

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592315
 研究課題名（和文） PTH および TNF α 抗体徐放性ハニカム構造スキャフォールドによる骨再生の研究
 研究課題名（英文） Establishment of honeycomb type scaffold with sustained delivery of PTH and TNF α for bone regeneration
 研究代表者：
 八上 公利（YAGAMI KIMITOSHI）
 松本歯科大学・歯学部・准教授
 研究者番号：00210211

研究成果の概要：

骨髄間葉系幹細胞（BMSC）を PTH/TNF α 徐放性ハニカム構造スキャフォールド（PTH/TNF α -37H）とともに培養したところ、骨芽細胞分化およびマトリックス様構造物の形成と石灰化が観察された。また、骨欠損部埋入実験では優位に新生骨がインプラント表面の広い範囲で直接に接していた。BMSC と PTH/TNF α -37H を用いたハイブリッド型人工骨は骨欠損補填材として有用と考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：骨形成、骨質、未分化間葉系幹細胞、bTCP、PTH、TNF α 、ハイブリッド、インプラント

1. 研究開始当初の背景

（1）近年、歯科インプラントの需要は目覚ましいものがあるが、骨欠損の広範な骨粗鬆症や RA/OA、重度の歯周病等のリスクをもつ患者にたいしては、歯科インプラントや骨造成の適応は難しい。しかし、将来的な高齢者の増加と QOL の向上に伴い、更なる歯科インプラントの適応拡大が望まれるところである。特に、骨粗鬆症患者においては骨梁が乏しく、皮質骨も菲薄化しているためインプラント治療に関しても良好な結果が得られ

ていない。このことは、人工骨などを用いた骨再生とともに宿主の骨質の向上を同時に行うことが重要なことを示す。骨形成の促進剤としては、BMP-2 が優れた効果を示すことが知られているが、キャリアーや認可の問題があり実用化が難しいのが現状である。副甲状腺ホルモン（PTH）は、生理的骨吸収経路において骨芽細胞や骨髄ストローマ細胞に作用して骨芽細胞の破骨細胞分化因子（ODF/RANKL）の発現を促進し、破骨細胞の

形成と分化をさせる (Finkelstein et al. NEJM, 2003)。破骨細胞による骨吸収は、骨基質からの BMPs、IGF-1 や FGF-2 などの放出を誘導し、骨芽細胞の活性化を惹起させる (Gordeladze et al. J Cell Biochem. 2002)。さらに、PTH は未分化間葉系細胞の Runx2 の発現を抑制することにより、骨芽細胞の分化を抑制する (Jilka et al. 1999, J Clin Invest.)。このことから、PTH が破骨細胞の形成、分化を誘導し、骨吸収による骨芽細胞の活性化、分化に関連して骨吸収を効果的に促進し、骨代謝回転を早めると考えられている。一方、慢性リュウマチや歯周病などの病的骨吸収においては生理的な骨吸収経路とは異なり、TNF α により破骨細胞が活性化されることが知られている (Redlich et al. Arthritis Rheum. 2002)。TNF α の発現を特異的抗体により抑制することで破骨細胞のアポトーシスを誘導し、骨粗鬆症の発症要因の一つとして考えられている Interleukin-6、11 産生を抑制することにより、病的骨吸収を停止させる試みがなされ、TNF α 抗体が RA/OA の治療薬として臨床応用されることになってきた。

(2) 本研究の学術的な特色、予想される結果と意義、当該研究の位置づけ

本研究の特色は、骨代謝回転を正常回転に制御するように働く PTH および TNF α 抗体の徐放的局所投与により、局所で骨吸収を制御して骨梁の増加による骨密度の増加を計り、骨質の向上を促進する点にある。PTH ならびに TNF α の抗体は既に臨床応用がされており、安全性と汎用性に優れている。また、現在まで、PTH および TNF α 抗体局所投与での骨再生、骨質改善に関する報告は国内外ではない。

PTH/TNF α 抗体徐放性スキャフォールドの骨再生に関する研究は、臨床応用への可能性を示すとともに骨再生機構における PTH、TNF α の役割についての新知見を得るものとなり、有意義なものとなると考えた。

2. 研究の目的

申請者 (八上公利) は、骨欠損の広範な骨粗鬆症や RA/OA、重度の歯周病等のリスクをもつ患者の骨造成の際に、PTH および TNF α 抗体を局所で徐放的に作用させることにより、骨再生部のみならず周囲の骨質の改善につながるのではないかと考えた。また、この骨質の改善によりデンタルインプラントの適用が広がるものと考えた。

