

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11978

研究課題名(和文) 高周波電流で細胞の増殖と分化を促進する革新的骨再生療法の開発

研究課題名(英文) Innovative bone regeneration therapy to promote cell proliferation and differentiation by high-frequency current

研究代表者

菅谷 勉 (Sugaya, Tsutomu)

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：10211301

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)：これまでに、骨欠損部への高周波電流刺激により多量の骨形成が促進されることを報告している。本研究は、高周波電流のDuty比と刺激時期の影響、骨芽細胞への分化を促進できる細胞を解明する目的で行った。その結果、Duty比10、30、70%の間に有意差はなく、10%でも十分な骨形成促進効果が認められた。通電時期は術後0～11日に通電すると有意に高い骨形成が得られ、とくに0～4日で通電効果が高かった。また、骨膜や骨基質周囲の細胞を活性化する効果はあまりみられず、骨髄由来細胞や血管周皮細胞を骨芽細胞に分化させる効果があり、とくに血管周皮細胞には高い有効性が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨再生治療は多くの骨疾患で求められているが、本研究により高周波電流により骨形成促進効果が認められ、適切なDuty比や刺激時期、ターゲットとする細胞が明らかとなったことにより、安全で効率的な骨再生治療が臨床応用に向けて大きく前進したと言える。また、間葉系幹細胞の分化や骨芽細胞の活性化だけでなく、血管周皮細胞を骨芽細胞に分化させる可能性が示されたことは、新たな骨形成メカニズムの存在を示唆するものであり、学術的にも大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that bone formation is promoted by high frequency current stimulation to bone defect. The purpose of this study is to clarify the effects of the duty ratio of high-frequency current and energization period, and the cells that the differentiation to osteoblasts is promoted. As a result, there was no significant difference between the duty ratios of 10, 30, and 70%, and a high osteoplasty promotion effect was recognized in 10%. It was significantly high osteogenesis after the surgery in 0-11 days at the energization period, and an effect was particularly high in 0-4 days. In addition, the effect of activating cells around the periosteum and bone matrix was not observed. High-frequency current has the effect of differentiating bone marrow-derived cells and vascular pericytes into osteoblasts. Especially, high efficacy was observed for vascular pericytes. The high effectiveness was recognized to vascular pericytes in particular.

研究分野：歯周治療学

キーワード：高周波電流 骨再生 分化 増殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生療法は、細胞や成長因子、足場材料を用いる組織工学的方法が広く研究されている。これらの要因を組み合わせた治療法では、移植細胞が直接組織を形成するだけでなく、細胞からの分泌物が周囲組織から欠損部に増殖した細胞に作用するパラクライン効果が大きく影響していると考えられている。欠損周囲に存在する健康な組織からの細胞の増殖、分化も再生に大きく影響するのであれば、物理的刺激で細胞の増殖と分化を促進し、生体が本来持っている治癒力を向上させることで、再生効果を高めることが可能と考えられる。このような研究はほとんどなく、わずかに LIPUS (低出力超音波パルス) が骨折の治療などに用いられているが、その効果は低く、組織が欠損している部位への再生療法としては有効性が不十分なのが現状である。

これまでに研究代表者らは、ラット頭蓋骨の規格した骨欠損に高周波電流刺激を行い、マイクロ CT および組織学的評価を行った。その結果、直径 5mm の骨欠損に多量の骨形成が認められ、学会で報告し論文発表した。骨形成量は対照群に比べてきわめて多く、母床骨から離れた部位に孤立した骨形成がみられるという再生過程は、きわめて高い活性を示すものであったことから、本法は臨床的な有用性が期待される。

2. 研究の目的

これまでに、高周波電流の出力は 1.4W 以下で良いことが判明しているが、この方法を発展させるためには、高周波電流刺激の最適条件を詳細に解明することが必要である。そこで本研究の目的の一つは、高周波電流の Duty 比 (実際に電流が流れている時間の割合) 実効電流値 (平均電流値) 刺激時期および回数を変えて骨形成量を比較することにより、高周波電流刺激の最適条件を明らかにすることである。

