

機関番号： 11301
 研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2008~2010
 課題番号： 20300165
 研究課題名 (和文) リン酸オクタカルシウム・コラーゲン複合体
 を基盤とした高機能骨再生材料の創製
 研究課題名 (英文) Creation of highly functionalized bone regenerative material based
 on octacalcium phosphate (OCP) collagen composites
 研究代表者
 鎌倉 慎治 (KAMAKURA SHINJI)
 東北大学・大学院医工学研究科・教授
 研究者番号： 80224640

研究成果の概要 (和文)：

種々のリン酸オクタカルシウム(OCP)・コラーゲン複合体(OCP/Col)を用いてその骨再生能について検討し、(1) OCP/Col は細胞の増殖や接着を促進し、(2) 小型動物の埋入試験で OCP の含有量に依存して骨再生能が向上し、生じた新生骨の骨質は経時的に増強し、正常骨組織に匹敵する力学特性を示すこと、(3) 大型動物での種々の埋入試験によってその十分な骨再生能を確認し、これら一連の成果によって世界初の OCP/Col を用いた臨床研究を実現するに到った。

研究成果の概要 (英文)：

Bone regenerative properties of various octacalcium phosphate (OCP)·collagen composite (OCP/Col) were investigated. (1) OCP/Col promoted the proliferation and attachment of cells. (2) Bone regeneration by implantation of OCP/Col in small animals was improved by dose-dependent manner of OCP content. The quality of the regenerated bone by implantation of OCP/Col was progressively increased and was compatible to that of normal bone of mechanical properties. (3) In various implantation designs of large animals, sufficient bone regeneration was confirmed by implantation of OCP/Col. These sequential fruitions led to the first clinical trial of OCP/Col implantation in the world.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：骨再生医学、口腔外科学、生体材料学

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：再生医工学材料、骨再生、バイオマテリアル、骨代替材料、リン酸カルシウム
リン酸オクタカルシウム

1. 研究開始当初の背景

外傷・手術等による骨の喪失に対して外科的対応として自家骨移植が広く適用され、その代替手法として量的制限の無い人工骨としてハイドロキシアパタイト(HA)やβ-リン酸三カルシウム(β-TCP)などが既に臨床応用されている。しかし、それらには自家骨に匹敵する骨形成能がなく、依然として自家骨移植が第一選択となることが多い。近年、骨再生には細胞・成長因子・担体(人工合成の骨再生材料)の三要素が重要な役割を演じ、それらの協調で効率的に骨再生が起こることが明らかとなり、骨再生に関わる成長因子群・細胞群の機能を賦活化し、骨再生能や生体吸収性を合わせ持つ骨再生材料の開発が望まれている。一方、骨組織のアパタイト形成過程ではリン酸オクタカルシウム(OCP)が起点を担っていることが明らかになり、OCPの骨再生材料としての可能性に注目が集まってきた。

研究代表者らは古くからOCPに注目し、世界に先駆けてそれらの骨再生能について研究を展開(Tohoku J Exp Med 164; 1991)し、(1)OCPを核とした骨再生促進や骨形成系細胞の選択的賦活化(J Dent Res 78; 1999)。(2)OCPの既存材料(HAやβ-TCP)に対する骨再生能・吸収性の卓越(J Biomed Mater Res 59; 2002)。(3)骨形成性成長因子との複合化による骨再生促進効果(J Biomed Mater Res A 71; 2004)を報告してきた。

しかしOCP単独では賦形性・操作性に乏しく骨再生の適用部位が限定されていた。そこで賦形性・操作性の優れたOCP・コラーゲン複合体(OCP/Co1)を開発した(特願2005-336343)ところ実験的骨欠損モデル(ラット)において生体外から細胞や成長因子を補充しない状態でも飛躍的に骨再生を増大させた(J Biomed Mater Res B 80; 2006)。当時、国内外では臨床応用を視野にして賦形性・操作性に配慮した有機-無機複合材料の研究開発が活発に進められており、OCP/Co1の骨再生能は既に臨床応用されている骨補填材料であるHAやβ-TCPを基盤としたHA・コラーゲン複合体(HA/Co1)あるいはβ-TCP・コラーゲン複合体(β-TCP/Co1)に比べ優れていることを確認した(J Biomed Mater Res A 83; 2007)。