骨成長因子の徐放性スキャフォールドについてはこれまでに多くの研究がなされてきたが、スキャフォールドの強度、生体親和

性、徐放の速度や利便性等の問題から適当なものがないのが現状である。今回、申請者は、スキャフォールドとしてハニカム構造の bTCP-コラーゲン複合体を使用することで強度、生体親和性、徐放の速度や利便性等の問題を解決した。そこで、この徐放性スキャフォールドを PTH、TNF α の徐放体として骨再生への応用を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

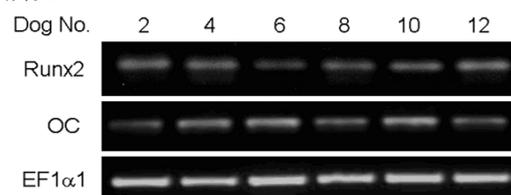
骨髄細胞は、ビーグル犬の大腿骨より全身麻酔下に還流法にて採取した。初期付着細胞のみ回収し、軟骨分化培地、骨芽細胞分化培地および脂肪分化培地で培養して多分化能を確認した後、間葉系幹細胞 (BMSC) として使用した。PTH/TNF α 抗体徐放性ハニカム構造 bTCP-コラーゲン複合体に BMSC を 2×10^5 個/ml の濃度で骨分化培地 (+/-rhBMP-2) において高密度旋回培養を行い、骨型の遺伝子発現、酵素活性および SEM にて組織の構築状態を評価した。また、細胞ハイブリッド型人工骨としてイヌの下顎骨に骨欠損を形成し、歯科用インプラントとともに移植した。3 ヶ月後、安楽死させて顎骨を摘出し、樹脂包埋して非脱灰研磨片を作製し光顕的に観察した。

4. 研究成果

高密度培養にて間葉系幹細胞 37H とともに培養したところ、骨芽細胞分化培地により骨芽細胞分化が見られた。SEM にて 37H の構内を観察したところ、マトリックス様構造物の形成と石灰化が観察された。また、骨欠損部埋入実験では術後 84 日目に新生骨がインプラント表面の広い範囲で直接に接していた。以上のことより、37H と自己間葉系幹細胞を用いたハイブリッド型人工骨は骨欠損補填材として有用と考えられた。

Fig. 1 骨芽細胞分化を行った細胞より mRNA を抽出し、RT-PCR 法により mRNA の発現を調べた。その結果、いずれの細胞においても Runx2 および osteocalcin の mRNA の発現が検出され、骨芽細胞への分化能が保持されていることが確認できた。

Fig. 2 PTH/TNF α -37H における BMSC の培養所見



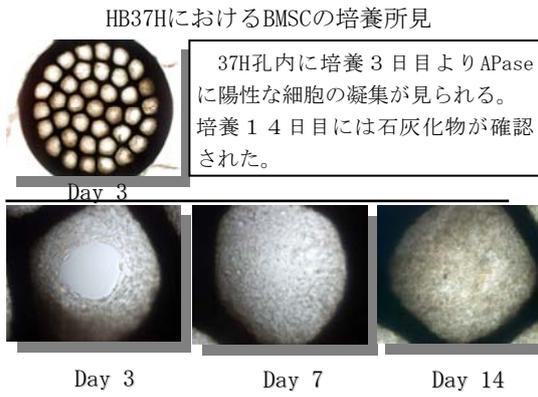
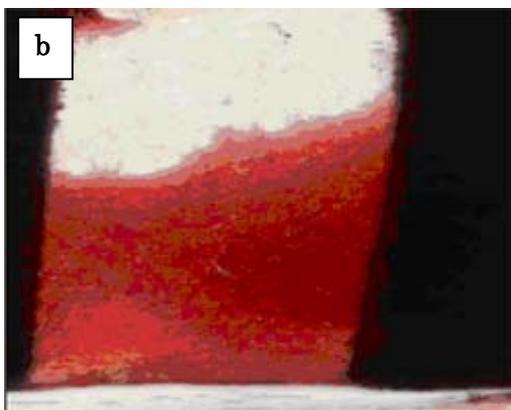
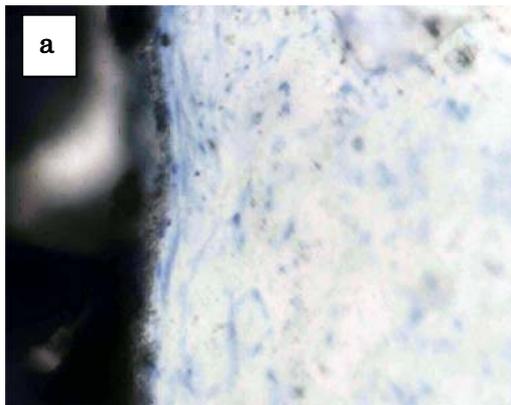


Fig. 3 Diffusion chamber により背部皮下へ埋入した PTH/TNF α -37H の組織学的に観察したところ、a) 4週目において孔内は壁面が全体的にアルシアンブルーに陽性な軟骨様構造が形成されていた。そして、孔内の中心部は主として繊維性の細胞成分で形成されていた。b) 8週目になると孔内の壁の周囲より石灰化様組織が形成され、12週目では孔内は石灰化物で満たされている部分が観察された。



c) Diffusion chamber の軟エックス線写真所見では、8週目より PTH/TNF α -37H 周囲に不透過像の形成が観察された。

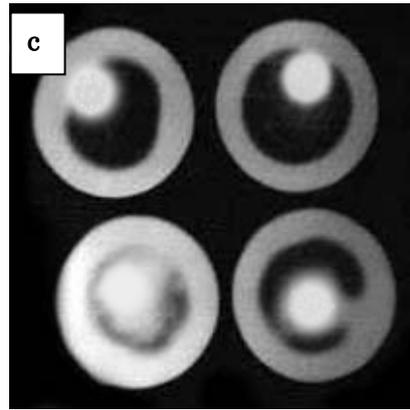


Fig. 4 PTH/TNF α -37H の培養における SEM 写真。培養後、14日目ではマトリックスと石灰化沈着物が確認された。

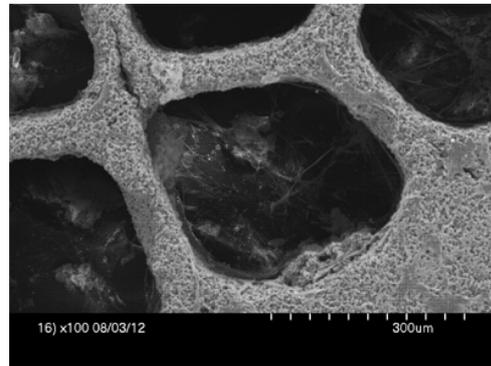
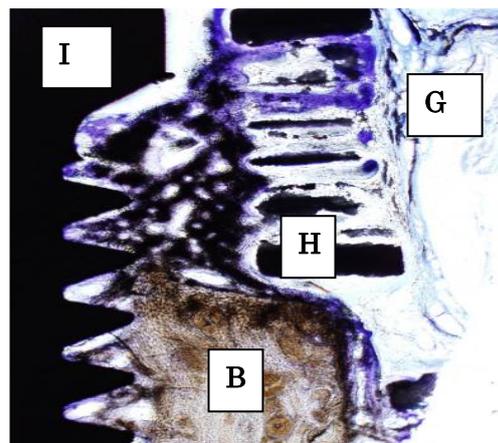


Fig. 5 インプラント周囲への骨造成術後の組織所見。既存骨(B)とインプラント体および歯肉組織(G)との間に PTH/TNF α -37H (H) と一体となって骨が新生されていた。



まとめ

- (1) 高齢の雌ビーグル犬大腿骨骨髓より間葉系幹細胞 (BMSC) を採取した。
- (2) 高密度培養にて BMSC を PTH/TNF α -37H とともに培養しハイブリッド型人工骨補填材を作成した。
- (3) 骨分化培地により長期培養を行ったところ、SEM にて 37H の孔内にマトリックス様構造物の形成と石灰化が観察された。
- (4) 自家細胞移植を併用した骨欠損部埋入実験では、新生骨がインプラント表面の広い範囲で接していた。
- (5) 以上のことより、PTH/TNF α -37H を用いた自己間葉系幹細胞ハイブリッド型人工骨は骨欠損補填材として有用と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① 八上 公利, 西澤 幹雄, 代田 達夫, 新谷 悟, 柳沢 茂, 矢ヶ崎 雅. 炎症性サイトカイン刺激による口腔粘膜細胞における一酸化窒素産生に対する AHCC の効果. 口腔組織培養学会誌 18:3-4 (2008), 査読あり.
- ② 持田 千久紗, 代田 達夫, 西村 明子, 吉澤 泰昌, 八上公利, 羽鳥 仁志, 新谷 悟. BMP-2 の抗癌剤処理こつずい細胞由来間葉系細胞に対する骨芽細胞分化と増殖への効果. 口腔組織培養学会誌, 18:17-18 (2008), 査読あり.
- ③ 吉澤泰昌, 代田達夫, 八上 公利, 柴田陽, 羽鳥 仁志, 宮崎 隆, 新谷 悟. 放電加工によるチタン表面処理がイヌ骨髓細胞由来骨芽細胞への分化・増殖に与える影響. 口腔組織培養学会誌, 18:31-32 (2008), 査読あり.
- ④ 八上 公利, 代田 達夫, 吉澤 泰昌, 西村 明子, 山中 隆平, 馬谷原 光織, 西澤 幹雄, 矢ヶ崎 雅, 久保木 芳徳, 新谷 悟, 柳沢 茂. 幾何構造とメカノストレスを応用した自己間葉系幹細胞・b-TCP ハイブリッド型骨補填技術の開発. 日本骨代謝学会雑誌, 抄録号 (2008), 査読あり.
- ⑤ Yagami, K., Shirota, T., Nishizawa, M., Shintani, S., Yanagisawa, S. (2008) AHCC suppresses the production of nitric oxide on oral mucous epithelial cells stimulated with inflammatory

cytokines. AHCC Research Association Proceedings, Hokkaidou Bureau of Economy, Trade and Industry and Amino Up Chemical Co., Ltd., pp53-57, 査読なし.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 平成 20 年度昭和大学共同研究-研究成果発表会-, 東京, 2009 年 3 月 21 日. 代田 達夫. 自己間葉系幹細胞ハイブリッド型人工骨によるインプラント周囲の骨再生に関する実験的研究.
- ② 第 45 回日本口腔組織培養学会, 松本, 2008 年 11 月 15 日. 炎症性サイトカイン刺激による口腔粘膜細胞における一酸化窒素産生に対する AHCC の効果. 八上公利 (第 45 回日本口腔組織培養学会プログラム抄録集 p16).
- ③ 第 45 回日本口腔組織培養学会, 松本, 2008 年 11 月 15 日. BMP-2 の抗癌剤処理骨髓細胞由来間葉系細胞に対する骨芽細胞分化と増殖への効果. 持田 千久紗 (第 45 回日本口腔組織培養学会プログラム抄録集 p23).
- ④ 第 45 回日本口腔組織培養学会, 松本, 2008 年 11 月 15 日. 放電加工によるチタン表面処理がイヌ骨髓細胞由来骨芽細胞への分化・増殖に与える影響. 吉澤 泰昌 (第 45 回日本口腔組織培養学会プログラム抄録集 p30).
- ⑤ 第 26 回日本骨代謝学会, 大阪, 2008 年 10 月 30 日. 幾何構造とメカノストレスを応用した自己間葉系幹細胞・b-TCP ハイブリッド型骨補填技術の開発. 八上公利 (第 26 回日本骨代謝学会抄録集).
- ⑥ 第 57 回日本口腔衛生学会総会, 大宮, 2008 年 10 月 2-3 日. 生活習慣および全身の健康状態と歯周病に関する疫学的研究. 中根 卓 (第 57 回日本口腔衛生学会総会講演集 p405).
- ⑦ 第 57 回日本口腔衛生学会総会, 大宮, 2008 年 10 月 2-3 日. b2 インテグリン遺伝子を対象としたダウン症候群患者の歯周疾患関連遺伝子の検索. 藤垣佳久 (第 57 回日本口腔衛生学会総会講演集 p450).
- ⑧ 日中歯科医学会, 中国・西安市, 古都新世界大酒店, 2008 年 9 月 28-29 日. Bone regeneration around dental implants with artificial bone hybridized with cultured marrow stromal stem cells. Shirota, T.
- ⑨ 16th International Conference of AHCC

Research Meeting, Sapporo, 2008, July, 25-26 (Invited lecture). AHCC suppresses the production of nitric oxide on oral mucous epithelial cells stimulated with inflammatory cytokines. Yagami, K.

- ⑩ 第66回松本歯科大学学会, 松本, 2008年7月14日. 自己間葉系幹細胞ハイブリッド型人工骨によるインプラント周囲の骨再生に関する実験的研究. 八上公利.
- ⑪ 第62回日本口腔科学会, 福岡, 2008年4月16日, 細胞ハイブリッド型人工骨によるインプラント周囲の骨再生に関する実験的研究. 代田 達夫 (第62回日本口腔科学会抄録集).

[その他]

松本歯科大学ホームページ

<http://www.mdu.ac.jp/>

パイロットコーポレーション

<http://www.pilot.co.jp/ceramics/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八上 公利 (YAGAMI KIMITOSHI)

松本歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：00210211

(2) 研究分担者

柳沢 茂 (YANAGISAWA SHIGERU)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

研究者番号：20134942

藤垣 佳久 (FUJIGAKI YOSIHISA)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80367523

(3) 連携研究者

久保木 芳徳 (KUBOKI YOSHINORI)

北海道大学・歯学部・名誉教授

研究者番号：00014001

代田 達夫 (SIROTA TATUO)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：60235760

新谷 悟 (SHINNTANI SATORU)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：80294429

吉澤 泰昌 (YOSIZAWA YASUMASA)

昭和大学・歯学部・助教