

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09575

研究課題名(和文) 骨粗鬆症が増殖因子と超音波療法を用いた硬組織形成に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Evaluation of the effects of osteoporosis on hard tissue formation using growth factors and ultrasound

研究代表者

山路 公造 (YAMAJI, KOZO)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：30374531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、増殖因子(BMP-2)と超音波療法(LIPUS)を用いた硬組織形成効果について、老齢および卵巣摘出(OVX)ラットを用いて検討した。BMP-2配合ゼラチンハイドロゲル(BMP群)またはゼラチンハイドロゲル(Gel群)を口蓋部に移植し4週間の観察とした。老齢ラットの場合、BMP群の新生骨形成はGel群と比べ増加しLIPUSを用いると促進した。OVXラットの場合、BMP群はGel群と比べ増加したが非OVXラットと比べ骨密度の低い像を認めたが、LIPUSを用いると新生骨と母床骨とほとんど一体化した。以上より骨粗鬆症において増殖因子と超音波療法を用いた場合の硬組織形成への関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、増殖因子と超音波療法を用いた硬組織形成効果について骨粗鬆症モデル動物を用いて検討した。その結果、BMP-2による新生骨形成を認め、また超音波療法を用いることによる形成促進効果が認められることが示唆された。特にエストロゲン分泌低下により骨代謝に変化が生じた場合においても、骨形成に一定の効果があることが示唆された。以上から、本研究は硬組織に関する一つの基礎的研究として学術的な意義があり、また高齢化社会をふまえた研究として社会的にも意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to evaluate the effects of osteoporosis on hard tissue formation using growth factor (BMP-2) and low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in aged or ovariectomy (OVX) rats. The experimental sites were divided into two groups: implantation of biodegradable gelatin hydrogel (Gel) containing BMP-2 (BMP group) and Gel only (Gel group). In the aged rats, the new bone formation in the BMP group was significantly increased as compared with the Gel group, and the formation was promoted by using LIPUS. In the OVX rats, the BMP group was significantly increased compared to the Gel group, but the bone mineral density was decreased compared to the non-OVX rats. On the other hand new bone formation was promoted and almost integrated with the original bone by using LIPUS. These results suggest that growth factor and ultrasound therapy have some effects on hard tissue formation in the case of osteoporosis.

研究分野：歯科保存学

キーワード：骨粗鬆症 増殖因子 超音波療法 硬組織形成

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来により、わが国において骨粗鬆症が年々増加しつつある。骨粗鬆症には加齢に伴い緩やかな骨量減少の持続する老人性の低回転代謝型、および閉経後のエストロゲン分泌低下により骨吸収が亢進する高回転代謝型が知られている。エストロゲンは骨芽細胞や象牙芽細胞の機能に関与する因子であり、エストロゲン欠乏により骨形成など硬組織形成に影響することが知られている。増殖因子である BMP (Bone Morphogenetic Protein) は硬組織誘導能を有し骨や象牙質形成などの組織形成に関与する因子であり、BMP-2 は特に強力な骨誘導能を有することが知られている。また超音波療法として低出力超音波パルス LIPUS (Low intensity pulsed ultrasound) は整形外科等では骨折治療に使用されており、超音波刺激により骨形成促進され骨折治癒が早まる効果が確認されている。

しかしながら BMP および超音波療法を用いた場合の硬組織形成について、骨粗鬆症が及ぼす影響に関する報告は極めて少ない状況であった。

### 2. 研究の目的

本研究は、増殖因子 (BMP-2) および超音波療法 (LIPUS) を用いた場合の硬組織形成について、骨粗鬆症が及ぼす影響について検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(実験動物)

- (1) ・老齡ラット (70 週齡 雄)                   ・若齡ラット (10 週齡 雄)
  - (2) ・OVX ラット (卵巣摘出ラット 雌)       ・非 OVX (正常) ラット (10 週齡 雌)
- (卵巣摘出は 6 週齡にて実施し 10 週齡で使用)

(材料と方法)

移植材は BMP-2 配合ゼラチンハイドロゲル (配合比 10μg/mL) または、ゼラチンハイドロゲル (BMP-2 無配合) とした。超音波療法として低出力超音波パルス LIPUS (オステオトロン 伊藤超短波) を用いた。

