

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20500

研究課題名(和文) 分化増殖因子徐放型材料および歯髄幹細胞による顎骨再建法の開発

研究課題名(英文) Development of method for using the growth factor releasing titanium and dental pulp stem cells for jaw bone reconstruction.

研究代表者

遊佐 和之 (Yusa, Kazuyuki)

山形大学・医学部・医員

研究者番号：80636960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では亜鉛徐放性を有した亜鉛放出型チタンディスクおよび歯髄幹細胞を用いた顎骨再建法の開発を試みた。亜鉛放出型チタンディスクが骨芽細胞分化へ与える影響に関して、ディスク上で歯髄幹細胞を培養した所、アルカリフォスファターゼ活性、リアルタイムPCR、基質石灰化などの点を検討した。亜鉛放出型チタンディスク上での培養により骨芽細胞分化が亢進されることが確認された。これらの結果から亜鉛放出型チタンをスキャフォールドとした顎骨再建法開発の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to develop the bone regenerative therapy for jaw bone defect applied to zinc ion releasing titanium and dental pulp stem cells. To evaluate the stimulating effects of the zinc releasing titanium, we performed alkaline phosphatase activity, real time PCR, alizarin red staining. Our results indicated the future possibility of clinical application of zinc ion releasing titanium as a scaffold for jaw bone reconstruction.

研究分野：医歯薬学

キーワード：顎顔面再建外科学 骨芽細胞 再生医学 分子生物学

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域における外傷や腫瘍切除にともなう広範な骨欠損および顎骨の連続性の喪失は顔貌変形などの整容的障害、咀嚼障害、構音障害や嚥下障害に代表される機能的障害につながる。これらに対して自家骨移植による再建手術が行われるが、採取できる骨量、移植後の骨吸収や手術部位感染などの問題を抱えている。さらに、この方法の最大の欠点としてドナーサイトとなる健常部位への侵襲が挙げられる。これまで申請者らは生体内微量元素の1つである亜鉛の骨芽細胞分化および骨形成促進に対する効果に着目し研究を行ってきた。本研究では亜鉛徐放性を備えた亜鉛放出型チタンおよび低侵襲で採取可能な歯髄幹細胞を用いて、再生医療に基づいた臨床応用可能な新たな顎骨再建法を構築する事を目的とした。

2. 研究の目的

組織再生においては細胞、足場(scaffold)、分化増殖因子の3要素が不可欠となる。骨再生では細胞ソースとして骨髄間葉系幹細胞を用いた研究が多く行われているが骨髄穿刺に伴う侵襲は避けられない。また、細胞の増殖能も低く、継代培養によって分化能が明らかに低下する事が報告されている。近年、歯髄中にも多能性幹細胞が存在する事が証明され、骨、軟骨、脂肪および神経組織への分化誘導が可能であることが示された。歯髄幹細胞は永久歯の萌出に伴い脱落した乳歯や智歯周囲炎等の炎症が原因で抜去を要する智歯より採取可能であるため、骨髄間葉系幹細胞など他の成体幹細胞とは異なり、細胞ソース採取のために健常部に新たな侵襲を加える必要がない。さらに歯髄幹細胞は骨髄間葉系幹細胞と比較して高い細胞増殖能を有している事が報告されている。そこで本研究では低侵襲で採取可能であり、かつ骨芽細胞分化能を有する歯髄幹細胞を細胞ソース

として用いる。また申請者らはこれまで生体内微量元素の1つである亜鉛の骨芽細胞分化促進能に着目し in vitro、in vivo における研究を行ってきた。

そこで本研究では、亜鉛修飾処置により分化増殖因子徐放型 scaffold である亜鉛放出型チタンメッシュプレートを作製し、細胞ソースとして歯髄幹細胞を用いる事で、新たな顎骨再建法の構築を目指した。

3. 研究の方法

テトラヒドロキシ亜鉛酸錯体含有水溶液へチタンディスクを浸漬し亜鉛放出型チタンディスクを作製した。上記チタンより放出される亜鉛イオンが骨芽細胞分化へ与える影響を検討するため、亜鉛放出型チタンを超純水中へ浸漬し亜鉛溶出液を作製した。亜鉛溶出液を歯髄幹細胞へ添加し骨芽細胞分化に関して骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現、BMP-TGF β シグナル関連遺伝子の mRNA 発現、アルカリフォスファターゼ染色、基質石灰化などの点から検索した。

また歯髄幹細胞を亜鉛放出型チタンディスク上へ播種した後、培地交換により骨芽細胞誘導を行った。未処理のチタンディスクをコントロールとし、細胞増殖能を検索するとともに、骨芽細胞分化に関してアルカリフォスファターゼ活性、骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現、基質石灰化などの点から評価した。

