

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11913

研究課題名(和文) 下顎再建用スキャホールドの骨芽細胞誘導能を最適化する紫外線光触媒効果の基礎的研究

研究課題名(英文) Effect of UV-mediated photofunctionalization to enhance osteoblast behavior in mandibular reconstruction scaffold.

研究代表者

廣田 誠 (HIROTA, MAKOTO)

横浜市立大学・附属市民総合医療センター・准教授

研究者番号：20347305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：チタンファイバー製スキャホールドは骨結合能を有する再建材料である。本研究では紫外線処理が同スキャホールド内の骨芽細胞挙動と骨伝導能にどのような効果を与えるかを検討した。チタンファイバー上の骨芽細胞接着数は紫外線処理により有意に増大し、骨芽細胞は密に増殖した。骨芽細胞のALP活性は未処理と比較して紫外線処理スキャホールドにおいて有意に活性化され、遺伝子解析では有意に高いオステオカルシンの発現が認められた。またラット大腿骨に埋入した紫外線処理スキャホールドは有意に高い骨結合性を認めた。これらの結果より、紫外線処理チタンファイバー製スキャホールドは骨再建に有効な材料になり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌、顎骨骨髄炎による広い範囲の顎骨切除は患者のQOLが著しく損なわれる。QOL回復のために広い範囲に切除した顎骨を再建する場合、現在の標準治療では血管柄付き骨移植による再建治療となるが、侵襲が非常に大きく、また頸部血管の状態に依存するため実施できない場合もある。血管の状態に依存せず、また侵襲を軽減するためには自家骨ではなく人工材料を使用することが望まれる。本研究では検証したチタンファイバー製材料は顎骨と強固に結合し、且つ機能再建も可能にできる材料であり、本研究の成果は顎骨切除後再建を低侵襲で実施し得ることを見出した点で意義あるものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to analyze effects of UV treatment on osteoblast behavior on Titanium (Ti) fibers and osseointegration of the scaffold. The number of osteoblasts attached on the UV-treated scaffold was significantly greater than that on the untreated scaffold. Osteoblasts in the UV-treated scaffold densely growth on fibers and their ALP activity in the UV-treated scaffold was significantly greater than that in the untreated scaffold. Gene expression analysis revealed that significantly higher expression of osteocalcin in the UV-treated scaffold. The UV treated Ti scaffold placed on the rat femur bone was osseointegrated with the bone in 2 weeks after the placement and the mechanical strength of their connection was significantly greater than that of the untreated scaffold. These effects suggest that UV treatment enables Ti microfiber scaffolds to effectively enhances osteoblast behavior, proposing a new strategy to optimize Ti-based porous devices for bone reconstruction.

研究分野：顎骨再建

キーワード：チタンファイバースキャホールド 紫外線

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌や顎骨骨髓炎に対して実施される顎骨切除では術後に患者の QOL が著しく損なわれる。QOL 改善のため骨移植による欠損部の再建や再建部への歯科インプラント治療が実施されるが、予知性の高い再建のためには自家骨採取が必要となる。骨移植では再建後に歯科インプラントによる機能再建までも可能となる利点があるが、欠損が広範囲の場合、特に下顎骨の連続性が失われるような広い範囲の欠損では侵襲が極めて大きい血管柄付き自家骨移植が必要となる。下顎骨区域欠損に対する自家骨移植は確立された治療方法であり自家骨材料には腸骨、腓骨、肩甲骨があるが侵襲が大きく、歯科インプラントによる機能再建まで含めると治療期間が長期となる。CAD/CAM 技術の発展により手術の正確度・簡素化が進み、カスタムメイドのチタンメッシュと海綿骨髄による区域欠損の再建が可能にはなったが、自家骨移植に代る材料は未だ開発途上であり、高侵襲・長期間の治療を不要とする新しい再建材料が必要である。

直径 20-50 μm のチタンファイバーからなる焼結体は、十分な機械的強度を有しつつ任意の形態へ加工できる多孔質材料である。本材料をハイドロキシアパタイト薄膜にてコーティングすることで多孔質構造内への骨組織形成誘導が促進されるため、チタンファイバースキャホールドは、残存骨と結合し、かつ広範に失われた顎骨形態の再建が可能となる新しい顎骨再建材料になり得ると考えられる。代表者はウサギ下顎骨を用いて本材料を用いて下顎骨区域切除にて連続性を喪失させたウサギ下顎骨を本材料にて再建したところ、接合部においては残存骨からスキャホールド内部への骨形成によって骨と材料が結合し、かつ下顎骨の連続性が確実に回復させることに成功した一方でスキャホールド内部への骨形成は約 60% と改善の余地があるものであった。

チタンに紫外線照射を行うことでチタン表面での骨芽細胞の接着性、増殖・分化が促進され、骨結合が向上することが知られている。チタンへの紫外線照射では表面の親水性が著しく向上することも知られており、スキャホールド材料においては親水性が向上することによって骨芽細胞がより深部にまで到達することが期待でき、チタンファイバースキャホールドにも応用できるのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

直径 20 μm のチタンファイバーからなるスキャホールド材料に紫外線照射を行うことで、スキャホールドの親水性や、ファイバー上での骨芽細胞の接着性、骨形成挙動が活性化するかどうか、動物の骨内に埋入することで骨とスキャホールドとの結合を強固にすることができるかどうかを検討することを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) チタンファイバースキャホールドの製作と紫外線照射