実験部位は口蓋部骨膜下とし移植条件により以下のように分類した。

- ・BMP 群: BMP-2 配合ゼラチンハイドロゲルを移植
- ・Gel 群: ゼラチンハイドロゲルを移植

上記条件にさらに LIPUS (1.5MHz, 30mW/cm<sup>2</sup>, 10min) を手術後 3 日毎実施したものを以下のように分類した。

- ・LI-BMP 群: BMP 群+ LIPUS 照射
- ・LI-Gel 群: Gel 群+ LIPUS 照射

観察期間は 4 週間とした。

(評価方法)

期間終了後、移植部位を摘出し固定、脱灰、包埋を経て組織標本作成し組織学的に観察した。また、定量的に新生骨厚さを計測し、その部位の TNB (Thickness of new bone) とした。統計解析は Tukey 法を用いた。大腿骨摘出し骨密度 (BMD: Bone Mineral Density) 測定および二重エネルギー X 線吸収測定法 (DXA 法: Dual-energy X-ray Absorptiometry) を実施した。

4, 研究成果

(1) 老齡ラット (低回転代謝型モデル) について

老齡ラットでは、BMP 群の硬組織形成は Gel 群と比べて有意に増加した。一方若齡ラットと比較すると形成量は有意に低下した (表 1)。さらに LIPUS を用いた場合は硬組織形成が促進されたが形成量に有意差は認めなかった。また BMP 群の新生骨は母床骨との境界を認めたが、LI-BMP 群では母床骨とほとんど一体化していた (図 1)。

これは、BMP-2 がゼラチンハイドロゲルから適度に徐放されることにより、老齡ラットにおいても周囲に存在する骨形成に関与する細胞が刺激され、骨形成が誘導されたことが考えられる。さらに LIPUS の刺激により、新生骨と母床骨の細胞が活性化され早期に形成されたのではないかと考えられる。このことから老齡ラットは若齡ラットと比べて骨形成は低下するものの、BMP-2 と LIPUS を用いることで形成が促進される可能性が考えられる。

表 1. 老齡および若齡ラットの TNB ( $\mu\text{m}$ )

	BMP群	Gel群	LI-BMP群	LI-Gel群
老齡ラット	87 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	19 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	101 $\pm$ 18 <sup>a</sup>	22 $\pm$ 10 <sup>b</sup>
若齡ラット	178 $\pm$ 58 <sup>c</sup>	49 $\pm$ 23 <sup>d</sup>	195 $\pm$ 6 <sup>c</sup>	58 $\pm$ 33 <sup>d</sup>

同一文字間有意差なし ( $P > 0.01$ ) 各群  $n=7$

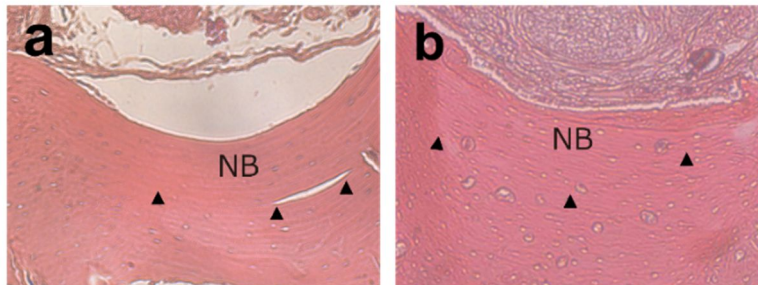


図 1 老齡ラットの組織像

(a)BMP 群 (b)LI-BMP 群 NB: 新生骨

BMP 群の新生骨は母床骨との境界を認めるが、LI-BMP 群では新生骨と母床骨はほとんど一体化していた。

## (2) OVX ラット (高回転代謝型モデル) について

OVX ラットでは、BMP 群の硬組織形成は Gel 群と比べて有意に増加したが、非 OVX ラットと比べてその形成量は低下した (表 2)。また BMP 群の新生骨は母床骨との境界を認め、骨密度の低い像を認めるが、LIPUS を用いた場合では母床骨とほとんど一体化して形成されていた (図 2)。また大腿骨においても OVX ラットは非 OVX ラットと比べ骨密度が低下する傾向がみられた (図 3)。

