

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11821

研究課題名(和文) 口唇口蓋裂治療のための多孔体TCPポリマー複合体と破骨細胞抑制因子の骨再生

研究課題名(英文) Bone regeneration by the osteoclast suppression factor and porous TCP polymer complex for the treatment of cleft lip and palate

研究代表者

松本 尚之 (Matsumoto, Naoyuki)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70199884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラットには、下顎正中部に先天的に存在する顎裂が存在し、近年これらの欠損部位を先天性顎裂モデルとして応用することが試みられている。本研究では、将来的に破骨細胞抑制効果を持ちつつ骨再生を促す足場材料の開発を目的とし、複数の材料のラット顎裂領域とラット臨界骨欠損内での骨形成挙動を評価することを目的とした。その結果、破骨細胞抑制効果を持つEGCGを結合したゼラチンが顎裂内で優れた骨再生能を持つことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラット臨界骨欠損モデルと、ラット顎裂モデルを用いて、破骨細胞抑制効果を持つEGCGを結合させたゼラチンの骨形成能を評価した。その結果、ラット頭蓋冠臨界骨欠損内と同様に、顎裂内においてもEGCG結合ゼラチンが優れた骨形成を示す事を明らかにした。更に埋入8週においても、同材料によって形成された新生骨の吸収は認められなかった。破骨細胞抑制因子を含む骨補填材は、新生骨の長期安定をもたらす材料となる可能性が考えられた。同知見は、今後唇顎口蓋裂の治療に用いられる骨補填材の開発に一定の示唆を与えると推察される。

研究成果の概要(英文)：There is a cleft at the center of rat mandibular. More recently, the cleft is used as the rat congenital cleft jaw model. The present study was designed to fabricate materials containing the functions for suppressing osteoclast activity and enhancing bone regeneration and to evaluate its bone forming ability in the cleft of jaw and the bone defect at rat calvaria. As a result, we elucidated that vacuum heated epigallocatechin gallate modified gelatin sponges could induce great bone formation in cleft-jaw.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：唇顎口蓋裂 骨再生 破骨細胞抑制

1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂は、唇や顎骨に形成が不十分な亀裂が生じる先天異常である。日本における発生頻度は約 500 人に 1 人と最も高い先天奇形であり、その半数は顎裂を伴っている。顎裂とは歯牙の生える場所である歯槽部の骨欠損であり、歯槽骨の再建手術（顎裂治療）を必要とする。これらの顎裂部には、新鮮自家腸骨などが広く移植されている。しかし、しばしば自家骨が早期に吸収してしまい、長期的に骨再生がみられない症例も観察され、その一因として、大量の破骨細胞による自家骨の吸収が考えられている。また、他の骨補填材を埋入する研究も進められているが、長期的な維持やその機序については、未だ解明の余地を残している。

その様な中申請者らは、ラット頭蓋骨に自発的な閉鎖がなされない臨界欠損を作り、自家骨や多種類の人工材料を移植後、エックス線と特殊染色方法を利用して骨形成能や、炎症、免疫応答などを評価してきた。その結果、埋入後の自家骨や人工材料が術後吸収される現象を引き起こす場合、自家骨や人工骨の周囲に大量の (Tumor necrosis factor : TNF- α) が分泌されること、またそれに伴い破骨細胞が活性化することを明らかにした。更に、投与したインターフェロンガンマ (IFN- γ) が、産生された TNF- α の分泌や破骨細胞活性を抑制することで、術後の骨吸収・人工骨吸収を抑制し、長期的な骨置換を促す事を明らかにした。以上の知見は、骨置換や人工骨によって形成された新生骨の長期的な維持には、免疫調節機能が極めて重要な意味を持つことを示唆する。