これまでの実験では骨欠損の中央部からも骨形成が生じていたことから、母床骨周囲の骨芽細胞や骨髄由来の幹細胞だけでなく、骨膜や硬膜由来の細胞が骨を形成した可能性がある。骨欠損の治癒過程において、欠損部に出現する細胞は経時的に変化するため、どのような細胞が骨形成に関与しているのかを明らかにして、通電時期はどのタイミングが良いのかを知ることが必要である。そこで本研究のもう一つの目的は、どの細胞が骨芽細胞に分化しているのかを解明することである。

3. 研究の方法

実験 1) 最適な Duty 比と実効電流値

10 週齢ラット頭蓋骨の骨膜を剥離して外径 5 mm のトレフィンバーで骨欠損を作製し、皮膚を縫合した。骨欠損中央部に相当する位置の皮膚に直径 0.2 mm の能動電極を刺入し、対極は左耳後方部の皮膚に刺入した。出力を 1.4W、1 回の通電時間を 1 秒間として 5 回の通電を、術後 0、4、7、11、14 日目に行う。Duty 比は 10、30、70% の 3 通りとした。実効電流値は高周波電流派生装置に接続したオシロスコープで計測した。コントロールは高周波電流刺激なしとした。

術後 8 週で頭蓋骨を摘出し、マイクロ CT 撮影して画像解析により骨再生量を計測した。さらに、脱灰薄切標本を作製して、骨形成状態を観察、骨形成量を組織計測した。

実験 2) 最適な刺激時期

実験 1 と同様の骨欠損を作製し、出力 1.4W、Duty 比 70%、通電時期は術後 0-4 日群 (0、4 日に通電) 7-11 日群 (7、11 日に通電) 0-11 日群 (0、4、7、11 日に通電) 7-18 日群 (7、11、14、18 日に通電) 14-25 日群 (14、15、21、25 日に通電) の 5 通りとした。コント

ロールは通電なしとした。術後 8 週でマイクロ CT による画像解析と組織計測により骨再生量を算出した。

実験 3) 増殖組織の由来が骨形成におよぼす影響

10 週齢 Wister 系ラットの頭蓋骨の骨膜を切除し、チタンスクリーピン (直径 0.5mm、長さ 3.15mm、トリノン) を 4 mm 間隔で 2 か所に埋入した。高周波電流は出力 1.4W、周波数 520kHz、Duty 比 70% とし、電極に #20 ファイルを用いてチタンスクリーピンに 1.0 秒間の通電を 5 回繰り返し行った。通電は 0、4、7、11 日目に行い、0 日目はチタンスクリーピンに直接ファイルを接触させ、4 日以後はファイルを皮膚からチタンスクリーピンに接するまで刺入して通電した。対照群はチタンスクリーピン埋入のみとし、通電は行わなかった。

観察期間は 7 日および 21 日とし、脱灰薄切標本を作製、H-E 染色して組織学的に骨形成状態を観察した。

実験 4) 結合組織内に生じる骨芽細胞の由来

ラット頭蓋骨に外径 5 mm のトレフィンパーで骨欠損を作製し、高周波電流を 0、4、7、11 日後に実験 2 と同様に通電した。対照群では通電を行わなかった。4、7、11、14 日後に還流固定して頭蓋骨を摘出、組織標本を作製し、アルカリホスファターゼ (ALP) や酒石酸耐性フォスファターゼ (TRAP) 染色を行った。

4. 研究成果

実験 1) 最適な Duty 比と実効電流値

マイクロ CT による硬組織形成率は、対照群では 12 % (中央値) であったのに対して、実験群では左右両側の骨欠損で 24 ~ 45 % を示し、ほとんどの通電条件で有意差が認められた。Duty 比で硬組織形成率を比較すると、Duty 比 10、30、70 % の間に有意差はなく、Duty 比 10 % でも十分な骨形成促進効果が認められた (図 1)。

光学顕微鏡観察において、対照群では骨断端部にわずかな新生骨形成がみられたのみであったが、実験群では多量の新生骨が観察され、骨欠損部の結合組織内に母床骨とは連続しない孤立した新生骨が多くの標本で認められた。組織学的計測による骨形成率はマイクロ CT の結果とほぼ同様であった。

