

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11323

研究課題名(和文) 癌患者に使用可能な再建用再生骨の開発

研究課題名(英文) Development of reconstructive regenerative bone that can be used for cancer patients

研究代表者

米原 啓之 (YONEHARA, Yoshiyuki)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：00251299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では癌患者において用いることの可能な再建材料を開発することを目的とした。骨膜より再生される骨では骨再生は5日目より確認され、骨量は1週目に最大量であった。足場素材として、人工材料の -TCPを移植した実験では材料周囲に良好な骨造成が観察された。また生体組織足場素材として軟骨移植した実験では軟骨周囲に良好な骨形成を認めた。骨髄幹細胞の影響の検討では、骨髄幹細胞を移植することにより移植後3週において欠損部の骨形成が認められ6週において良好な骨再生が得られていた。再生骨を顎骨骨欠損部に移植した結果、骨欠損部は2週において修復されており、4週においても安定した状態が保たれていた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop reconstructive materials that can be used in cancer patients. Bone regeneration from the periosteum was confirmed from the 5th day, and the bone volume reached the maximum amount at the 1st week. In experiments in which -TCP was transplanted as an artificial bone, osteogenesis was observed around the transplanted material from 4 weeks after transplantation, and good bone formation was observed at 12 weeks. In cartilage transplantation, good bone formation was observed around the transplanted cartilage. We investigated the possibility of promoting bone regeneration by adding bone marrow stem cells. At 3 weeks after transplanting bone marrow stem cells into the jaw bone defect, osteogenesis of the defect was observed, and good bone regeneration was obtained at 6 weeks. As a result of transplanting the regenerated bone to the bone defect, the bone defect was restored by newly formed bone at 2 weeks, and it remained stable even at 4 weeks.

研究分野：顎顔面再建外科，口腔外科，再生医療，形成外科

キーワード：顎顔面再建 骨再生 骨増生 人工骨 軟骨移植

## 1. 研究開始当初の背景

顎顔面外科領域における悪性腫瘍切除による骨欠損に対しては、主に自家骨移植による再建が行われている。近年、悪性腫瘍に対する治療成績の向上により患者の5年生存率も向上し、患者のQOLの改善のために再建手術が行われる機会が増加してきている。顎顔面外科領域においては、骨欠損に対して支持組織である骨を再建し、気道確保や言語機能および咀嚼機能を回復するとともに整容面からも満足される再建を行うことが重要である。骨移植を行う場合には、重要な支持組織である骨を身体の内臓の部分より採取してこなければならない必要があり、そのための手術侵襲や手術後の採取部分の機能障害が問題であり、また移植骨の量および形態にも制限がある。特に上下顎骨の再建時には骨としての形態の再建だけでなく、咀嚼嚥下のために咬合の再建も必要となる。咬合の再建には腸骨海綿骨細片移植がインプラント治療と併用できることから骨量および形態の面で有効である。しかしこの方法では海綿骨が大量に必要であり、脂肪髄の多い高齢者では骨髄海綿骨採取が困難で本法による再建が行えない患者も多い。一方再生医療の研究が盛んになり、再建に用いる移植組織を低侵襲な採取法により得られた細胞を体外で増殖させ移植組織を獲得する試みが検討されている。現在はiPS細胞などを用いた遺伝子組み換え技術により再生された組織を人体へ移植するといった方法が主流である。しかし、この方法には遺伝子導入を行うため発癌性などの問題が危惧される。また現在行われている幹細胞や体細胞を用いた方法では、細胞培養における増殖効率を向上させるためにb-FGFなどの細胞増殖を促す因子が用いられている。しかし、これらの因子は、癌患者においては癌細胞に対する影響があるため禁忌である。このため現状では癌患者における再建材料として現在研究が行われている再生医療組織の多くは用いることが出来ない。これらのことからわれわれは悪性腫瘍切除後および高齢者に対して用いることの可能な顎骨再建用骨組織の開発を検討した。