その後、バイオマテリアルにおいては構成材料の表面改質等による骨再生機能増進が注目され、OCP/Co1の改変によってさらに

高機能化した骨再生材料の創製が期待された。そこで本研究ではOCP/Co1に様々な改変を行った材料を作製し、それらを実験動物に埋入・経時観察することでそれらの骨再生を評価・検討し、臨床応用を目指した。

2. 研究の目的

研究代表者らが独自に開発し優れた骨再生能が明らかになったリン酸オクタカルシウム(OCP)・コラーゲン複合体(OCP/Co1)を基盤として、(1)改変型OCP/Co1作製、(2)材料学的・細胞学的解析、(3)短期生物学的解析(小動物)、(4)長期生物学的解析(大動物)を通して、高機能化OCP/Co1の創製を実現することで、汎用かつ簡便で安価な優れた骨再生材料の創製およびそれらの臨床応用を目指した。

3. 研究の方法

- (1) 改変型 OCP/Co1 作製：コラーゲンの分解速度に影響するコラーゲンの架橋処理、予備の実験で骨再生能に影響を与えることが示唆されている OCP/Co1 配合比、生体内での骨形成や吸収速度に影響を与える生体材料の顆粒径等構成材料を改変した種々の OCP/Co1 を作製した。
- (2) 材料学的・細胞学的解析：(1)で作製された様々な改変型 OCP/Co1 を X線回折・フーリエ変換赤外分光光度分析等を用いて結晶構造等の変化等を材料学的に解析した。また培養細胞を改変型 OCP/Co1 と共存させ、細胞の増殖能や骨芽細胞への分化の有無を評価し、(3)短期生物学的解析に使用する OCP/Co1 を絞り込んだ。
- (3) 小型動物(ラット)による短期生物学的解析：(2)で絞り込まれた改変型 OCP/Co1 をラット頭蓋冠規格化骨欠損等に埋入し骨再生能について解析を行う。摘出試料に対して(2)と同様に結晶構造等の変化について材料学的に解析するほかエックス線学的解析、組織学的・組織定量学的解析等を行い、(4)大型動物による長期生物学的解析に用いる改変型 OCP/Co1 を選択した。
- (4) 大型動物(成犬)による長期生物学的解析：(3)で選択された改変型 OCP/Co1 を用いて OCP/Co1 の臨床試験の前段階としてイヌでの骨再生能を評価した。

ビーグル犬(成犬)に頭蓋冠規格化骨欠損等を作製し改変型OCP/Co1を埋入し、術後3・6・12ヶ月等で組織を摘出し、得られた試料を材料学的・エックス線学的・組織学的・組織定量的に解析し、骨再生能について評価した。

4. 研究成果

本研究課題の成果として査読付き英文誌に公表したものの一部を以下に記す。

- (1) 研究実施計画に基づいて合成OCP及びブタ皮膚由来アテロコラーゲンから、OCP/Co1 配合比 (OCP/collagen比を23:77から83:17)、OCP結晶の微小構造を改変した様々な改変型OCP/Co1を作製し、それらの一部を用いてOCP/Co1あるいはOCPをコーティングしたプレート上で、マウス骨髄由来間質細胞株ST-2細胞の接着能・増殖能を14日まで解析した結果、OCP/Co1はOCP 単独と比較してその量に関わらずST-2細胞の増殖や接着を促進すること、結晶学的解析でOCP/Co1中のOCPはコラーゲンの存在にも拘らず アパタイトに転換する傾向があることを認めた。そして小型動物(ラット、マウス)を用いた生物学的解析ではOCP結晶の微小構造が結晶表面の細胞接着や骨再生能を制御することやOCP/Co1の骨再生能はOCPの含有量に依存して向上(OCP/collagen比83:17において12週で64%の骨再生率)することを明らかにした(Tissue Eng Part A 15: 23-32, 2009)。
- (2) 小動物におけるOCP/Co1による骨造成(骨を盛り上げる)の可能性を検討する目的で、厚さの異なるOCP/Co1をラット頭頂骨骨膜下に埋入し、術後4~12週後に摘出した。厚い試料(3mm厚)では埋入後早期から試料辺縁に多数の酒石酸耐性酸フォスファターゼ(TRAP)陽性多核巨細胞が多数観察され、OCP/Co1の吸収が著明で新生骨の形成は少なかった。一方、薄い試料(1mm厚)ではTRAP陽性多核巨細胞は少なく、新生骨の形成が観察されたことから、OCP/Co1による骨造成には周囲のメカニカルストレスの関与が示唆された(J Dent Res 88: 1107-12, 2009)。
- (3) OCP/Co1を骨膜下に埋入する際にOCP/Co1周囲を高分子材料で囲むことでメカニカルストレスの緩和を図ったもの(徐圧群)についての骨再生を検討したところ、徐圧群では埋入12週後に新生骨の造成を確認し、メカニカルストレスの緩和によってOCP/Co1による骨造成の可