これは、エストロゲンは骨芽細胞の機能や骨代謝に関与する因子であり、エストロゲン欠乏により骨形成が抑制されたためではないかと考えられる。しかしながら、OVX ラットにおいても BMP-2 により骨形成に関与する細胞が刺激され、骨形成が促進されたことが考えられる。さらに LIPUS の刺激により、新生骨と母床骨の細胞が活性化され、形成促進されたことが考えられる。このことから OVX ラットは正常 (非 OVX) ラットと比べて骨形成は低下するが、一方で BMP-2 と LIPUS を用いることで形成が促進される可能性が考えられる。

表 2 OVX および非 OVX ラットの TNB ( $\mu\text{m}$ )

	BMP群	Gel群	LI-BMP群	LI-Gel群
OVXラット	106 $\pm$ 31 <sup>a</sup>	31 $\pm$ 14 <sup>b</sup>	112 $\pm$ 45 <sup>a</sup>	38 $\pm$ 23 <sup>b</sup>
非OVXラット	185 $\pm$ 62 <sup>c</sup>	61 $\pm$ 21 <sup>d</sup>	201 $\pm$ 67 <sup>c</sup>	68 $\pm$ 41 <sup>d</sup>

同一文字間有意差なし ( $P > 0.01$ ) 各群  $n=7$

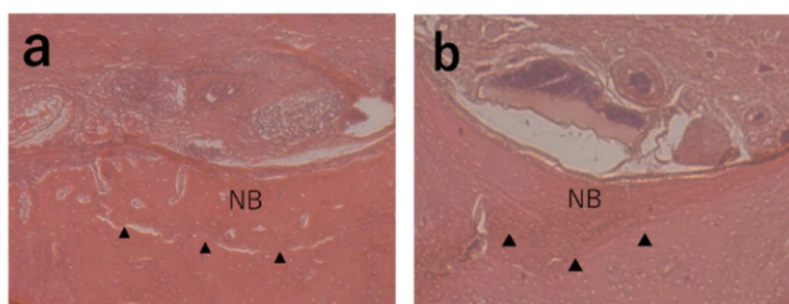


図 2 OVX ラットの組織像

(a)BMP 群 (b)LI-BMP 群 NB: 新生骨

BMP 群の新生骨は母床骨との境界を認め、骨密度の低い像を認めるが、LI-BMP 群では母床骨とほとんど一体化していた。

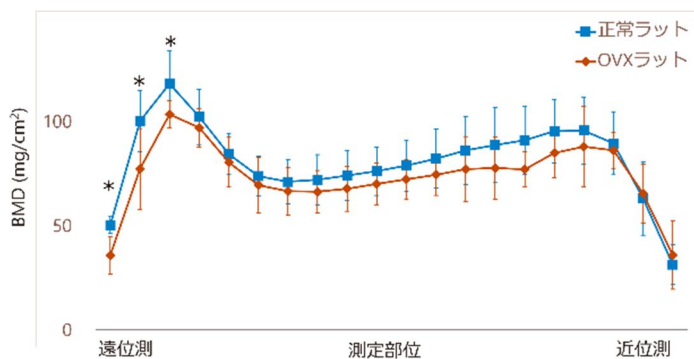


図3 大腿骨のMDP測定値

\*: 群間の有意差あり (P<0.01)

