

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20468

研究課題名(和文) 早期血管増殖を誘導するハニカム構造を用いた新規骨再生療法の開発

研究課題名(英文) The development of new methods of bone regeneration using honeycomb collagen induced early vessel formation

研究代表者

弓削 文彦 (yuge, fumihiko)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：60713609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：トンネル構造を持つバイオマテリアルは早期の血管新生及び肉芽組織の形成に影響することがわかってきた。また骨の再生において血管の存在が必要なことが明らかになってきた。本研究はトンネル構造を持つハニカムコラーゲンが骨再生に与える影響を調べた。ビーグル犬の上顎歯槽骨上にトンネル構造を持つハニカムコラーゲンを骨面に対して垂直、または水平に留置し組織学的な検索を行った。またCTを撮影し骨の3Dモデルの構築を行った。

研究成果の概要(英文)：The pore structure of biomaterials induces early Vessel formation and granulation tissue formation. and blood Vessels are necessary for bone regeneration. The purpose of this study is to explore honeycomb collagen with tunnel structure will have efficacy for bone formation. The tunnel direction of the honeycomb collagen was implanted parallel or perpendicularly to Maxillary alveolar bone of beagles. The dogs were sacrificed 8 weeks post-surgery, and healing was evaluated histologically. Maxillary alveolar bone of beagles of 2D slice images was acquired by a CT and a 3D image data set was prepared by combining these images.

研究分野：再生歯学

キーワード：ハニカムコラーゲン 骨再生

1. 研究開始当初の背景

一般的な歯科臨床において骨欠損に対する骨造成を行う場面は補綴治療、インプラント治療、歯周病治療と多岐にわたる。インプラント分野では骨に直接インプラント体を埋入するという治療の特異性により十分な骨量があることが条件となっているため、骨造成を行う場合が少なくない。しかし、一般的に骨造成後インプラント治療できるようになるまで半年から1年ぐらゐを骨造成の期間としてとっていることが多く、また骨造成後の経年的な減少に耐えうる十分な骨の再生も必要とされる。また高齢化社会を迎え、口腔ガンの数は今より2倍以上に増えてくるといわれており、広範囲の顎骨の除去を伴う手術では、欠損に対しては骨移植が行われ、顎堤の形態が変わり、術後の補綴(顎義歯等)は困難を極める。義歯が安定して入れられるためには、できるだけ短期間で必要十分な骨量と形態を容易にコントロールできる骨造成法が望まれている。

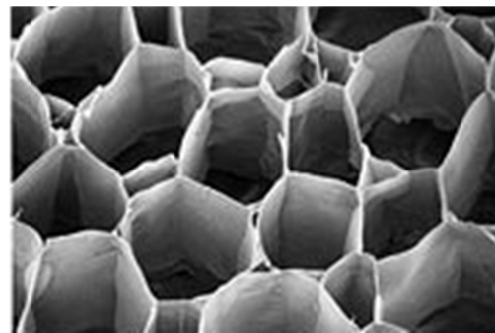
しかし、現在臨床応用されている自家骨移植は、自身の骨を利用するため、採取量や採取部位の制限や腸骨(腰)や脛骨(足)などから骨採取する場合は侵襲が大きい。またGBR法は比較的容易であるが、大きな再生量を必要とする場合にはスペースの確保が困難であり、治療期間中の強度不足、機能低下に対する改善が必要であるため、新規に短期間で必要十分な骨量と形態を容易にコントロールできる骨造成法が期待されている。

新生した血管は修復のスペースにランダムに分岐増殖するが、大半が閉鎖してしまい、ほんの一部の血管が血液の循環路となると、太い血管として成長、成熟することが近年の研究から解明されてきた。そこで、血管新生の無駄を省き短期化することによって肉芽組織の形成期間、さらには再生に必要な期間を早める事が出来るのではないかと仮説を立てた。これまでの研究によって、直径200~400 μm のトンネル構造に血管が侵入すると、その入り口から出口まで血管が数回のみ分岐して内腔を満たしながら1方向に増殖進行することが解った。次に臨床モデルをもちいて再生量の検索を行った。トンネル方向が様々なランダムトンネル型の構造を付与したbeta-tricalcium phosphate (TCP)を、ビーグル犬の根分岐部級欠損部に充填した結果、トンネル構造は、トンネルの入り口付近の既存組織由来の肉芽組織形成を加速し、一般的に組織の形成が遅いと考えられる骨組織や歯根膜組織でさえも優先的に再生のスペースへ形成する(占有させる)事が出来ることが解った。そこで、次にトンネル構造をバラバラの方向にするのではなく1方向にすることによって再生させたい組織を優先的に(選択的に)増殖させられるのではないかと考え、1方向のトンネル構造をもつハニカムコラーゲンを用いて、ビーグル犬の水平性骨欠損モデルで検証したところ、トン

ネル構造周囲の組織がトンネル内腔に沿って増殖することで、再生(増殖)方向を操作できる可能性が示された。またトンネル構造のコラーゲンの壁が意図しない周囲組織の侵入を妨げる役割を持つ可能性も考えられた。

