

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11317

研究課題名(和文) 骨髄間質細胞培養系新規担体と培養骨膜を組み合わせた骨再生法の開発

研究課題名(英文) Development of bone regeneration method combining new carrier of bone marrow stromal cell culture system and cultured periosteum

研究代表者

和田 圭之進 (Wada, Keinoshin)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：10533755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨欠損の修復ではドナーへの外科的侵襲が大きいという問題がある。そこで細胞接着性に優れた新規な担体を用いた新しい骨再生法の有用性を検討し、除去骨と同じ骨形態を再生することを目的とした。新しい骨再生のためには骨髄間質細胞培養システム、新細胞担体の開発、新技術による培養骨膜の精製が必須と考えられる。そこで足場としての有用性を確認するために、ウサギの頭蓋骨に円筒状のチタンメッシュを置き、増殖因子やサイトカインを多く含む血小板フィブリンをフィルム状にして挿入し、新しいゼラチンスポンジの代用品として使用できるかどうかを検討したが、著しい新しい骨再生は観察されなかった。

研究成果の概要(英文)：There is a problem that surgical invasion to the donor is large in restoration of the bone defect. Therefore, we examined the usefulness of a new bone regeneration method using a novel carrier excellent in cell adhesiveness, and aimed to regenerate the same bone form as the removed bone. It is considered that bone marrow stromal cell culture system, development of new cell carrier, and purification of cultured periosteum by new technology are essential items for the new bone regeneration. Therefore titanium mesh into a cylindrical shape was placed on the skull of the rabbit in order to confirm the utility as a scaffold, and platelet fibrin (Platelet-rich fibrin; PRF) containing a lot of growth factors and cytokines was put with a film shape which was investigated whether it could be used as a substitute for a new gelatin sponge, while significant new bone regeneration could not be observed.

研究分野：口腔外科学

キーワード：骨再生 チタン 成長因子

1. 研究開始当初の背景

骨髄間質はさまざまな細胞により構成される組織であり、造血幹細胞の維持、分化をコントロールする働きが知られている。また、骨髄間質にはマクロファージや樹状細胞などの造血単核細胞、骨芽細胞や脂肪前駆細胞などの間葉系細胞、血管前駆細胞などが存在している。骨髄を採取し単層培養を行うとコロニーを形成する細胞が出現する。この細胞こそ、試験管内における骨髄間質細胞といわれる細胞である。この細胞の中に自己複製能と複数の間葉系細胞へと分化する多分化能を有する幹細胞が存在している。間葉系細胞とは骨、軟骨、脂肪、骨格筋、真皮、靭帯、腱といった結合組織細胞を総称しており、発生学的に沿軸中胚葉由来の細胞である。すでに我々はラット骨髄間質細胞がリン酸取り込み機構を有し、最も石灰化に関与する因子の一つであることを報告した¹⁾。リンは生体内に広く分布し、その約8割はハイドロキシアパタイトの形で骨に存在する。この研究により、われわれは骨髄間質細胞がナトリウム依存性無機リン酸トランスポーターを発現しており、リンの細胞への取り込みが制御されていることや、骨芽細胞分化とリン酸トランスポーターの発現に関連があることなどを論文発表した²⁾。血管内皮前駆細胞(EPC)が従来の既存の血管内皮細胞の再形成(angio genesis)のほかに血管内皮前駆細胞からの発生(vasculogenesis)のメカニズムに関与することが明らかになり、現在では下肢虚血や虚血性心疾患の血管再生療法に用いられるようになってきた。今後の幹細胞治療においては血管再構築を促すための血管再生が再生医療の基盤となっていくことが予想される。口腔外科領域においても以前より特に骨再生における血管再構築の重要性が指摘されている。骨髄CD34陽性細胞が骨芽細胞に分化するという報告はすでにあり、血管再生と骨新生がこの細胞から同時に起こることから骨再生には格好の細胞といえる。骨折部への末梢血CD34陽性細胞の添加により優位な強度を持つ機能的骨折治癒が得られており、末梢血細胞による血管再生が可能となった現在、EPCに分化するヒト末梢血CD34陽性細胞が骨再生を促進する可能性が示唆されている。このことから骨髄間質細胞培養系を用いた生体での骨再生を確認したあと、より低侵襲で成功率の高いと思われる骨髄CD34陽性細胞を新しい骨再生の材料として動物実験を行う必要がある。