OVXラットの大腿骨は非OVXラットと比べ骨密度が低下する傾向がみられた。

以上より、本研究の条件下で増殖因子 (BMP-2) と超音波療法 (LIPUS) を用いた硬組織形成について、骨粗鬆症モデルとした動物実験で検討した結果、硬組織形成への一定の効果があることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamaji Kozo, Yokoyama Akihito, Matsuzaki Kumoko, Ohara Naoko, Sugaya Tsutomu, Yoshiyama Masahiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Effect of gelatin hydrogel containing BMP-2 on bone formation in aged rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Tissue Engineering	6. 最初と最後の頁 10-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11223/jarde.19.10	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 Matsuzaki Kumiko, Shimada Yasushi, Shinno Yasuo, Ono Serina, Yamaji Kozo, Ohara Naoko, Alizera Sadr, Sumi Yasunori, Tagami Junji, Yoshiyama Masahiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Assessment of Demineralization inhibition effects of Dentin Desensitizers using Swept-Source Optical Coherence Tomography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 1876
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma1481876.	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 Yokoyama Akihito, Yamaji Kozo, Ohara Naoko, Matsuzaki Kumiko, Shimada Yasushi, Yoshiyama Masahiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Effects of Direct Pulp Capping on Hard Tissue Formation by Using Alginate Gel Containing Bone Morphogenetic Protein-2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Tissue Engineering	6. 最初と最後の頁 53-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11223/jarde.17.53	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 Yamaji Kozo, Yokoyama Akihito, Shimada Yasushi, Sugaya Tsutomu, Ohara Naoko, Matsuzaki Kumiko, Nishiyama Eriko, Yoshiyama Masahiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Effects of Transforming growth factor- 1 and Bone morphogenetic protein-2 on bone formation using a bioabsorbable scaffold at palatal sites in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral Tissue Engineering	6. 最初と最後の頁 74-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11223/jarde.16.74	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9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 横山章人, 山路公造, 松崎久美子, 大原直子, 吉山昌宏
2. 発表標題 骨粗鬆症モデルラットにBMP-2配合ゼラチンハイドロゲルを移植した場合の硬組織反応
3. 学会等名 日本歯科保存学会学術大会（第156回）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大歳祐生, 山田慧太, 佐藤賢人, 菅谷 勉
2. 発表標題 高周波電流の刺激時期が骨形成に与える影響
3. 学会等名 第65回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山路公造, 横山章人, 松崎久美子, 大原直子, 吉山知宏, 菅谷 勉, 島田康史, 吉山昌宏
2. 発表標題 低出力超音波パルスがBMP-2配合ゼラチンハイドロゲルを口蓋部に注入した場合の骨形成に及ぼす影響
3. 学会等名 日本歯科保存学会学術大会（第155回）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横山 章人, 山路 公造, 吉山 知宏, 大原 直子, 松崎 久美子, 島田 康史, 吉山 昌宏
2. 発表標題 エストロゲン欠乏ラットにBMP配合ゼラチンゲルを移植した場合の硬組織反応
3. 学会等名 第18回日本再生歯科医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamaji K, Yokoyama A, Shimada Y , Ohara N, Yoshiyama M
2. 発表標題 Effects of BMP-2 and LIPUS on Bone Formation at Palatal Sites in Aged Rats
3. 学会等名 97th International Association for Dental Research ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimada Y, Luong M, Hosaka K, Yamaji K, Araki K, Sadr A, Miyazaki T, Yasunori Sumi, Junji Tagami, Masahiro Yoshiyama
2. 発表標題 Diagnosis of Unopened Occlusal Caries Using Swept-source Optical Coherence Tomography
3. 学会等名 97th International Association for Dental Research ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山路公造
2. 発表標題 増殖因子を用いた硬組織再生と健康長寿社会を目指して
3. 学会等名 再生歯科シンポジウム岡山 ( 招待講演 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山章人, 山路公造, 塩出信太郎, 大原直子, 松崎久美子, 島田康史, 吉山昌宏
2. 発表標題 BMP配合アルギン酸ゲルを直接覆髄に用いた場合の硬組織形成
3. 学会等名 日本歯科保存学会学術大会 ( 第151回 )
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 山路公造, 横山章人, 島田康史, 大原直子, 松崎久美子, 西山依理子, 田畑泰彦, 吉山昌宏
2. 発表標題 BMP配合ゼラチンゲルをラット口蓋部に移植した場合の硬組織反応
3. 学会等名 第16回日本再生歯科医学会
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	吉山 昌宏  (YOSHIYAMA MASAHIRO)  (10201071)	岡山大学・医歯薬学域・教授    (15301)	
研究分担者	菅谷 勉  (SUGAYA TSUTOMU)  (10211301)	北海道大学・大学院歯学研究院・教授    (10101)	
研究分担者	島田 康史  (SHIMADA YASUSHI)  (60282761)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授    (12602)	岡山大学から東京医科歯科大学へ異動

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