

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2021

課題番号：16K20604

研究課題名（和文）細胞シート工学を応用した乳歯歯髄幹細胞による唇顎口蓋裂患者の新規顎裂治療法の開発

研究課題名（英文）Bone regeneration in cleft palate patients using dental pulp stem cells from deciduous teeth applying cell sheet technology

研究代表者

柳生 貴裕 (Yagyu, Takahiro)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00555550

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では自家骨移植を回避しうる新たな顎裂治療法（骨再生治療法）の開発を目標とした。研究の結果、ドラッグデリバリーシステム技術によりハイドロゲルと成長因子を複合化させることに成功し、生体内で新生骨形成を認めることを確認することができた。同時に臨床応用するには力学的強度の向上が課題となることを見出した。今後は課題の解決に向け、開発した技術と人工骨とを組み合わせる方法を検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唇顎口蓋裂患者の顎裂に対しては、一般的には学童期に健常部より骨を採取し、顎裂部に移植するという自家骨移植治療が行われる。しかし、学童期の患児にとって自家骨移植は侵襲が大きく、代替治療の開発が待たれている。本研究ではドラッグデリバリーシステムを応用することで、生体内で新生骨形成を強力に促す新たな骨再生治療法を見出すことができた。本治療法を発展させることで、自家骨移植を必要としない新たな顎裂治療法の開発が可能となる。

研究成果の概要（英文）：The goal of our study is to develop a novel bone regeneration therapy that can avoid autologous bone grafting. We succeeded in combining hydrogel and growth factors using drug delivery system technology, and confirmed that it induced bone formation in vivo. We also found that improving the mechanical strength is a challenge for clinical application. In the future, we are considering a method of combining the developed technology with artificial bones to solve the problem.

研究分野：再生医療

キーワード：骨再生

### 1. 研究開始当初の背景

日本における唇顎口蓋裂の発生頻度は約 500 人に 1 人で、最も発生頻度の高い先天奇形である。唇顎口蓋裂患者で顎裂を伴う場合(図1)は、顎裂を放置しておくと歯が移動することができないため歯並びが悪くなる。そのため、歯列形態の回復、歯の萌出誘導などを目的に一般的に

図1 顎裂を伴う唇顎口蓋裂患者



図1 顎裂を伴う唇顎口蓋裂患者

写真(左)は9歳時の口腔内写真である。右上23部は陥凹し同部には歯牙の萌出を認めない。写真(右)は9歳時の単純CT画像である。右上23部に顎裂部を認め、右上2は先天欠損している。右上3は右上CDの根尖側に位置している。

は9歳ごろに顎裂部骨移植術が行われる。しかし、裂隙が大きい症例は複数回の自家骨移植が必要となり、治療に難渋することが多い。更に健常部から自家骨の採取を行わざるを得ず、子供にとっては非常に侵襲

が大きく自家骨移植に代わる治療法の開発が待たれている。

### 2. 研究の目的

本研究では、自家骨移植を回避しうる新たな顎裂治療法(骨再生治療法)の開発に向けた基盤的技術開発を目標とした。そのために前臨床研究として、ラット顎骨欠損モデルを用い再生医療技術を応用した骨形成法の検討を行った。

### 3. 研究の方法

まずは標準的な顎裂治療時期に無侵襲で入手可能なヒト乳歯歯髓由来間葉系幹細胞に注目し、細胞シート工学を応用した骨形成法を検討した。in vitro では作製した細胞シートは良好な骨形成を示したが、in vivo 実験では様々な培養条件下で作製を試みたが骨形成能は限定的であり芳しい結果は得られなかった。そこで、ドラッグデリバリーシステム(DDS)技術を応用し、生体吸収材料に成長因子を複合化させ、骨欠損部に局所投与することで自家骨移植を回避しうる骨再生治療法の開発に発展的に移行した。

### 4. 研究成果

In vitro 研究にて、ハイドロジェルと成長因子を複合化させることに成功し、生体内でも一定期間、一定濃度で成長因子を徐放することが可能となった。次に、確立した DDS 技術を用いて

