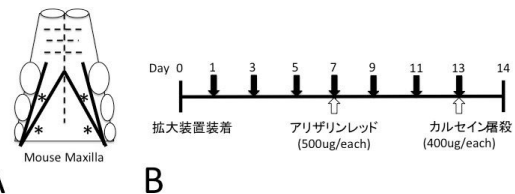


図1.上顎側方拡大モデル実験プロトコール

A: 上顎拡大方法の模式図、

* : フルバスタチン注入部位

B: 上顎拡大の実験プロトコール

黒矢印: 10 μl/100nM フルバスタチン投与

4. 研究成果

(1)細胞培養実験結果について

WST-1を用いたフルバスタチンによる細胞増殖能試験

WST-1による細胞増殖能試験を行った結果、フルバスタチンを10nMおよび50nM添加したものはコントロールに対して有意に細胞増加傾向を示した。しかしながら100nMおよび1 μM添加したものに関しては、細胞増殖が有意に抑制される結果となった。従って、フルバスタチンの濃度により細胞増殖能は変化することが示唆された(図2)。

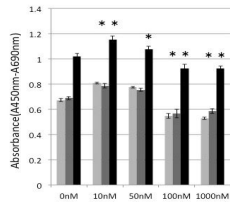
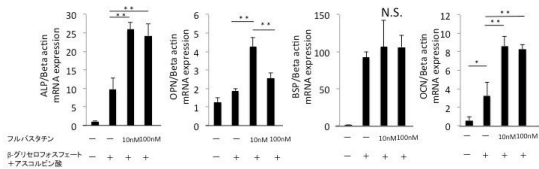


図2. WST-1 を用いた細胞増殖能試験
** : $p < 0.05$,
* : $p < 0.01$

フルバスタチンによる骨芽細胞分化マーカー mRNA 発現量について

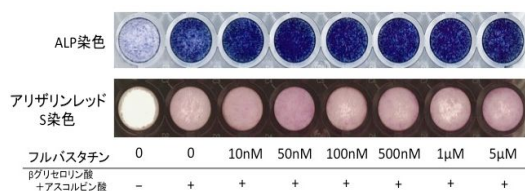
MC3T3-E1 細胞の石灰化誘導培地およびスタチンによる分化誘導を 14 日間行い、Total RNA を抽出後、cDNA を作製し real-time PCR による各分化マーカーの発現量を定量評価した。その結果、ALP では、10nM, 100nM のフルバスタチンにて、コントロールと比較して発現量が有意に大きかった。OPN の発現量については 10nM においてコントロールと比較し有意に大きかったが、100nM ではコントロールとの間に差がなかった。BSP については、スタチン添加とコントロールとの間に差がなかった。OCN については、10nM, 100nM のフルバスタチン添加により有意な増加を認めた。これらより、フルバスタチンを添加することにより、MC3T3-E1 の分化を促進し mRNA レベルで石灰化を誘導することが認められた(図 3)。



フルバスタチン添加による骨細胞分化マーカー mRNA の発現変動について

MC3T3-E1 細胞のフルバスタチン添加による石灰化誘導の評価

フルバスタチンの添加有無による MC3T3-E1 に対して培養 7 日目における ALP 染色、ALP 活性および培養 21 日目のアリザリンレッド S 染色により石灰化誘導について評価した。その結果、ALP 染色ではスタチン添加群が濃度に関わらず高い染色性を認めたが、ALP 活性を調べたところ、50nM, 100nM においてその他に対して有意に高い活性を示した(図 5)。また、培養 21 日目におけるアリザリンレッド S 染色では、50nM においてその他と比較し高い石灰化誘導が認められた(図 4)。



MC3T3-E1 細胞のフルバスタチン添加による石灰化誘導評価について

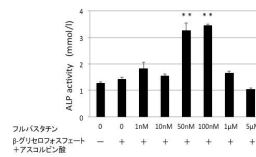


図 5. フルバスタチン添加による ALP 活性
** : $p < 0.05$

(2) 実験動物用いたフルバスタチンの局所応用の評価

フルバスタチン局所応用における上顎歯列側方拡大後の拡大量について拡大の結果、上顎は設定された約 4mm の側方拡大装置通りに拡大された(図 6A)。つまり、フルバスタチン局所応用により上顎歯列側方拡大への影響は示唆されなかった(図 6B)。