## 2. 研究の目的

再建法として自家腸骨海綿骨細片とプレートによる移植術は整容的な形態のみならず咬合や咀嚼嚥下など機能的にも有効

である。しかし、現在癌患者における低侵襲で有効な再建方法がないのが現状である。本研究では骨膜・軟骨の骨形成能と非培養生体内組織および安全性の担保された人工材料を用いて、癌患者において用いることの可能な再建材料を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 血管柄付き骨膜の骨新生量の検討

血管柄付き骨膜移植のモデルとして、ラット腓骨の血管柄付き骨膜を用いた。実験モデルは、骨より骨膜を剥離し、腓骨を膝関節から足関節まで除去した。骨の除去された筋骨膜の切開部分を骨膜面が互いに向き合うように縫合閉鎖し、筋骨膜への血流が維持されるようにした。以上のように下腿に作成した血管柄付き筋骨膜弁を用いて、その骨膜より再生される骨の状態を経時的に観察した。このモデルにより細片骨として移植するに適した再建材料として用いる際に重要である、再生される骨量が最大となる時期を決定した。手術後2、4、6、12週目および24週目でmicro-CT写真撮影を行い、その後組織標本の作成を行った。評価はmicro-CT画像、H.E.染色標本など組織学的標本を用いて各時期の骨形成状態の定性的な評価を行った。

### (2) 軟骨細胞の骨再生能の検討

ラット胸部より採取した肋軟骨を細片状にして上顎骨骨膜下に作成した移植床に移植して細片状軟骨移植の場合における骨形成過程を経時的に検討した。この検討では再生される骨形成量の経時的検討のみならず、軟骨自体が骨へと変化して行く骨置換性についても検討した。評価はmicro-CT画像、H.E.染色標本など組織学的標本を用いて各時期の骨形成状態の定性的な評価を行った。

### (3) 線維芽細胞の骨再生能の検討

線維芽細胞の骨再生足場素材としての可能性を検証するモデルとして、皮膚真皮組織を骨膜下に移植するモデルを使用した。実験モデルとしてラット尾部より採取した皮膚組織より表皮を切除して真皮組織のみとした。この真皮組織を細片化して、上顎骨骨膜下に作成した移植床に移植して真皮組織線維芽細胞の骨形成の可能性を経時的に検討した。micro-CT画像、H.E.染色などの組織標本を用いて各時期の骨形成状態の定性的な評価を行った。

#### (4) 足場素材としての人工材料の検討

人工材料として  $\beta$ -TCP を素材とするテトラポーンおよび PuraMatrix を用いた。テトラポーンは大腿骨骨膜下に作成した移植床に移植して骨の再生過程を観察した。PuraMatrix は軟骨細片移植時に細片状軟骨と共に上顎骨骨膜下に作成した骨膜下ポケットに移植して軟骨移植の場合における骨形成過程と同様に骨再生過程を経時的に検討した。この検討では再生される骨形成量の経時的検討のみならず、軟骨自体が骨へと変化して行く骨置換性についても検討した。評価には micro-CT 画像、H.E.染色標本を用いて各時期の骨形成状態の定性的な評価を行った。

#### (5) 骨髄幹細胞の骨再生能の検討

骨髄幹細胞を骨欠損部に移植するモデルにより、骨髄幹細胞の骨再生に与える影響を以下のモデルで検討した。マウス大腿骨および脛骨を採取し粉碎して、この骨細片を処理して細胞ストレーナーで濾過した。この細胞に細胞選別を行い、得られた細胞をマウス上顎臼歯部抜歯窩に作成した骨欠損部に移植した。また、DiI 標識細胞を同様に作成した骨欠損部に移植して、移植後 5 日目に蛍光顕微鏡を用いて移植細胞の生存および局在を調べた。

評価法では micro-CT 画像、組織標本を用いて各時期の骨形成状態の定性的な評価を行った。組織学的検討においては、H-E 染色を用いて分析し、骨組織特性を検討すると共に、組織形態計測分析のために、骨欠損部内の骨髄面積を定量分析した。組織切片を脱パラフィンし、酸性ホスファターゼ白血球キットを用いて TRAP 染色を行い、破骨細胞の局在を決定した。各領域における TRAP+細胞の数が計数された。骨芽細胞を同定するために、Runx2 を免疫組織化学によって検査した。