直径 20 μm のチタンファイバーを用い、空隙率 87%となるスキャホールドを作成して以下の実験を実施した。スキャホールドは4週間暗所で保存後に使用し、紫外線照射はUVC光をもちいて20分間照射(セラビームアフィニー、ウシオ電気)、未処理群と紫外線照射群とで比較検討した。紫外線照射は細胞の播種あるいは動物への埋入直前に実施した。

(2) X線光電子分光法(XPS)による表面解析

チタンファイバーで作成した5x3x1.5mm大のスキャホールドを準備し、4週間暗所で保存後、XPS解析を行なった。

(3) 親水性・血液親和性

5x3x1.5mm大のスキャホールドを用い、3 μm の水滴を滴下し、親水性の評価を行なった。評価は材料表面と水滴が形成するコンタクトアングルを測定することで行なった。またシャーレにラットから採取した血液を溜め、液面にスキャホールドを静置し、スキャホールド内に浸透した血液量を重量測定にて測定した。

(4) 骨芽細胞の接着性・増殖能

直径 2.0 mm、厚み 1.5 mm のチタンファイバースキャホールドを用いて、骨芽細胞の接着性を検討した。骨芽細胞は 8 週齢のラット大腿骨から採取した骨髄を骨分化培地で継代したものを使用した。12 ウェルディッシュに未処理および紫外線照射したスキャホールドを置き、上記骨芽細胞を 30000 個播種した。3 時間後、24 時間後および 2 日後にスキャホールドから骨芽細胞を剥離させてカウントし、スキャホールドに接着した骨芽細胞数を測定した。

(5) ALP 活性

骨芽細胞接着の測定と同様のスキャホールドと骨芽細胞を用い、播種 4 日目にスキャホールド内の骨芽細胞を採取し、ELISA 法を用いて ALP 活性を測定した。

(6) 遺伝子解析

骨芽細胞接着の測定と同様のスキャホールドと骨芽細胞を用い、播種 7 日目にスキャホールド内の骨芽細胞を採取し、定量的 RT-PCR によってオステオポンチン、オステオカルシン、Runx 2 の mRNA 発現量を測定した。

(7) 骨結合強度の測定

5x3x1.5 mm 大のスキャホールドを 12 週齢のラット大腿骨上に置き、チタンスクリーで固定した。2 週間後にラットを屠殺し、大腿骨およびスキャホールドを取り出し、骨とスキャホールドとの境界に荷重をかけ、骨との結合強度を測定した。また破断した断面を電子顕微鏡にて観察した。

(8) 統計解析

親水性、血液親和性、骨芽細胞挙動は n=3 で検定、動物実験は n=4 で検定し、one-way ANOVA を用いて解析、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) X 線光電子分光法 (XPS) による表面解析

未処理のスキャホールドでは表面に炭素が沈着しており、酸素、チタン、炭素の割合は約 40%、約 20%、約 30%であったが、紫外線照射をすることでこの割合が約 50%、30%、10%に変化した。すなわち紫外線照射によってスキャホールド表面に沈着していた炭素が除去され、本来の 2 酸化チタンを構成する酸素、チタンの割合が上昇した。

(2) 親水性・血液親和性

水滴は未処理スキャホールドでは形成されたが紫外線処理スキャホールドでは完全にスキャホールド内に吸収された。コンタクトアングルは未処理では約 120 度であるのに対し、水滴を形成しないスキャホールドでは 0 度であり有意差を認めた。

血液親和性では、未処理では 0.1 mg のみの血液を吸収したのに対し、紫外線照射スキャホールドでは 0.4 mg の血液を吸収した。

(3) 骨芽細胞の接着性・増殖能

3 時間、24 時間、2 日後いずれにおいても紫外線照射スキャホールド内の骨芽細胞は未処理と比較して有意に高く、紫外線処理にて骨芽細胞の接着性、増殖能が亢進された。

(4) ALP 活性

紫外線処理スキャホールドから採取した骨芽細胞において有意に高い ALP 活性が認められた。

(5) 遺伝子解析

RT-PCR による遺伝子発現量は、骨芽細胞の最終分化マーカーであるオステオカルシンの発現が、紫外線処理スキャホールドにおいて有意に高かった。

(6) 骨結合強度の測定

未処理のスキヤホールドでは骨とスキヤホールドの破断点は約4Nであったのに対し、紫外線処理スキヤホールドでは約8Nであり、有意に高い骨結合であることが認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Chika Iwasaki , Makoto Hirota , Miyuki Tanaka , Hiroaki Kitajima , Masako Tabuchi , Manabu Ishijima , Wonhee Park , Yoshihiko Sugita , Ken Miyazawa , Shigemi Goto , Takayuki Ikeda , Takahiro Ogawa	4. 巻 21
2. 論文標題 Tuning of Titanium Microfiber Scaffold With UV-Photofunctionalization for Enhanced Osteoblast Affinity and Function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21030738	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 該当する

1. 著者名 Kitajima Hiroaki, Hirota Makoto, Komatsu Keiji, Isono Hitoshi, Matsuura Takanori, Mitsudo Kenji, Ogawa Takahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Ultraviolet Light Treatment of Titanium Microfiber Scaffolds Enhances Osteoblast Recruitment and Osteoconductivity in a Vertical Bone Augmentation Model: 3D UV Photofunctionalization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12010019	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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	岡本 喜之 (YOSHIYUKI OKAMOTO) (80536227)	横浜市立大学・医学研究科・客員研究員 (22701)	

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
---------	---------