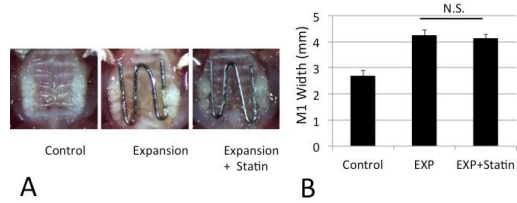


図 6. 上顎拡大後の拡大量の評価

A: 上顎口蓋側面観、B: 拡大量(左右上顎第一臼歯間)

フルバスタチン局所応用における上顎歯列側方拡大後の歯根露出量について 2 週間拡大後のマウス上顎の骨格標本を作製し、トルイジンブルー染色を施した(図 7A)。上顎頬側における歯槽骨頂からエナメルセメント境までの第一臼歯から第三臼歯までの歯根露出距離の合計を計測した。その結果、コントロールに対して上顎歯列側方拡大を行ったものは、歯根露出を認めたが、フルバスタチンを局所応用したものでは、フルバスタチンを局所応用しなかったものに対して歯根露出が有意に抑えられたことが示唆された(図 7B)。

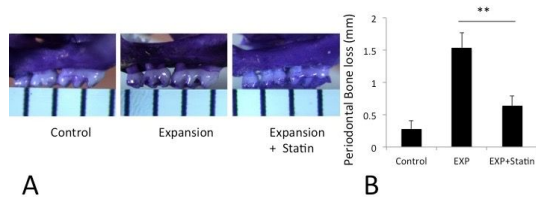


図 7. 上顎歯槽骨の拡大後歯根露出量について

A: 骨格標本の観察、B: 歯根露出量の計測結果
** : $p < 0.05$

フルバスタチン局所応用における上顎側方拡大後の頬側歯槽骨添加についてコントロールおよび上顎拡大装置を装着しているマウスモデルに対して、拡大 7 日目に 500 μg/each のアリザリンレッド S を投与し、屠殺前日の 13 日目に 400 μg/each のカルセインを投与し骨ラベリングを行った。屠殺後、上顎第一臼歯部の非脱灰研磨標本作製し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。そ

の結果、上顎歯列側方拡大を行ったものでは、頬側歯槽骨は吸収側となり頬側歯槽骨の厚径は狭くなる。コントロールでは歯槽突起外側への新生骨添加は認められないものの、骨内部でのリモデリングが行われていることが認められた。しかしながら、フルバスタチンを局所投与したものでは、歯槽骨頬側が吸収側であるにもかかわらず、歯槽骨外側への新生骨添加が認められた(図8)。

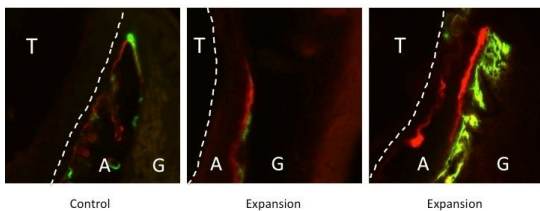


図8. 骨ラベリングを用いた上顎側方拡大における頬側歯槽骨の新生骨添加について
赤：アリザリンレッドS (546nm) , 緑：カルセイン (488nm) . T:歯、A:歯槽骨、G:歯肉

以上の結果より、C57BL6/J に上顎側方拡大装置を装着し、100nM フルバスタチンを局所応用したところ拡大量に有意差を認めなかったが、歯根露出面積はフルバスタチン投与群で対照群に対して有意に小さく、頬側歯槽骨の新生骨添加量はフルバスタチン投与群で対照群に比較し有意に大きい値を示した。これは、細胞培養実験の結果から考察すると上顎歯列側方拡大における頬側歯槽突起部へのフルバスタチンの局所応用により骨芽細胞分化が促進し、拡大量は従来と変わらないものの、頬側の新生骨添加量が増加したと考えた。上顎側方拡大時における頬側歯槽突起部へのフルバスタチンの局所応用は、頬側歯槽骨吸収による根面露出を予防し、上顎歯列側方拡大限界量を増加させる可能性を示唆した。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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

石井武展 (TAKENOBU ISHII)
東京歯科大学・歯科矯正学講座・助教
研究者番号：80433978

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：