図2 マイクロCT撮影による新生骨形成の評価

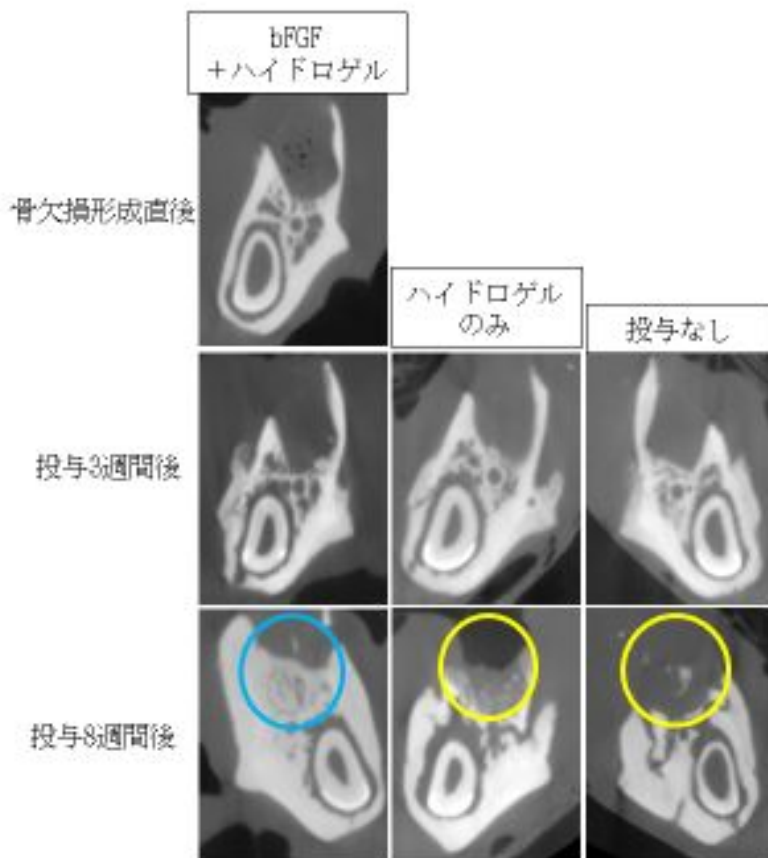


図2 マイクロCT撮影による新生骨形成の評価

bFGF とハイドロゲルを複合化させ、骨欠損部に局所投与すると投与3週間後では骨形成はみられないものの、投与8週間後には骨欠損部は旺盛な新生骨形成がみられた(青色丸)。一方骨欠損部にハイドロゲルのみ、もしくは何も投与しなかった場合は投与3、8週間後においても骨形成はみられなかった(黄色丸)が、投与8週間後では骨欠損周囲の骨組織から分離した小骨片がみられ、腐骨化の進行が伺われた。

投与後早期(3週間後)から有意に口腔粘膜細胞の増殖を認め、経時的に骨形成が促され、投与8週間後には旺盛な骨新生がみられた。一方コントロール群では口腔粘膜細胞の増殖は乏しく、骨新生はまったくみられなかった。実験群では統計学的に有意に早期から粘膜細胞の増殖と新生骨形成を認めた。以上より本技術は骨欠損部の粘膜治癒を促すだけでなく、骨再生を促し新生骨を形成させる新たな骨再生治療法となりうる可能性が示唆された。

本技術による骨再生治療法は成長因子を用いているため、自家骨採取のような健常部への侵襲は必要としない。また、ハイドロゲルを基材としているため優れた賦形性を有しており、複雑な骨欠損形態を示す顎裂治療には最適だと考える。しかし、本材料は力学的強度が非常に低いため、現状のままでは自家骨移植を代替することは困難である。つまり、臨床応用するためには力