2. 研究の目的

骨欠損の修復は再建外科における重要な課題の一つであるが、ドナーへの手術侵襲増大による患者の負担や、元通りの顎形態を再

現することが難しいといった問題点がある。これまで放射線性および難治性骨髄炎や頭頸部腫瘍切除後の骨欠損、特に下顎骨の再建については、自家骨移植、同種骨移植、人工骨移植、金属プレート、吸収性プレートなどによる様々な再建方法が試みられてきた。しかし、それぞれにドナーの犠牲や異常免疫反応、感染、破損などの難点があり、手術の成功率や術後のQOLは高くなかった。このため現在は、最も安全な方法として血管柄付骨移植が下顎骨再建の主流となっている。一方、この方法にもドナーへの手術侵襲の増大、手術時間の延長、また元通りの下顎形態を再現することの困難さといった問題点がある。Minimally invasive surgeryが外科領域で広く提唱される現在、これらの問題点を解決することが口腔外科医にとって大きな課題である。そこでこの培養系を臨床応用するために、新規細胞担体と培養骨膜による骨再生を組み合わせて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

[1]ウサギ腸骨より骨髄採取：自家細胞移植を前提としてクリーンウサギ(16~18週齢、約3kg)を使用する。皮膚切開し大腿骨の全体を露出。皮質骨を除去し髓腔内より骨髄組織を採取する。

[2]骨髄分離・培養操作：骨髄細胞を取り出し、セルストレーナーを用いて通過してくる細胞を回収。細胞を沈渣で回収後、培地を除去。新しい無血清培地を入れ、接着細胞用培養用ウェルプレートに播種する。この際、細胞数計測板にて 0.5×10^6 cells以上/wellにする。顕微鏡で培養容器底面への接着伸展を確認し、培地に骨芽細胞分化誘導試薬を添加し培養する。高精度位相差顕微鏡を用いてALP染色等を行い分化誘導の確認を行う。

[3]担体：生体吸収徐放基材をベースに細胞が進入しやすい多孔構造、機械的強度を付加し、高い細胞親和性、生分解性、強度向上、収縮抑制効果を持つ-TCPを添加した強化型ゼラチンスポンジに単回継代した骨髄間質細胞を播種し、一定条件下で骨芽細胞へ分化させる。播種方法として $1 \sim 5 \times 10^5$ cell/mlの細胞をスポンジにしみこませ、静置して細胞を付着させ培養し移植片として使用する。生化学的分析にて骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化の確認。骨代謝マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)、オステオポンチン(OPN)、オステオカルシン(OCN)の発現の差異をコントロール群と細胞培養群で定量比較としてリアルタイムPCRで分析を行う。

[4]チタンメッシュのスキヤホールドとしての有用性を確認するために動物実験を行う。実験動物としてはウサギを用い、その頭蓋骨にチタンメッシュを円柱状に加工して植立し、非脱灰研磨標本を作製して、月単位で経時的に組織学的観察を行う。次にスキヤホールドと同時に自己の血小板や白血球由来の

PDGF-AB (血小板由来増殖因子)、TGF- (トランスフォーミング増殖因子)、IGF-1 (インスリン様成長因子)、EGF (表皮増殖因子)、VEGF (血管内皮細胞成長因子) などの成長因子やサイトカインを多く含み、軟組織および硬組織の組織修復を促進する多血小板フィブリン (Platelet-rich fibrin; PRF) を膜状に加工し、新規ゼラチンスポンジの代替として活用できるかを検討するために、ウサギ頭蓋骨に植立したチタンメッシュ内に PRF を膜状に加工したものを設置し、非脱灰研磨標本を作製して、月単位で経時的に組織学的観察を行う。