また、申請者らは、自家骨の代替となる新規人工骨の開発にも複数取り組んできた。例えば、高い生体親和性と優れた骨伝導能を有する α 型リン酸三カルシウム (α -TCP) に改めて着目し、 α -TCP 多孔粒子の一種を新規に開発した。更に、同多孔質顆粒と人工コラーゲンやアテロコラーゲンゲルで複合体スポンジを作製し、ラットやミニブタ頭蓋骨骨欠損モデルに移植した実験を行なった。加えて、破骨細胞抑制効果、抗炎症、免疫調節機能など多機能を具備する緑茶カテキンの一種であるエピガロカテキンガレート (EGCG) を化学的に結合させたゼラチンスポンジのプロトタイプ (EGCG 結合ゼラチン) の開発にも取り組んできた。その結果、EGCG 結合ゼラチンは EGCG を結合させないゼラチンに比べ優れた骨再生能を持つ事をマウス頭蓋冠骨欠損モデルを用いて明らかにした。

2. 研究の目的

上記の複数の実験で用いたように、頭蓋冠臨界骨欠損モデルは、骨再生実験において頻用される実験モデルであるが、唇顎口蓋裂のように自然発生的な裂空隙内での骨形成を再現することはできない。頭蓋冠臨界骨欠損内と顎裂部での骨再生メカニズムは異なることが予想される。従って、実際に唇顎口蓋裂に近いモデルを用いて自家骨や骨補填材の骨再生評価を行うことは有用であり、既にビーグル犬を用いた人工顎裂モデルなどが確立されている。しかし、費用や倫理面から、様々な条件で作製した新規の骨補填材を多数スクリーニングすることは困難である。一方、ラットには、下顎正中部に先天的に存在する自然には閉鎖しない顎裂欠損領域が存在し、近年これらの欠損部位を先天性顎裂モデルとして応用することが試みられている。以上の背景から本研究では、将来的に破骨細胞抑制効果を持ちつつ骨再生を促す足場材料の開発を視野に、複数の材料のラット顎裂領域とラット臨界骨欠損内での骨形成挙動を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

具体的には、下記を計画した。

- (1) ラット先天性顎裂モデルおよびラット頭蓋冠骨欠損モデルの準備
- (2) 破骨細胞抑制因子を含む骨補填材の作製
- (3) ラット頭蓋冠臨界骨欠損モデル内での骨形成および骨質評価
- (4) ラット先天性顎裂モデル内での骨形成および骨質評価

3-(1) ラット頭蓋冠臨界骨欠損モデルおよびラット先天性顎裂モデルの準備

ラット頭蓋冠骨欠損モデル：同モデルとしては、これまで直径 5、8、9 mm などが広く用いられている。5 mm の骨欠損は、長期間では自発的な閉鎖が認められるものの、一匹に 2 つの骨欠損を作製することができ、ラット数を減じられるところに利点を有する。一方、9 mm はより長期でも自発的な閉鎖が起きないことから、本研究では、9 mm の骨欠損を採用した。ラットへの麻酔導入後、骨膜を剥離し、トレフィンバーを用いて頭蓋冠に 9 mm の骨欠損を作製した。

ラット先天性顎裂モデル：ラットへ麻酔導入後に、下顎の皮膚に切開を施し、正中部に存在する結合組織を除去し、骨補填材を埋入可能な欠損（幅 2 mm、高さ 4 mm、深さ 1 mm）を作製した。以上の 2 つの欠損部位に下記の材料を埋入して評価を行った。

3-(2) 破骨細胞抑制因子を含む骨補填材の作製

埋入する骨補填材としては次の 2 種類の作製を試みた。

真空熱処理 EGCG 結合ゼラチン：申請者らは過去に、緑茶由来の EGCG とゼラチンの単純混合を経て作製した複合体では EGCG の機能が発揮されにくいことを明らかにしている。また、先に述べたように EGCG 結合ゼラチンがゼラチン単体より骨形成能に優れている事を明らかにしている。しかし、EGCG 結合ゼラチンは脆弱であると共に、骨再生能には改善の余地を残していた。一方、過去の報告において、真空熱処理はコラーゲンやゼラチン等に物理的な架橋を施し、脆弱性を改善しうることが知られている。本計画では、EGCG 結合ゼラチンスポンジに更に真空熱処理を加えた真空熱処理 EGCG 結合ゼラチンの作製を試みた。真空熱処理 EGCG 結合ゼラチンは、水中合成を用いて EGCG とゼラチンを化学的に結合後、凍結乾燥し、真空熱処理を行うことで作製した。