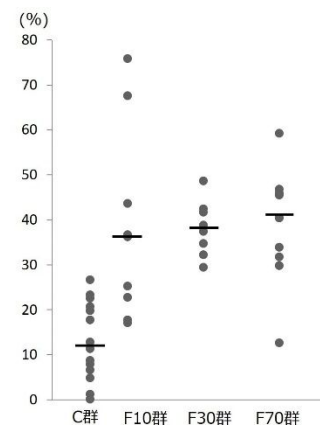


図 1

実験 2) 最適な刺激時期

μCT による硬組織形成率は、対照群 19.8% (中央値) であったのに対して、0-4 日群 28.1%、0-11 日群 23.8% と有意に高い値を示したが、他の群では有意差はなかった (図 2)。

組織学的に計測した骨基質形成率は、対照群 14.9% (中央値) であったのに対して、0-4 日群は

27.9%、0-11 日群は 32.0%で有意に高い値を示したが、他の実験群では有意差がなかった。また、対照群の観察期間 8 週では、新生骨が母床骨断端部にわずかに認められる程度であり、新生骨基質の表面は大部分が扁平な細胞で覆われていた。それに対して 0-4 日に高周波電流を通電した群では、骨欠損内に走行が不規則な新生骨が多く認められ、母床骨と連続しない孤立した新生骨や、立方形や類円形の細胞も一部で観察された。骨欠損の大部分を新生骨が満たして

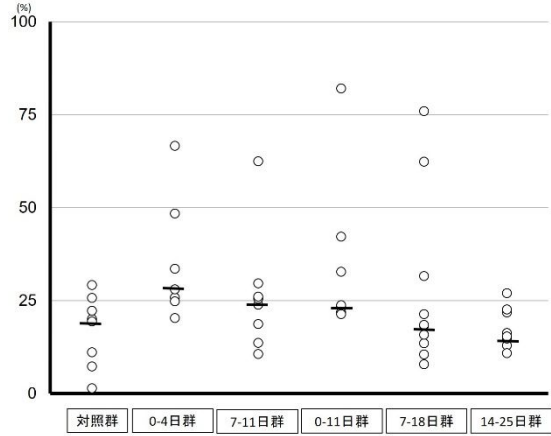


図 2

いるものもあった。0-11 日群では 0-4 日群と同様の所見であった。14-25 日群では対照群とほぼ同様で、新生骨は母床骨断端部に認められる程度であった。

新生骨形成量は 0-4 日群と 0-11 日群で対照群より有意に増加し、さらに 0-4 日群と 0-11 日群の間には有意差が認められなかったことから、0~11 日での通電が有効で、とくに 4 日以内が効果的と考えられた。対照群において新生骨形成が 14 日後でも持続しており骨芽細胞が新生骨周囲に多数存在していたことより、高周波電流が骨芽細胞の活性を向上させるのであれば、14 日以後の通電でも骨形成量は増加すると考えられる。したがって、高周波電流は骨芽細胞の活性化にはあまり効果的ではないと思われた。一方、骨断端部に観察された骨髓腔から連続した円形の細胞は、11 日以後減少していたことから、骨髓由来の細胞に高周波電流が作用して骨芽細胞への分化を促進していた可能性があると思われた。

実験 3) 増殖組織の由来が骨形成におよぼす影響

チタンスクリーブは硬膜を穿通し頭蓋内に突出しており、3 週後にはその周囲には新生骨がみられ、骨基質の走行は対照群、実験群とも不整であった。新生骨は対照群に比較して実験群の方が多かった。骨髓腔への骨基質形成も対照群より実験群の方が多く、対照群では 3 週後の骨基質の走行が不整であったのに対して、実験群では層板状になっているものが多数観察され、骨の成熟が促進されていると思われた (図 3)。