4. 研究成果

チタンメッシュはその表層をスキャホールドしてウサギの頭蓋骨側からの新生骨の再生を認めたと、その距離はわずかであった。この骨再生は多血小板フィブリンを充填したスペースにおいても特段の変化を示すことはなく、再生骨量はコントロールと比較して同程度であった。また骨代謝マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP)、オステオポンチン (OPN)、オステオカルシン (OCN) の免疫染色を行ったが、両者の染色性の違いはみられず、骨代謝においても変化は認められなかった。これらの所見から、再生骨のスキャホールドとしてチタン表面はある程度機能していたものの、再生骨が進入するスペースとしては適切ではなく、より狭い空間を提供するべきであり、多血小板フィブリンはそれらの条件を好転させるだけの効果を有していなかったと考えられた。

引用論文

1) Morimichi Mizuno et al. Type I collagen regulated dentin matrix protein-1(DMP-1) and osteocalcin(OCN) gene expression of rat dentin pulp cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 88:1112-1119 2003.

2) Keinoshin Wada et al. Extracellular inorganic phosphate regulates gibbon ape leukemia virus receptor-2/phosphate transporter mRNA expression in rat bone marrow stromal cells. *Journal of Cellular Physiology* 198:40-47 2004.

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4件)

1. Kanayama T, Horii K, Senga Y, Shibuya Y. Crestal approach to sinus floor elevation for atrophic maxilla using platelet-rich fibrin as the only grafting material: a 1-year prospective study. *Implant dentistry*. 2016, 25(1): 32-38. doi:

10.1097/ID.0000000000000327.

- Kimoto A, Shibuya Y, Kobayashi M, Akashi M, Hasegawa T, Suzuki H, Komori T. Postradiotherapy dental implant insertion into bone grafts harvested from nonirradiated tissue: case report. *Implant Dentistry*. 2016, 25(5): 715-719. doi: 10.1097/ID.0000000000000473.
- Aoki N, Kanayama T, Maeda M, Horii K, Miyamoto H, Wada K, Ojima Y, Tsuchimochi T and Shibuya Y. Sinus augmentation by platelet-rich fibrin alone: a report of two cases with histological examination. *Case Reports in Dentistry*. 2016, 2016: 1-7. DOI: 10.1155/2016/2654645.
- 倉田雅志、金山健夫、青木尚史、津元多貴恵、堀井幸一郎、宮本大模、渋谷恭之。上顎切除後の頬骨にインプラントを埋入して口腔リハビリテーションを行った1例。顎顔面インプラント誌。15: 95-100, 2016.

〔学会発表〕(計18件)

- 中野里奈、山内千佳、津元多貴恵、中西由佳理、高井美玲、千賀靖子、見田万里子、須藤満理奈、宮本大模、渋谷恭之。インプラント治療歴のある患者に対する周術期口腔機能管理。第14回日本口腔ケア学会学術大会。2017年。
- 堀井幸一郎、津元多貴恵、由地 伶、佐藤 隼、高井美玲、青木尚史、渋谷恭之。インプラント治療歴のある患者に対する周術期口腔機能管理。第42回日本口腔外科学会中部支部学術集会。2017年。
- 青木尚史、高島裕之、倉田雅志、宮本大模、堀井幸一郎、渋谷恭之。当科における広範囲歯牙欠損症例に対するインプラント治療の臨床的検討。日本顎顔面インプラント学会学術大会。2017年。
- 高島裕之、青木尚史、高井美玲、千賀靖子、堀井幸一郎、宮本大模、渋谷恭之。当科における高齢者に対するインプラント治療の臨床的検討。日本顎顔面インプラント学会学術大会。2017年。
- 青木尚史、由地玲、高井美玲、倉田雅志、津元多貴恵、堀井幸一郎、宮本大模、渋谷恭之。移植材として PRF を単

独使用した上顎洞底拳上術に関する臨床的検討.第20回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会.2016年.