#### (6) 再生骨生体内への移植後変化の検討

(1)の方法等により得られた各種再生骨においても細片状骨移植を行うことが有効であるか否かを検討した。骨再生量が最大となる時期に筋骨膜弁において得られた各種再生方法で形成された骨を細片状に加工し、この移植骨を下顎骨欠損部分に再建材料として移植した。この骨移植の移植後の変化の過程を骨吸収の有無や骨質の変化などを中心に検討した。血管柄付き骨膜移植のモデルとして、(1)で作成したラッ

ト腓骨の血管柄付き骨膜を用いた。骨切除後 1 週間で骨膜より再生された移植骨を  $0.5 \times 1 \times 12\text{mm}$  の大きさに裁断粉碎して細片とした後、下顎骨に形成した骨欠損部に移植した。micro-CT 画像、組織学的および免疫組織学的観察用に作成した標本を用いて各時期の骨形成状態の定性的な評価を行った。

#### (7) 再生骨の賦形性および力学的強度についての検討

本研究で得られた研究成果を臨床に応用する際に必要となる臨床例における骨移植について、移植骨の形態についておよびその力学的強度について基礎的なデータを収集した。

### 4. 研究成果

#### (1) 血管柄付き骨膜の骨新生量の検討

下腿に作成した血管柄付き骨膜において、腓骨を除去して骨膜より骨再生を micro-CT 画像を用いて観察した結果では、骨再生は骨膜除去後 5 日目には骨幹部中心部分より認められた。再生当初は再生骨は塊状を呈しており、太く短い形態であったがその後次第に本来の腓骨の形状に近い状態へと骨端部に向けて細く長く形態が変化していく状態が観察された。定量的な解析では再生骨量は再生後 7 日目の骨量が最も多く、その後 4 週目までの期間は骨量自体は減少が認められた。6 週目以降については骨量事態の変化は認められず、再生された骨は維持されていた。

組織学的な観察では再生骨は 7 日目には再生骨は骨密度も低く網状骨から形成されている状態が観察された。その後、骨内部および骨表面でのリモデリングにより形成された幼若な網状骨が次第に成熟した層板状骨へと置換されていく状態が観察された。

#### (2) 軟骨細胞の骨再生能の検討

ラット肋骨より採取した肋軟骨を上顎骨に作成した骨膜下ポケットに移植を行い micro-CT 画像を用いて観察した結果では、移植を行った細片状の軟骨周囲に良好な骨再生が認められた。また、この骨再生過程において移植した肋軟骨は吸収されることなくその形態を維持していた。このことから、軟骨細片は骨再生の良好な足場素材になる可能性が示唆され、再生骨の増量および賦形性維持に有用な素材であると考えられた。Micro-CT 画像を用いて観察した結果では、移植した軟骨組織が骨組織へと置換している状態については観察が困難なた

め、現在組織学的標本を作成中であり、今後軟骨の骨組織への置換の可能性については検討を継続している。

### (3) 線維芽細胞の骨再生能の検討

線維芽細胞の骨再生足場素材としての可能性を検証するモデルとして、皮膚真皮組織を骨膜下に移植するモデルを使用した。肋軟骨移植モデルと同様に、ラット尾部より採取した皮膚組織より表皮を切除して真皮組織のみとし、この真皮組織を細片化して、上顎骨骨膜下に作成した移植床に移植した。Micro-CT 画像による観察においては、真皮移植を行った部分においては、コントロールと比較しても通常の骨膜剥離に伴う骨膜下の骨肥厚が認められるのみで、真皮組織移植による有意な骨増量は認められなかった。このことから放射線学的には真皮組織のみでは骨再生の足場素材としての有用性は少ないと考えられた。移植組織の吸収状態や移植部分の骨再生状態については、現在組織学的標本を作製して、組織学的検討を行っている。