能性が示唆され(Tissue Eng Part A 16: 139-151, 2010)、萎縮歯槽骨の骨造成を念頭にメカニカルストレスの影響を低減し効果的な骨再生を図る除圧支持体を考案し特許出願(骨形成用キットおよび骨形成治具嵩上げリング: 特願2008-202549)を行った。

- (4) ビーグル成犬に頭蓋冠規格化骨欠損(20mmφ)を作製しOCP/Co1ディスクを埋入し術後3、6、12ヶ月に組織を摘出した(対照群はコラーゲンディスクを埋入)。X線学的にはOCP/Co1埋入側は各期間において対照側に比べて明瞭なX線不透過性を示し、組織学的にもOCP/Co1埋入側における新生骨の割合は対照側に比べて有意に多く、十分な骨再生を達成することが確認された(Clin Oral Imp Res: in press, 2011)。
- (5) ビーグル成犬に抜歯窩を作製し同部にOCP/Co1ディスクを埋入し(対照群は未処置)、術後1、3か月に組織を摘出した。X線学的所見ではOCP/Co1埋入部の不透過性が経時的に亢進し、組織学的所見は、OCP/Co1を核として形成された新生骨が成熟骨に置換していた。また模型形態分析では対照群と比較して有意に優れており、3次元的な骨再生が推察され、抜歯窩骨欠損部においてOCP/Co1は優れた骨再生能を発揮し、その有用性が示唆された(Int J Oral Maxillofac Surg 39: 161-168, 2010)。
- (6) ラット頭蓋冠に規格化骨欠損を作製後、同部にOCP/Co1を埋入し術後4、12週に生じた新生骨を硬度測定、力学試験(靱性、弾性)、X線学的解析、組織学的に検索した。硬度測定試験結果は力学試験やX線学的解析と相関し、新生骨の骨質は経時的に増強し、組織学的には成熟した骨基質を認めた。術後12週では正常骨組織に匹敵する硬度や力学特性を示した(Tissue Eng Part C 16: 471-478, 2010)。
- (7) OCP/Co1あるいはコラーゲンを成犬顎裂モデルに埋入し術後4ヶ月で肉眼的、X線学的、組織学的に骨再生能について検討を加えた。肉眼的にはOCP/Co1を埋入した歯槽部は顕著に造成され、同部はX線不透過像を示し既存骨と欠損部の境界は不明瞭であった。組織学的には欠損部は新生骨で満たされ既存骨と骨架橋がなされた。一方、コラーゲン埋入群は肉眼的に陥凹した歯槽部を呈し、主として線維性結合組織で満たされ、新生骨は骨欠損辺縁に少量認めるのみであった。従って成犬顎裂モデルに

OCP/Col を埋入すると、同部は明確に骨によって修復されることが示された。(Int J Oral Maxillofac Surg 39, 2010)

更に本研究の一連の成果を基にヒトを対象とした臨床研究(リン酸オクタカルシウム(OCP)・コラーゲン複合体による骨再生治療: 鎌倉慎治、越後成志、鈴木 治、松井桂子)を策定し、本学歯学研究科倫理専門委員会での研究計画実施許可を得、世界初のOCP/Colを用いた臨床研究を開始するに到った。

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 20 件)