リン酸カルシウムを混合した真空熱処理 EGCG 結合ゼラチン：真空熱処理 EGCG 結合ゼラチンの強度改善を目指し、リン酸カルシウム顆粒を含有させた、真空熱処理 EGCG 結合ゼラチンの作製も試みた。

上記の方法で得られた骨補填材の材料学的性質評価には下記の方法を用いた。多孔体構造や表面性状の評価には走査型電子顕微鏡 (SEM) を用い、化学的な構造評価にはフーリエ変換赤外分光分析 (FTIR) を、各顆粒の結晶構造の評価には X 線回折 (XRD) 評価を用いた。EGCG の含有の有無には Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) を用いることとした。

3-(3) ラット頭蓋冠臨界骨欠損モデル内での骨形成および骨質評価

ラット先天性顎裂モデル内での骨形成や骨質評価に先んじて、ラット頭蓋骨臨界骨欠損モデルを用いて、真空熱処理 EGCG 結合ゼラチン埋入時の骨形成と新生骨の骨質を評価した。骨形成については、 μ CT (SMX-130CT：島津社製) と TRI/3D-BON (ラトックシステム社製) を用いて骨形成量、骨密度、骨塩量を評価し、更にヘマトキシリン-エオジン染色やピラヌエバ・ゴールド染色等を用いて組織学的評価を行った。次いで、EGCG 含有による新生骨の骨質への影響を合わせて評価した。骨質評価には、コラーゲンの成熟度を評価可能なピクロシリウスレッド染色と偏光顕微鏡の組み合わせによる観察を用い、FTIR マッピングを用いて、石灰化/マトリックス比の分布を評価した。

3-(4) ラット先天性顎裂モデル内での骨形成および骨質評価

顎裂内での骨形成に関しては、頭蓋冠骨欠損同様に μ CT (SMX-130CT：島津社製) を用いて骨形成量、骨密度、骨塩量を評価し、更にヘマトキシリン-エオジン染色を用いて、組織学的に評価した。

4. 研究成果

4-(1) ラット頭蓋冠臨界骨欠損モデルおよびラット先天性顎裂モデルの準備

両方の骨補填材の埋入に先んじて、非埋入群における骨形成を評価した。手術 4 週間後では一部骨形成が認められるものの、骨欠損が完全に閉鎖したラットは認められなかった。顎裂モデルにおいては、いずれのラットも新生骨の形成は乏しく、顎裂の閉鎖も確認されなかった。

4-(2) 破骨細胞抑制因子を含む骨補填材の作製

真空熱処理 EGCG 結合ゼラチンは 50-150 μ m の多孔構造を持ち、合成後も EGCG が含有されていることを確認した。リン酸カルシウム含有の EGCG 結合ゼラチンについて現在評価中である。

4-(3) ラット頭蓋冠臨界骨欠損モデル内での骨形成および骨質評価

埋入 4 週間後、9 mm の骨欠損は、埋入された真空熱処理 EGCG 結合ゼラチンによって促された新生骨によってほぼ閉鎖された。一方、同一の EGCG 量を用いてもゼラチン量が少ない場合、骨形成が乏しい事を確認した。また、新生骨内におけるコラーゲンの性質は、EGCG 量に対するゼラチン量の増加に応じて未熟なコラーゲンへと変化することがわかった。

4-(4) ラット先天性顎裂モデル内での骨形成および骨質評価

顎裂部に埋入した真空熱処理 EGCG 結合ゼラチンは、真空熱処理ゼラチンに比べ優れた骨形成を示した。埋入 8 週間後には、顎裂部をほぼ新生骨で埋めた。一方、骨密度に関しては顕著な変化は認められなかった。また、埋入 8 週間後において顕著な新生骨の吸収は認められなかった。