### (4) 足場素材としての人工材料の検討

人工材料として  $\beta$ -TCP を素材とするテトラポーンを大腿骨骨膜下に作成した移植床に移植して骨の再生過程を micro-CT 画像を用いて観察した結果では、移植後 4 週目において、骨膜下に骨再生が認められ、移植後 8 週目には良好な骨再生により人工骨周囲に骨組織が形成されている状態が観察された。骨再生はその後継続して維持されている状態が確認できた。組織学的観察において、人工骨周囲に骨組織の形成が認められ、特に人工骨と既存骨および人工骨同士の間隙に骨再生が良好に認められた。このことから、テトラポーンのテトラポッド型形状が人工骨同士や既存骨との間隙を維持するのに有効に作用していると考えられた。PuraMatrix を軟骨細片移植時に細片状軟骨と共に上顎骨骨膜下に作成した骨膜下ポケットに移植して軟骨移植の場合における骨形成過程と同様に骨再生過程を micro-CT 画像により経時的に検討した結果では、移植した部分において軟骨の形態としては維持されていたが、軟骨周囲に有意な骨再生は認められなかった。このことから、PuraMatrix は骨膜下のポケットにおいて骨再生が生じるスペースにそれ自体が入り込んでしまい、骨再生量を減少させる可能性があることが示唆された。しかし、軟骨自体は移植後その形態が維持されているため、現在作成中の組織学

的標本の観察により軟骨の生着に必要な血流の維持や軟骨が骨へと置換することに対する PuraMatrix の影響について検討を行っている。

### (5) 骨髄幹細胞の骨再生能の検討

骨髄幹細胞を骨欠損部に移植するモデルの micro-CT 画像による観察においては、移植細胞を骨欠損部に移植した後、細胞移植を行わなかった対照群と比較して、移植群の放射線不透過性領域が 2 週および 3 週目ともに増加する傾向があった。さらに、咬合平面画像では調査期間中の移植群と比較して、対象群の骨陥凹の面積が対照群の方が広いことを示した。定量分析ソフトウェアを使用して、近心、頰側および遠位の舌側ソケットを含む 3 つの部位について骨量を計算した。3 つのソケットの骨量は、3 週目で対照群と比較して移植群で有意に高かった。しかし、6 週間で群間に有意差はなかった。ソケット内の透過画像領域の比は、移植群で 3~6 週間保持される傾向があった。移植群の放射線不透過領域は対照群に比べて 6 週間で低かった。逆に、対照群の放射線不透過性領域は 3 週間から 6 週間に徐々に増強された。

細胞移植の 5 日後、DiI 標識 BMMSC は、歯肉上皮と粘膜固有粘膜の境界で容易に視覚化された。これらの結果は、移植された細胞が、移植後 5 日間ソケット内で生存したことを示唆している。

新生骨および骨髄を同定するために、細胞移植の 6 週後に H-E 染色による組織学的評価を行った。骨欠損部は上皮化し、粘膜固有粘膜は再生しており正常な歯肉が観察された。骨自体も組織的には血管新生の良い骨で構成され、ハーバース管を取り囲む層状構造を有していた。形成された歯槽骨の高さを H-E 染色切片から測定した結果では移植群と対照群との間に有意差はなかった。しかし、骨欠損部は治癒の程度に依存する様々な成熟度の石灰化骨および骨髄によって占められていた。硬組織は層状骨および網状骨から構成されていた。移植群再生骨は対象群に比較して骨髄のより多く認められる骨より形成されていた。移植群の骨髄面積の有意な増加認められ対応するマイクロ CT 画像の観察と一致していた。破骨細胞の局在を決定するための TRAP 陽性細胞の定量分析では、TRAP 陽性細胞は主に、骨髄を含む骨腔の

境界領域内に認められた。さらに、移植群の TRAP 陽性破骨細胞数は対照群と比較して有意に高かった。しかし、Runx2 陽性および PCNA 陽性骨芽細胞局在は対象群と同様であった。