これまでにトンネル構造が新生血管を誘導、血管の増殖を観察してきた、さらにトンネル構造により骨が造成することもわかってきている。この現象について、骨造成する環境としてトンネル構造の200~400 μm の直径が骨の栄養血管が通るハバース管と同じ大きさであることが関係あるのではないかと考えている。しかしこの微小空間(200~400 μm のトンネル)が骨を増殖する因子になっているのか、または幹細胞からの骨芽細胞への分化の促進させる因子となっているのかまだわかっていない。さらに骨造成の過程で自己成長因子との関わりが重要になってくる。自己成長因子により骨組織の誘導や骨組織の増加作用が促進されることがすでにわかっているが、トンネル構造による骨の造成の過程でどの段階でどの自己成長因子が発現するのかわかっていない。

図1 ハニカムコラーゲンのトンネル構造



2. 研究の目的

これまでの研究ではトンネル構造によって新生血管が誘導、増殖、骨の造成が起こることがわかってきたが、骨形成に至るまでの過程はわかっておらず、トンネル構造における骨形成メカニズムを解明することで、肉芽組織の形成や骨組織形成の早期化に繋がる可能性がある。次にトンネル構造に有効な成長因子の発現時期を調べる事は、成長因子が発現する時期に合わせて人為的に成長因子を添加し、投入時期を早めることにより、骨組織形成の速度を早める可能性がある。骨形成における一般的なマテリアルの空間に比べ、トンネル構造を付与したマテリアルではハバース管に似た微小空間を作ることが骨組織と類似した環境を作ることができ、細胞の成長因子に対する感受性を高めることがわかれば、バイオマテリアルの微小空間の有無によって細胞の感受性を高めたり、低めたり調整することが可能になるかもしれない。トンネル構造を用いた骨形成の有用性を検索するために、基礎的検索を行っていく。

3. 研究の方法

実験動物として12月齢のビーグル犬を用いた。

ビーグルを全身麻酔下で上顎P1からP3までの歯牙を抜去し、歯槽頂に沿って切開、頬側歯肉を剥離し歯槽骨を露出させる。

実験群として

トンネル構造を付与したハニカムコラーゲンをを用い

実験群として

- (1) トンネル構造が骨面に対して垂直になるように留置 (n=6)
- (2) トンネル構造が骨面に対して水平になるように留置 (n=6)
- (3) トンネル構造が骨面に対して垂直になるように留置し FGF を含有させたもの (n=6)
- (4) トンネル構造が骨面に対して水平になるように留置し FGF を含有させたもの (n=6)

対照群として

- (5) 骨面に対してトンネル構造を持たないコラーゲンを留置 (n=6)
- (6) 骨面に対して何も留置しない (n=6)

各群は片顎につき3箇所、実験材料を留置した。留置する位置を中心に5ミリ離れた上下左右の歯槽骨に垂直に穴をあけガッタパーチャーをマーカーとして充填した。

図2 歯肉を剥離し歯槽骨上にトンネル構造を持つハニカムコラーゲンを留置



観察期間は8週とし、観察期間終了後全身麻酔下で灌流固定、上顎片顎ずつ取り出し浸漬固定。固定終了後、組織をCTスキャンにかけて、その画像をもとに3Dモデルの作成を行った。試料は脱灰、包埋を行い薄切し組織学的検索を行っている。

4. 研究成果

CTの3Dモデルより、トンネル構造を骨面に対して垂直に留置した方が水平に留置するよりも骨の増殖は増加した可能性があり。さらにFGFを含有させた方が骨の増殖量は大きい可能性があった。より詳細は組織学的検索により明らかになると思われる。今回使用したコラーゲンはアテロコラーゲンでアレルギー反応が低く生体親和性があることに加え細胞の足場となり得る、また膜状のコラーゲンにより、ハニカム構造を構成している。この膜状のコラーゲンはバリアーとなり周囲からの細胞増殖を抑え、内部へ向かう治癒を遅延させたと考えられる。しかし全体としては移植材に含まれるコラーゲン密度は低いので創傷の治癒の遅延は抑えられたとも

考えられ、血餅は移植されたコラーゲン内部とコラーゲンに囲まれたハニカムスペースに満たされ、早期の血管新生に繋がったと推測される。以前の研究結果より、移植材の気孔率やポアサイズが血管新生に影響を与える。バイオマテリアルの気孔が140 μ mより大きい場合には、小さいものに比べて早期に血管形成を誘導する。欠損部へ新生した血管は、その場で硬組織形成を支援する栄養供給、細胞提供と成長因子を提供すると言われている。また100から400 μ mの連続気孔を持つバイオマテリアルは、内部の新生骨の形成を増加すると報告がある。本研究のハニカムの直径300 μ mであり同様の効果があると推測される。3Dモデルで骨の増殖量に違いが見られたのはトンネルの構造の方向が異なることが骨組織の形成量に影響が出たと考えられる。骨面に対してトンネル構造が垂直に留置した方が表面の骨より骨細胞の供給をより受けたと考えられ、早期に血管形成され骨の栄養血管となり、骨細胞と成長因子提供をトンネル構造によって周囲組織の影響を受けずに得ることができたと推測できる。今後の研究の課題として大容量の骨の再生を起こすにはコラーゲンの物理的な強度が不足しているため外圧には弱いと考えられる。コラーゲン自体の強度を増す方法やトンネル構造を有する新たな素材について検討していく必要がある。

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

弓削 文彦 (Yuge Fumihiko)
北海道大学・北海道大学病院・医員
研究者番号：60713609

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()