4. 研究成果

亜鉛溶出液による骨芽細胞分化促進作用

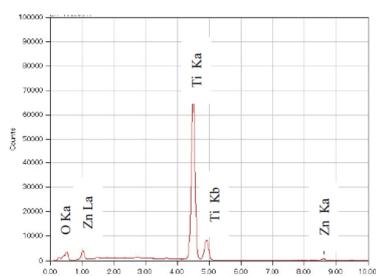
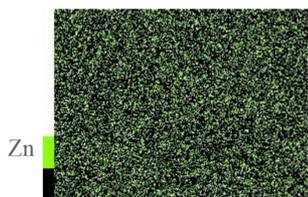
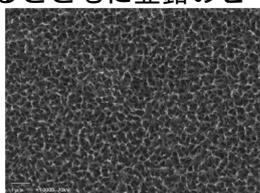
亜鉛溶出液添加によりタイプ1コラーゲン(coll)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、オステオカルシン、Runx2、BMP2 の mRNA 発現が有意に上昇する事が確認された。BMP-TGF β シグナル関連遺伝子の mRNA 発現に関しては BMP2、4 および SMAD 1、4、5、9 の発現上昇がみられた一方で Noggin

の発現は減弱する事が確認された。

また、アルカリフォスファターゼ染色でも染色性は上昇した。基質石灰化に関してはアリザリンレッド染色、von Kossa 染色を行い評価した所、亜鉛溶出液添加により基質石灰化に関しても亢進することが確認された。

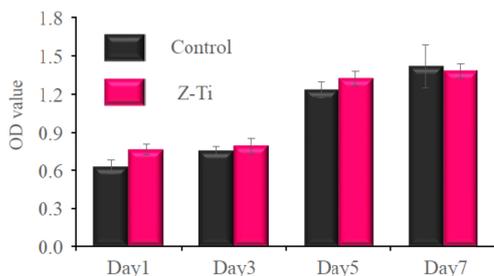
亜鉛放出型チタンディスクの表面性状

テトラヒドロキシ亜鉛酸錯体含有水溶液へチタンディスクを 24 時間浸漬し作製した亜鉛放出型チタンディスクの表面性状に関して SEM を用いて観察した。上記処置によりディスク表面にはナノスケールの小孔構造を認めるとともに亜鉛のピークが確認された。



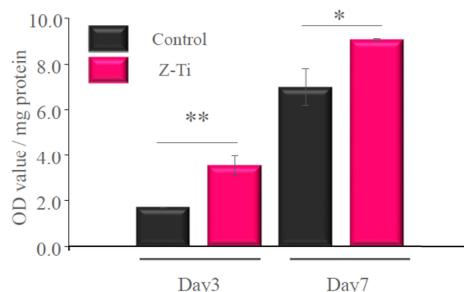
細胞増殖・毒性試験

培養 7 日目までの細胞増殖を MTS アッセイで評価した。7 日目まで培養期間において、亜鉛放出型チタン、コントロール上の培養において有意な細胞増殖の低下および上昇は認めなかった。



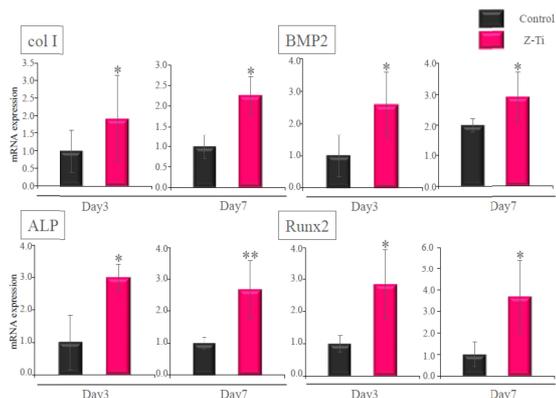
アルカリフォスファターゼ活性

培養 3、7 日目にアルカリフォスファターゼ活性を検索した。亜鉛放出型チタン状での培養において培養 3 日目、7 日目ともに有意なアルカリフォスファターゼ活性の上昇を認めた。



骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現

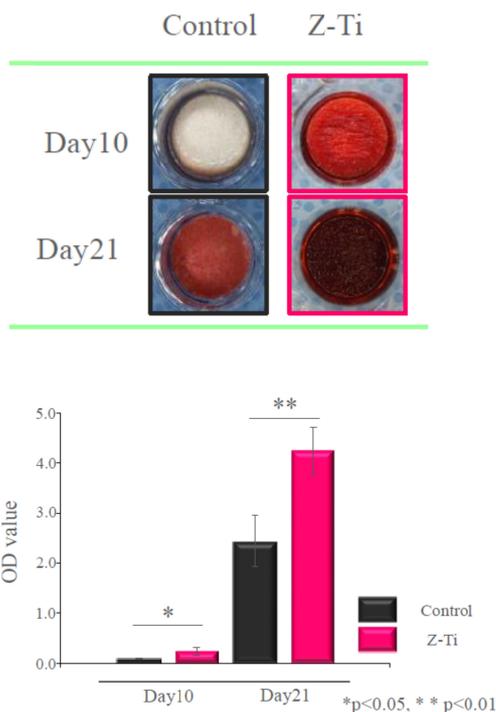
培養 3、7 日目に代表的な骨芽細胞分化マーカーである col1、BMP2、ALP、Runx2、オステオポンチン(OPN)の mRNA 発現をリアルタイム PCR で検索した。いずれのマーカーにおいても有意な mRNA 発現の上昇を認めた。