6. 津元多貴恵、堀井幸一郎、由地伶、佐藤隼、高井美玲、青木尚史、渋谷恭之 . インプラント治療歴のある患者に対する周術期口腔機能管理.第20回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会.2016年.
7. 高井美玲、青木尚史、堀井幸一郎、宮本大模、千賀靖子、津元多貴恵、渋谷恭之 . 薬剤関連顎骨壊死を併発したインプラント周囲炎に対する保存療法の1例.第20回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会.2016年.
8. 由地伶、堀井幸一郎、倉田雅志、佐藤隼、中村英貴、宮本大模、青木尚史、渋谷恭之 . PRF と吸収性コアゲルを用いた三層構造によりGBRを行った1例.第20回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会.2016年.
9. 佐藤隼、青木尚史、由地伶、倉田雅志、宮本大模、堀井幸一郎、渋谷恭之 . インプラント先端部に嚢胞様透過像を呈した肉芽腫病変の1例.第20回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会.2016年.
10. 津元多貴恵、堀井幸一郎、青木尚史、由地伶、土持師、渋谷恭之 . インプラント周囲炎に対して光線力学療法(a-PDT)を行った1例.第70回NPO法人日本口腔科学学会学術集会.2016年.
11. 竹内集、金山健夫、千賀靖子、倉田雅志、土持師、渋谷恭之 . 無歯顎症例に対するインプラント治療の後ろ向き調査.第69回NPO法人日本口腔科学学会学術集会.2015年.
12. 倉田雅志、金山健夫、鳥山和宏、渋谷恭之 . 人工関節頭および腭骨による下顎骨再建後に骨延長及びインプラントにより機能回復を行った1例.第40回日本口腔外科学会中部支部学術集会.2015年.
13. 千賀靖子、金山健夫、堀井幸一郎、宮本大模、竹内集、倉田雅志、渋谷恭之 . 上顎悪性腫瘍切除術と同時にインプラント埋入術を施行し機能回復を行った2例.第60回日本口腔外科学会総会・学術集会.2015年.
14. 由地伶、金山健夫、須藤満理奈、横山善弘、堀井幸一郎、青木尚史、渋谷恭

之. Crestal Approach Sinus Lift における術前画像による残存骨量計測の有用性について.第60回日本口腔外科学会総会・学術集会.2015年.

15. 青木尚史、宮本大模、金山健夫、倉田雅志、千賀靖子、津元多貴恵、堀井幸一郎、渋谷恭之 . Platelet Rich Fibrin 単独使用による上顎洞底拳上術後の組織学的検討.第19回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会.2015年.
16. 宮本大模、青木尚史、倉田雅志、千賀靖子、堀井幸一郎、金山健夫、渋谷恭之 . Platelet-Rich Fibrin とチタンメッシュを用いたGBR法の検討.第19回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会.2015年.
17. 倉田雅志、堀井幸一郎、青木尚史、金山健夫、千賀靖子、津元多貴恵、鳥山和宏、宮本大模、渋谷恭之 . 人工関節頭および腭骨による下顎骨再建後に骨延長およびインプラントにより機能回復を行った1例.第19回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会.2015年.
18. 津元多貴恵、青木尚史、金山健夫、堀井幸一郎、宮本大模、倉田雅志、千賀靖子、渋谷恭之 . 当科における広範囲顎骨支持装置に対する口腔衛生管理について.第19回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会.2015年.

〔図書〕(計1件)

渋谷恭之(分担) 歯科衛生士講座 口腔外科学 第2版 永末書店.2017.3-17.インプラントに関する処置.259-262.4-7.骨延長術.280-281.4-20.上顎洞底拳上術(サイナスリフト).303-304.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 圭之進(WADA, Keinoshin)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号:10533755

(2) 研究分担者

尾島 泰公(OJIMA, Yasutaka)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号:40403240
渋谷 恭之(SHIBUYA, Yasuyuki)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号:90335430