- ① Kawai T, Matsui K, Iibuchi S, Anada T, Honda Y, Sasaki K, Kamakura S, Suzuki O, Echigo S. Reconstruction of critical-sized bone defect in dog skull by octacalcium phosphate combined with collagen. Clin Oral Imp Res 査読あり 13: 112-123, 2011
- ② Matsui K, Matsui A, Handa T, Kawai T, Suzuki O, Kamakura S, Echigo S. Bone regeneration by octacalcium phosphate (OCP) collagen composites in a dog alveolar cleft model. Int J Oral Maxillofac Surg 査読あり 39: 1228-1225, 2010
- ③ Masuda T, Kawai T, Anada T, Kamakura S, Suzuki O. Quality of regenerated bone enhanced by implantation of octacalcium phosphate-collagen composite. Tissue Eng Part C 査読あり 16: 471-478, 2010
- ④ Matsui A, Anada T, Masuda T, Honda Y, Miyatake N, Kawai T, Kamakura S, Echigo S, Suzuki O. Mechanical stress-related calvaria bone augmentation by inlayed octacalcium phosphate-collagen implant. Tissue Eng Part A 査読あり 16: 139-151, 2010
- ⑤ Iibuchi S, Matsui K, Kawai T, Sasaki K, Suzuki O, Kamakura S, Echigo S. Octacalcium phosphate (OCP) collagen composites enhance bone healing in a dog tooth extraction socket model. Int J Oral Maxillofac Surg 査読あり 39: 161-168, 2010
- ⑥ Suzuki Y, Kamakura S, Honda Y, Anada T, Hatori K, Sasaki K, Suzuki O.

Appositional bone formation by OCP-Collagen composite. J Dent Res 査読あり 88:1107-12, 2009

- ⑧ Kawai T, Anada T, Kamakura S, Matsui K, Sasaki K, Morimoto S, Echigo S, Suzuki O. Synthetic octacalcium phosphate augments bone regeneration correlated with its content in collagen scaffold. Tissue Eng Part A 査読あり 15: 23-32, 2009

[学会発表] (計 47 件)

- ① Kamakura S, Matsui K, Iibuchi S, Matsui A, Handa T, Kawai T, Suzuki O, Echigo S. Application of octacalcium (OCP) collagen composites in canine bone defect model. 9th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery 2010 2010年11月25~28日, Kuala Lumpur, Malaysia
- ② Kamakura S, Matsui K, Matsui A, Handa T, Kawai T, Suzuki O, Echigo S. Bone regeneration by octacalcium phosphate (OCP) collagen composites in canine alveolar cleft model. Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society (TERMIS) 2010 asia pacific meeting, 2010年9月15~17日, Sydney, Australia
- ③ Kamakura S, Matsui K, Matsui A, Handa T, Kawai T, Suzuki O, Echigo S. Octacalcium phosphate (OCP) collagen composites enhances bone regeneration in a dog alveolar cleft model. International Bone-Tissue-Engineering Congress 2009年10月8~11日, Hannover, Germany
- ④ Iibuchi S, Matsui K, Kawai T, Sasaki K, Suzuki O, Kamakura S, Echigo S. Octacalcium phosphate (OCP) collagen composites enhance bone healing in a dog tooth extraction socket model. 19th International Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2009年5月24~27日, Shanghai, China
- ⑤ Kamakura S, Masuda T, Sasaki K, Echigo S, Suzuki O. Long-term results of bone regeneration with OCP-Collagen composites. 8th World Biomaterials Congress 2008年5月28日~6月1日, Amsterdam, The Netherlands

[図書] (計 1 件)

- ① Kamakura S, Anada T, Suzuki O. Nova Science Publishers, Chapter 6: Bone regeneration by octacalcium phosphate

(OCP) collagen composites. In: Bone Regeneration: Growth Factors, Augmentation Procedures and Tissue Engineering Applications. 2010, pp. 177-202.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：骨形成用キットおよび骨形成治具嵩上げリング

発明者：鈴木 治、越後成志、鎌倉慎治、穴田貴久、本田義知、松井有恒、森元慎二。

権利者：東北大学、ニプロ株式会社。

種類：特願

番号：2008-202549

出願年月日：2008年8月6日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.boneregeneration.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌倉 慎治 (KAMAKURA SHINJI)

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号：80224640

(2) 研究分担者

越後 成志 (ECHIGO SEISHI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：70005114

鈴木 治 (SUZUKI OSAMU)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：60374948

松井 桂子 (MATSUI KEIKO)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：00302159

(3) 連携研究者

()

研究者番号：