これらのことから、高周波電流は硬膜や骨髓による硬組織形成を促進し、とくに骨髓に対して高い効果を有する可能性が示唆された。

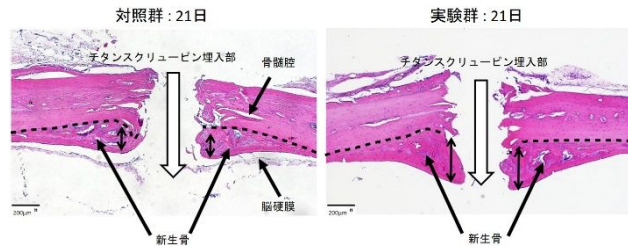


図 3

実験 4) 結合組織内に生じる骨芽細胞の由来

対照群の観察期間 4 日では、骨欠損部に血球と線維素からなる血餅が大量に見られた。骨断端部付近には骨髓腔が露出し、その周囲には骨髓腔と連続して円形や紡錘形の細胞が認められ、細胞に取り囲まれた毛細血管様構造も観察された。骨欠損中央部付近の血餅と皮下結合組織の間にも類似の構造がみられた。観察期間 7 日では、血餅は減少し骨断端部周囲には骨梁がわずかに観察され、その周囲には多くの円形や立方形、紡錘形の細胞がみられたほか、毛細血管様構造も多数認められた。また骨欠損中央部の皮下結合組織との境界部付近には多量の紡錘形の細胞や毛細血管様構造が観察された。観察期間 11 日では、骨欠損部の血餅はわずかで疎な結合組織が大部分を占めていた。骨断端部周囲の骨梁はさらに増加して厚くなり、その周囲には円形や立方

形、紡錘形の細胞が観察された。骨欠損中央部付近の皮下結合組織下では紡錘形の細胞や毛細血管様構造が多く観察された。観察期間 14 日では、骨欠損部に血餅は見られず、結合組織内は紡錘形の細胞が大多数で、毛細血管様構造は減少していた。骨断端部周囲に形成された骨梁は厚みを増し、その周囲には円形、立方形、紡錘形の細胞が多く認められた。

一方、実験群では高周波電流刺激が有効な 4～11 日において、骨欠損断端部周囲に骨髄由来細胞と思われる円形の細胞が多数認められたのに対して、骨芽細胞様細胞は 7～14 日で観察された。このことから、高周波電流刺激は骨芽細胞の活性化より骨髄由来細胞の骨芽細胞への分化に効果があるのではないかと思われた。一方、骨欠損中央部では、4～7 日で多数の毛細血管様の構造が認められたが、11 日以後ではその

数が減少し、11 日後には、ALP 陽性細胞が結合組織内に観察された。14 日後には ALP 陽性細胞に加えて骨基質の形成も認められたが（図 4）、TRAP 陽性細胞はほとんど観察されなかった。このことから、一般の骨形成にみられるリモデリングを繰り返して骨が増加するのではなく、高周波電流はモデリングを促進していると考えられた。

これらの結果から、高周波電流刺激は血管周皮細胞の増殖や骨芽細胞への分化を促進していることが示唆された。

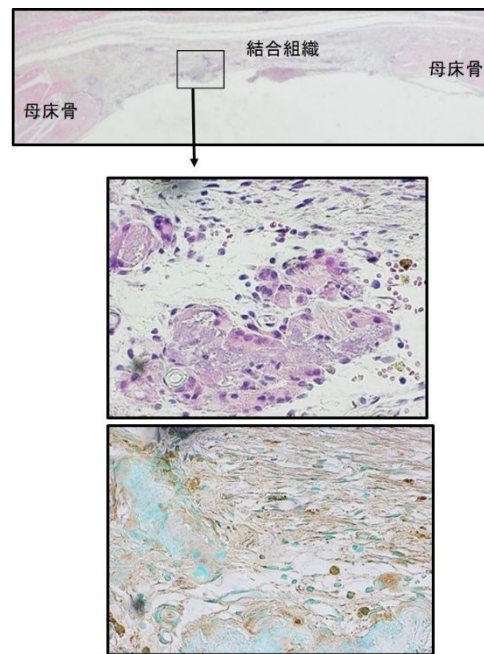


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田良子
2. 発表標題 高周波電流刺激による骨形成への対極とデューティ比の影響
3. 学会等名 北海道歯学会
4. 発表年 2017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	本郷 裕美 (Hongo Hiromi) (00778970)	北海道大学・歯学研究院・学術研究員 (10101)	
研究分担者	佐藤 賢人 (Sato Takahito) (80784917)	北海道大学・大学病院・医員 (10101)	