基質石灰化

培養 10、21 日目にアリザリンレッド染色を行い基質石灰化の評価を行った。亜鉛放出型チタンディスク上での培養において培養 10 日目より赤色の基質石灰化が確認され、21 日目にはさらに染色性が上昇することが確認された。これらのサンプルを溶解し吸光度測定を行った所、培養 10 日目、21 日目い

れにおいても有意な基質石灰化の亢進が確認された。



以上の結果を踏まえ、ラット頭蓋骨欠損モデルへの移植実験を試みたが、手術手技の安定性や移植を行う細胞数などの条件設定に問題があり十分な結果は得られなかった。

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 6 件)

Yusa K, Yamamoto O, Iino M, Takano H, Fukuda M, Qiao Z, Sugiyama T. Eluted zinc ions stimulate osteoblast differentiation and mineralization in human dental pulp stem cells for bone tissue engineering. *Arch Oral Biol.* 71: 162-9, 2016. (査読あり)

Yusa K, Yamamoto O, Takano H, Fukuda M, Iino M. Zinc-modified titanium surface enhances osteoblast differentiation of dental pulp stem

cells in vitro. *Scientific Reports.* 6: 29462, 2016.(査読あり)

Ozaki H, Sakurai H, Yusa K, Kitabatake K, Kobayashi T, Iino M. Mandibular Reconstruction With Fibula Bone Graft Followed by Particulate Cancellous Bone and Marrow Graft With Titanium Mesh Tray. *J Oral Implantol.* 42(4): 381-4, 2016. (査読あり)

Ozaki H, Ishikawa S, Kitabatake K, Yusa K, Sakurai H, Iino M. Functional and aesthetic rehabilitation with maxillary prosthesis supported by two zygomatic implants for maxillary defect resulting from cancer ablative surgery: a case report/technique article. *Odontology.* 104(2): 233-8, 2016. (査読あり)

Takano H, Takahashi T, Nakata A, Nogami S, Yusa K, Kuwajima S, Yamazaki M, Fukuda M. Facilitation of bone resorption activities in synovial lavage fluid patients with mandibular condyle fractures. *J Oral Rehabil.* 43(5): 333-9, 2016.(査読あり)

遊佐和之, 飯野光喜 . 下顎再建およびインプラント補綴に関する臨床的検討. *みちのく歯學會雑誌* 46(1,2) : 20-21 , 2015. (査読あり)

[学会発表](計 7 件)

遊佐和之、尾崎尚、高野裕史、福田雅幸、飯野光喜：亜鉛修飾型チタンの歯髄幹細胞における骨芽細胞分化促進作用の検討 第 20 回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会 東京医科歯科大学 M&D タワー (東京) 2016 年 12 月

遊佐和之、高野裕史、福田雅幸、尾崎尚、北畠健一朗、橘寛彦、石川恵生、飯野光喜：歯髄幹細胞および亜鉛修飾型チタンを用いた骨再生療法に関する基礎的研究 第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会 幕張メッセ (千葉) 2016 年 11 月

遊佐和之、山本修、高野裕史、福田雅幸、飯野光喜：亜鉛徐放型チタンスキャフォ

ルドおよび歯髄幹細胞を用いた骨増生法開発に関する基礎的検討 第 46 回日本口腔インプラント学会学術大会 名古屋国際会議場(愛知)2016年9月

遊佐和之、山ノ内秀之、北畠健一朗、尾崎尚、石川恵生、橘寛彦、櫻井博理、飯野光喜：下顎再建後のインプラント治療に関する検討 第 34 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 横浜市開港記念会館(神奈川)2016年1月

遊佐和之、尾崎尚、山ノ内秀之、橘寛彦、櫻井博理、飯野光喜：下顎切除後の下顎再建およびインプラント治療による咬合再建に関する臨床的検討(第二報) 第 18 回顎顔面インプラント学会総会・学術大会 ホテルメルキュール横須賀(神奈川)2015年11月

遊佐和之、飯野光喜：下顎再建およびインプラント補綴に関する臨床的検討 第 68 回東北地区歯科医学会 岩手県歯科医師会館(岩手)2015年10月

遊佐和之、山ノ内秀之、北畠健一朗、尾崎尚、石川恵生、橘寛彦、櫻井博理、飯野光喜：当科における広範囲顎骨支持型補綴の臨床的検討 第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会 名古屋国際会議場(愛知)2015年10月

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

遊佐 和之 (YUSA KAZUYUKI)

山形大学・医学部・医員

研究者番号：80636960