成長因子である bFGF をハイドロゲルと複合化させ、ラット下顎骨欠損モデルに局所投与し、in vivo での組織再生、新生骨形成について経時的な検討を行った。CT(図2)、組織学的検査(図2)にて、実験群では投与後早期から被覆粘膜の創傷治癒が促され、血管新生と共に骨欠損部に骨再生が促され、新生骨形成がみられることを確認できた。更に統計的処理を行うため、検討数を増やし、コントロール群(ハイドロゲルのみ局所投与)との比較解析による統計学的検討を試みた。用いた顎骨欠損モデルは、骨欠損が自然に再生することがない critical bone defect model である。結果は、実験群では

図3 組織学的評価（投与3週間後）

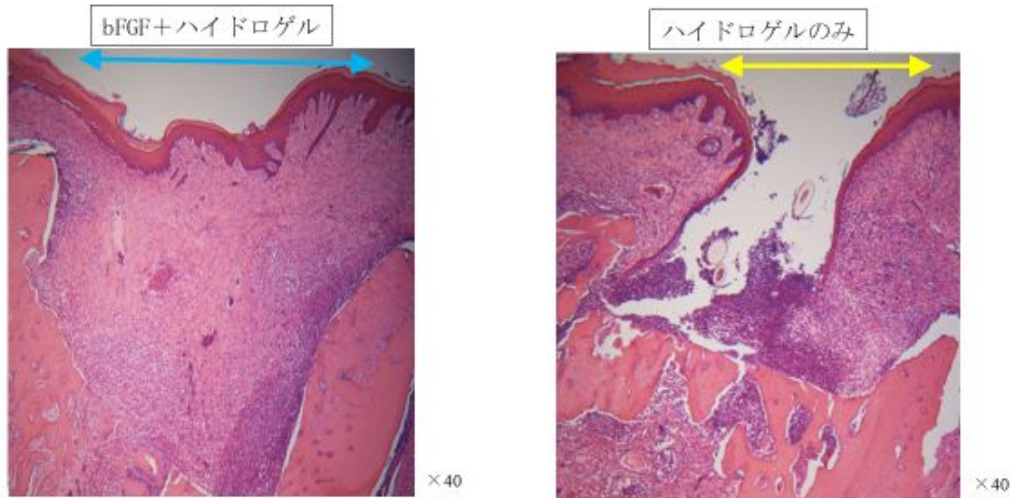


図3 組織学的評価（投与3週間後）

bFGF とハイドロゲルを複合化させ、骨欠損部に局所投与すると投与3週間後には骨欠損部は口腔粘膜により完全に被覆され（青色線）粘膜下には血管新生と共に線維芽細胞の増生がみられた。窩底部の骨組織との境界部では幼弱な骨基質形成を伺う所見がみられたが、明らかな骨形成は確認できなかった。一方、ハイドロゲルのみでの局所投与では、投与3週間後においても骨欠損部は潰瘍状を呈したままであり（黄色線）好中球を主体とした高度の炎症細胞浸潤を伴っていた。骨形成はみられず、周囲の骨組織においては骨細胞が消失しており腐骨化への徴候と考えられた。

学的強度の増強が必要である。本課題を克服するためには、本技術を人工骨と組み合わせる手法の開発が必要と考える。今後はどのような人工骨をどのタイミングでどのように本技術を組み合わせて用いるのかを検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今田光彦、柳生貴裕、上山善弘、桐田忠昭
2. 発表標題 骨形成細胞シート移植における顎顔面領域の骨形成能の検討
3. 学会等名 第70回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 今田光彦、柳生貴裕、上山善弘、桐田忠昭
2. 発表標題 下顎骨骨癒合不全モデルを用いた骨形成細胞シートの骨形成能評価
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 黒川聡司、柳生貴裕、舟山直希、今田光彦、上山善弘、今井裕一郎、桐田忠昭
2. 発表標題 塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた抜歯を契機に発症するビスフォスフォネート関連顎骨壊死の予防法の検討
3. 学会等名 第33回日本口腔科学近畿地方部会
4. 発表年 2021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
研究協力者	桐田 忠昭  (Kirita Tadaaki)	奈良県立医科大学・口腔外科学講座・教授  (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------