#### (6)再生骨生体内への移植後変化の検討

各種再生骨においても細片状骨移植を行うことが有効であるか否かを検討した。対照群としては自家骨移植群を用いた。骨再生量が最大となる時期に筋骨膜弁において得られた各種再生方法で形成された骨を細片状に加工し、この移植骨を下顎骨欠損部分に再建材料として移植した。Micro-CT 画像による観察において、再生骨移植群では、移植骨は新生骨および既存骨と完全に連結し、骨欠損部は2週目に閉鎖されていた。その後、4週目には骨表面は滑らかとなっていた。対照群では、2週目に移植骨と既存骨組織との間に骨結合が見られ、4週目に欠損部はグラフト骨および新たに形成された骨でほぼ満たされていたが欠陥は完全には閉鎖されなかった。また、骨の表面は粗く移植骨の形態が残っていた。移植部位定量化のための骨密度分析では、再生骨移植群の骨密度が対照群に比べ増加していた。

組織学的および免疫組織化学的分析では4週目に再生骨移植群では、骨欠損部が新生骨で充填され層状骨で架橋していた。新たに形成された骨と既存骨との間に明確な境界は確認できなかった。新生骨舌側表面に多数の Runx2 陽性骨芽細胞が観察され少数の TRAP 陽性破骨細胞が骨表面に見られた。対象群でも、骨欠損部はほぼ骨組織で満たされ、層状骨の架橋も認められたが線維性結合組織が部分的に観察され、一部に骨の中空部分を認めた。また、骨舌側の表面上に多数の Runx2 陽性骨芽細胞および TRAP 陽性破骨細胞が発見された。

#### (7)再生骨の賦形性および力学的強度についての検討

本研究で得られた研究成果を臨床に応用する際に必要となる臨床例における骨移植について、移植骨の形態等について検討を行った。その結果、顎骨再建において血管柄付骨移植、遊離骨移植などの自家骨移植や再建用プレートを使用した即時再建が行われていた。顎骨再建では、咀嚼・嚥下・構音等の機能と顔面形態の維持が重

要であり、そのために下顎骨の残存骨片を術前とほぼ同じ状態に再現することが必要であった。このためには下顎骨の連続性が維持されることが理想的であった。

使用する素材としては、再建用プレート等ではチタン製のものが生体親和性の改善や異物反応軽減による感染および排出の危険性が低下により有用であった。また、3次元造形モデルを使用することは賦形性や適切な固定により力学的な強度維持において有効であった。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

玉川崇皓, 生木俊輔, 岩田潤, 田中孝佳,  
大山哲生, 石上友彦, 金子忠良, 米原啓之, 3D プリンター模型を用いた下顎骨即時再建法の検討, 顎顔面補綴, 査読有,  
40巻, 2017, 21-25

[学会発表](計 3件)

安光智洋, 生木俊輔, 岩田潤, 真下貴之, 米原啓之, 顎骨再建症例における骨造成量の経時的变化について, 第17回日本再生学会総会, 2018年  
小澤洋輔, 生木俊輔, 荻澤翔平, 西澤智香子, 岩田潤, 古川明彦, 秀真理子, 外木守雄, 米原啓之, 当院におけるベニアグラフトとチタンメッシュによるGBR症例の比較検討, 第71回日本口腔科学会学術集会, 2017年  
小澤洋輔, 生木俊輔, 荻澤翔平, 西澤智香子, 岩田潤, 古川明彦, 秀真理子, 外木守雄, 当院におけるチタンメッシュによる骨造成について, 第47回日本口腔インプラント学会学術集会, 2017年

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

米原 啓之 (YONEHARA, Yoshiyuki)  
日本大学・歯学部・教授  
研究者番号: 00251299

(2)研究分担者

本田 和也 (HONDA, Kazuya)  
日本大学・歯学部・教授  
研究者番号: 30199567  
生木 俊輔 (NAMAKI, Shunsuke)  
日本大学・歯学部・講師

研究者番号：70386077

真下 貴之 (MASHIMO, Takayuki)

日本大学・歯学部・非常勤医員

研究者番号：30736450

岩田 潤 (IWATA, Jun)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：20757629