本申請時には、リン酸カルシウム含有材料を用いた研究を計画していた。しかし、ラット先天性顎裂モデル自体が開発されて間もない実験モデルであり、顎裂内での骨形成挙動の知識も乏しかったことから、EGCG およびリン酸カルシウムの同時併用の複雑な機序を持つ材料ではなく、非リン酸カルシウム含有の材料を用いた研究を優先させた。従って、本研究期間内で顎裂モデル内での破骨細胞抑制因子とリン酸カルシウムが併存した材料の骨置換挙動の解析には至っていない。しかし、真空熱処理 EGCG 結合ゼラチン単独で形成された新生骨が埋入 8 週においても吸収されなかったことを考慮すると、破骨細胞抑制因子 (EGCG) の含有は、顎裂内においての新生骨の安定的な維持に有用な手段となる可能性がある。これらの知見を踏まえ、引き続きリン酸カルシウムを含んだ材料での解析を今後進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Honda Yoshitomo, Takeda Yoshihiro, Li Peiqi, Huang Anqi, Sasayama Satoshi, Hara Eiki, Uemura Naoya, Ueda Mamoru, Hashimoto Masanori, Arita Kenji, Matsumoto Naoyuki, Hashimoto Yoshiya, Baba Shunsuke, Tanaka Tomonari	4. 巻 23
2. 論文標題 Epigallocatechin Gallate-Modified Gelatin Sponges Treated by Vacuum Heating as a Novel Scaffold for Bone Tissue Engineering	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules23040876	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hara Eiki, Honda Yoshitomo, Suzuki Osamu, Tanaka Tomonari, Matsumoto Naoyuki	4. 巻 19
2. 論文標題 Epigallocatechin Gallate-Modified Gelatins with Different Compositions Alter the Quality of Regenerated Bones	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.3390/ijms19103232	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sasayama Satoshi, Hara Tomoya, Tanaka Tomonari, Honda Yoshitomo, Baba Shunsuke	4. 巻 19
2. 論文標題 Osteogenesis of Multipotent Progenitor Cells using the Epigallocatechin Gallate-Modified Gelatin Sponge Scaffold in the Rat Congenital Cleft-Jaw Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.3390/ijms19123803	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Li P, Honda Y, Arima Y, Yasui K, Inami K, Nishiuura A, Hashimoto Y, Matsumoto N	4. 巻 60
2. 論文標題 Interferon- enhances the efficacy of autogenous bone grafts by inhibiting postoperative bone resorption in rat calvarial defects	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 167-176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpor.2016.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhao J, Honda Y, Tanaka T, Hashimoto Y, Matsumoto N	4. 巻 13
2. 論文標題 Releasing Behavior of Lipopolysaccharide from Gelatin Modulates Inflammation, Cellular Senescence, and Bone Formation in Critical-Sized Bone Defects in Rat Calvaria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma13010095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Huang A, Honda Y, Li P, Tanaka T, Baba S	4. 巻 20
2. 論文標題 Integration of Epigallocatechin Gallate in Gelatin Sponges Attenuates Matrix Metalloproteinase-Dependent Degradation and Increases Bone Formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20236042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Honda Y, Takeda Y, Li PQ, Huang A, Sasayama S, Hara E, Uemura N, Ueda M, Matsumoto N, Hashimoto Y, Baba S, Tanaka T, Umeda M
2. 発表標題 Vacuum-heated epigallocatechin gallate-modified gelatine sponges as a novel material for bone tissue engineering
3. 学会等名 KaSAM 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原瑛紀, 本田義知, 田中知成, 橋本正則, 有田憲司, 松本尚之
2. 発表標題 ゼラチン用量の変化がエピガロカテキンガレート結合ゼラチンの骨再生能に及ぼす影響
3. 学会等名 第39回 日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笹山智史, 原朋也, 山田陽一, 田中知成, 本田義知, 馬場俊輔
2. 発表標題 ラット先天性顎裂モデルにおける多能性前駆細胞を用いたエピガロカテキンガレート結合ゼラチンの骨形成
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本田義知, 上田衛, 橋本典也, 今井弘一, 馬場俊輔, 橋本正則, 有田憲司
2. 発表標題 真空熱処理によるエピガロカテキンガレート結合ゼラチンの骨形成能向上
3. 学会等名 第71回日本歯科理工学会春期学術講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	橋本 典也 (Hashimoto Yoshiya) (20228430)	大阪歯科大学・歯学部・教授 (34408)	
研究分担者	本田 義知 (Honda Yoshitomo) (90547259)	大阪歯科大学・歯学部・准教授 (34408)	
研究分担者	李 佩祺 (Li Peiqi) (70782100)	大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤) (34408)	