

令和 4 年 5 月 7 日現在

機関番号：15401
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2021
課題番号：19K19053
研究課題名（和文）骨形成促進型ハイドロキシアパタイトを用いた骨粗鬆症に対する骨再生療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of bone regeneration therapy for osteoporosis using bone formation promoting hydroxyapatite

研究代表者
牧原 勇介（Makihara, Yusuke）

広島大学・医系科学研究科（歯）・助教

研究者番号：40760418
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨粗鬆症の患者は骨代謝が低下している。そのため、骨粗鬆症患者における骨欠損部の回復は非常に困難で、インプラント治療を確実に達成する骨移植材の開発が望まれている。本研究では骨伝導、機械的強度および生体親和性に優れる連続多孔性ハイドロキシアパタイトの表面にリン酸処理を行い、生体活性作用を付加した“骨形成促進型ハイドロキシアパタイト（骨形成促進型HA）”を新規開発した。そして、骨粗鬆症を有する欠損部位へ新規人工骨を応用し、骨欠損の回復ならび骨質を改善した後、インプラントの埋入を行い評価し、その有用性を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年インプラント治療は広く一般に用いられるようになり、適用は高齢者にも拡大している。インプラント治療に際して、骨粗鬆症は初期段階では自覚症状がなく、患者は無自覚のまま歯科受診をすることもあり、インプラント治療成功のための全身的风险因子となっている。本研究では“骨形成促進型HA”を開発した。骨粗鬆症を有する骨欠損部位に対して骨形成促進型HAを用いることで骨欠損を改善し、さらに、インプラントを埋入し、その支持能を評価・検討することで「骨形成促進型HAを応用した骨粗鬆症におけるインプラント・骨再生療法」の確立をめざした。

研究成果の概要（英文）：Patients with osteoporosis have reduced bone metabolism. Therefore, it is very difficult to recover the bone defect in osteoporosis patients. And it is desired to develop a bone graft material that surely achieves implant treatment. In this study, we developed a new "bone formation-promoting hydroxyapatite (bone formation-promoting HA)" that has a bioactive effect by treating the surface of continuous porous hydroxyapatite, which has excellent bone conduction, mechanical strength, and biocompatibility, with phosphoric acid. Then, after applying a new artificial bone to the defect site with osteoporosis to recover the bone defect and improve the bone quality, implant placement was performed and evaluated, and its usefulness was clarified.

研究分野：骨再生

キーワード：ハイドロキシアパタイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本には1200万人を超える骨粗鬆症患者がいると言われており、超高齢社会を迎えている。わが国において、骨粗鬆症患者も増加することが予想され、2040年頃には現在の1.5倍の患者が見込まれている。一方、近年インプラント治療は広く一般に用いられるようになり、適用は高齢者にも拡大している。インプラント治療に際して、骨粗鬆症は初期段階では自覚症状がなく、患者は無自覚のまま歯科受診をすることもあり、インプラント治療成功のための全身的风险因子となっている。

骨粗鬆症では骨芽細胞の活性が低下し、それに合わせて破骨細胞が活性化され、骨リモデリングにおいて破骨細胞が優位な状態になっている。これまで申請者の行ってきた研究において、骨粗鬆症モデルのインプラント埋入窩では骨梁構造の顕著な減少を認めていた (Que H *et al.*, 2015.)。申請者は、このような骨質の低下した環境におけるインプラントの初期固定は不良であることを実証してきている (Oki Y *et al.*, 2017.)。

インプラント治療において十分な初期固定と、その後起こるオッセオインテグレーションの獲得が重要である。一方、骨粗鬆症においては骨梁の減少による初期固定の低下および破骨細胞優位な骨リモデリング環境によりオッセオインテグレーションが維持できなくなるリスクがある。そのため、骨粗鬆症患者の骨再建部に対するインプラント治療を確実にを行うためには、破骨細胞を抑制し、なおかつ、力学的な強度を持った骨形成に有利な骨リモデリング環境に導くことが重要である。

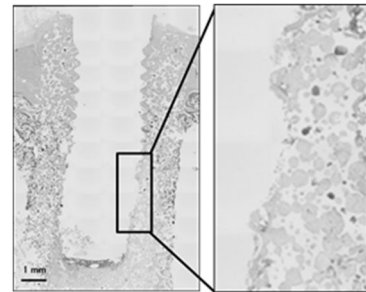
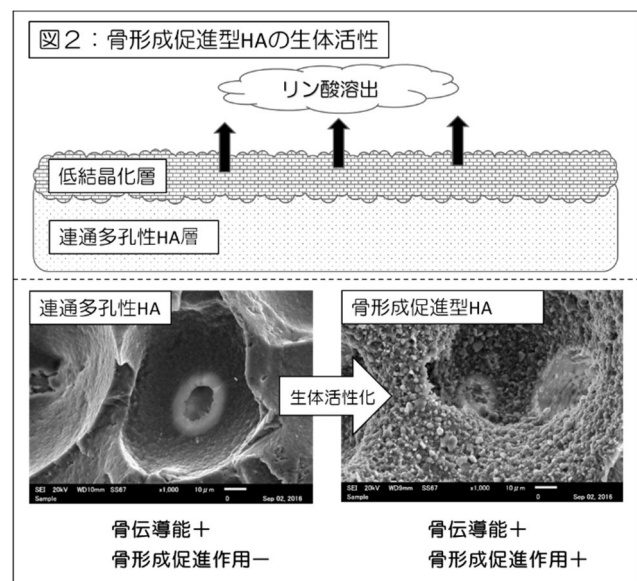


図1：連通多孔性HAによる骨再建

連通多孔性ハイドロキシアパタイト (連通多孔性HA) は優れた生体親和性、力学的強度および三次元構造を有している。申請者の研究により、この連通多孔性は優れた骨伝導能を持ち、インプラント周囲の骨から連続した骨形成を導く。さらに特徴的な所見として、骨組織の乏しい海綿骨部でも骨伝導を導き、骨欠損部の骨質改善効果ができることがわかっている (Makihara Y *et al.*, 2017. 図1)。

また、連通多孔性HAは力学的強度にも優れており、細胞や成長因子の足場として有用であることが実証されている。しかしながら、それ自体に骨形成促進能は有しておらず、骨リモデリングバランスの崩れた環境下での適応には問題が残される。

一方、 β -TCPなどの結晶性の低いリン酸カルシウムは生体内で吸収性を示し、速やかに骨に置換する。また、リン酸溶出による骨形成促進作用を有している。しかしながら力学的強度が低く、広範囲の骨欠損への応用は困難である (図2)。申請者らは、表面をリン酸による化学的処理を行うことで表層のCa/P比：1.67を β -TCPと同等のCa/P比：1.50に改質できることを*In vitro*にて報告した。また、これによりHA自体に生体活性作用を付与できることを*in vitro*において明らかとしてきた (Doi K *et al.*, 2017.)。



2. 研究の目的

本研究の目的を、連通多孔性にリン酸処理を行い、生体活性作用を持つ生体活性型連通多孔性HAである“骨形成促進型HA”を開発、骨粗鬆症を有する骨欠損部位に対して骨形成促進型HAによる骨再生を行うことで骨質ならびに骨欠損を改善し、さらに、骨再生部にインプラントを埋入し、その支持能を評価・検討する。これらにより「骨形成促進型HAを応用した骨粗鬆症におけるインプラント・骨再生療法」の確立をめざすこととした。

3. 研究の方法

研究1：骨形成促進型HAの破骨細胞活性に対する分化動態の検討；骨形成促進型HAプレート破骨前細胞（MLC-6）の培養実験に用いて破骨細胞の分化動態を検討した。まず、骨形成促進型HAの作製を行い、その作製した骨形成促進型HAプレートを用いて破骨細胞分化抑制の検討を行った。骨形成促進型HAプレートは過去に当該研究者が携わった研究結果をもとに作製し、構造上問題なく作製できた。またその後、破骨細胞分化誘導培地において、Real-time qPCR解析、ELISAおよびTRAP染色による評価を行う。

研究2：骨形成促進型HAによる骨形成およびインプラント支持の検討

骨粗鬆症モデルラビットの作製

担体およびインプラントの埋入：両側大腿骨に円柱状骨窩を形成し、片側には骨形成促進型HAを埋入し、もう片側には連通多孔性HAを埋入する。12週の治癒期間の後、左右骨再建部の中央にインプラントを埋入し、埋入トルクを測定する。

初期固定およびインプラント支持能の評価初期固定：埋入トルク値および埋入4週、8週にISQ値を測定。μCT撮影後、一方をインプラント引き抜き試験にて、逆トルク値を測定（n=6）。他方は骨組織を採取し、非脱灰研磨標本を製作し、組織学的、組織形態計測学的（骨・インプラント接触率および新生骨面積率）に評価した。

4. 研究成果

2019年度は研究1：骨形成促進型HAの破骨細胞活性に対する分化動態の検討を行った。

○骨形成促進型HAプレートを破骨前細胞（MLC-6）の培養実験に用いて破骨細胞の分化動態の検討を行ってきたが、おおむね順調に進展した。連通多孔性HAプレートを用いた骨形成促進型HAの作成は、問題なく成功しており、それを使用した破骨細胞分化抑制の検討を行った。Real-time qPCR解析ではRANKL、OPGおよびVDRのmRNA発現量は差が出ているがELISAによるTRAP5bの活性は破骨細胞分化抑制傾向にとどまっている。TRAP染色によるPit formationの観察においてもELISAと同様であった。今後は骨形成促進型HAの作製条件を再度検討することによりより安定した結果を得られるものと考えられる。

これらの結果により In vitro における骨形成促進型 HA の破骨細胞に対する抑制作用のメカニズムの一端が解明できたと考える。

2020年度および2021年度は研究2：骨形成促進型HAによる骨形成およびインプラント支持の検討を行った。

材料

動物：雌性ニュージーランドホワイトラビット 24羽（体重3.0~3.5 Kg）

ステロイド製剤：酢酸メチルプレドニゾロン（MPA、デポメドロール®）

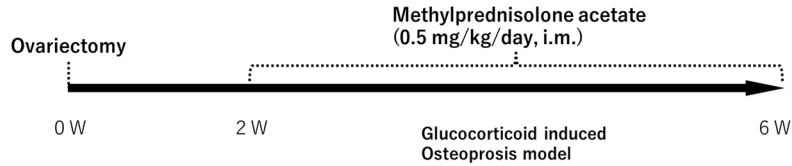
移植体：円柱状骨形成促進型HA（直径：5.0mm、長さ：7.0mm）

円柱状連通多孔性HA（直径：5.0mm、長さ：7.0mm）

インプラント：チタン製インプラント（直径：3.75 mm、長さ：7.0 mm）

骨粗鬆症モデルラビットの作製：

以下のスケジュールで動物 12 羽の両側卵巣摘出を行い，2 週後から MPA を筋肉内注射にて 4 週間投与し，骨粗鬆症モデルラビットを作製した。また残りの 12 羽に対し偽手術を行いコントロール群とする。



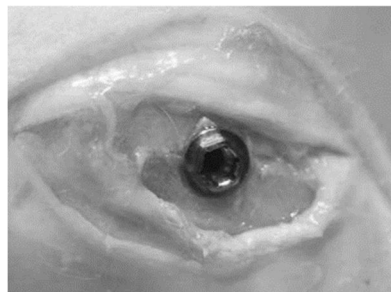
骨粗鬆症モデルラビットの作製中におけるラビット大腿骨の骨折などにより，実験個体数の変更等が起こったが，追実験で対応した。また新型コロナウイルスによる感染症の流行により，動物実験施設での実験に携わる人数制限等を行ったため，実験の効率が下がり当初の予定よりスケジュール遅延が出た。現在も感染に配慮した環境や実験人数で行っているが，以前より環境整備が整い実験人数の緩和などにより，実験スケジュールの遅延は最小限にとどまった。

担体およびインプラントの埋入：

両側大腿骨に円柱状骨窩を形成し，片側には骨形成促進型 HA を埋入し，もう片側には連通多孔性 HA を埋入する。12 週の治癒期間の後，左右骨再建部の中央にインプラントを埋入し，埋入トルクの測定を行った。



インプラント埋入時

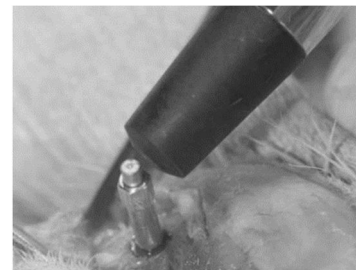


インプラント埋入後

初期固定およびインプラント支持能の評価：

初期固定：埋入トルク値および埋入 4 週，8 週に ISQ 値を測定した（右図）。

インプラント支持能： μ CT 撮影後，一方をインプラント引き抜き試験にて，逆トルク値を測定（ $n=6$ ）。他方は骨組織を採取し，非脱灰研磨標本を製作し，組織学的，組織形態計測学的（骨・インプラント接触率および新生骨面積率）に評価した。



インプラント埋入時において埋入トルク値には有意な差は認めなかった。ISQ 値においてはインプラント埋入時において骨形成促進 HA 群が連通多孔性 HA 群に比較し優位に高い値となった。埋入 4 週および 8 週においては有意な差は認められなかった。また逆トルク値においても有意な差は認めなかった。現在組織学的，組織形態計測学的に評価を行うため，標本作製・測定中である。ISQ 値の埋入 4 週目および 8 週目において有意な差が認められなかったことは，治癒期間の設定が長すぎたためと考察する。治癒期間の設定を短期間に変更することでより良い評価が行えたものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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