

機関番号：84503

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592317

研究課題名(和文) PLA・コラーゲン足場を用いたインプラント支持骨の開発

研究課題名(英文) Efficacy of bone regeneration using PLA and collagen as scaffold around implants

研究代表者

馬場 俊輔 (BABA SHUNSUKE)

財団法人先端医療振興財団・再生医療研究開発部門・主任研究員

研究者番号：40275227

研究成果の概要(和文)：

天然歯の咬合を支持しうる力学的特性を具備した開発済みである高強度の織物構造からなる生体吸収性足場のPLAと、「人工コラーゲン」を組み合わせることで、そこへ「移植細胞」から形成される再生骨により、早期にインプラントの咬合支持が可能となる足場を開発することを本研究における目的とした。まず、in Vitroにおいて織物構造PLAの足場としての骨再生を評価し、次に、実験動物において頭蓋骨骨欠損モデルにて足場の骨再生能を評価した。一方で、人工コラーゲンの足場としての骨再生能を評価した。さらに、大動物モデルを用いた骨欠損に対する再生能と歯周病の動物モデルにおける歯周組織再生能の評価をおこなった。その結果、織物構造PLAは、in Vitroでの骨形成、動物モデルにおいても移植環境の変化で差があったものの足場としての骨再生能、そして歯周組織の再生能が確認できた。人工コラーゲンは、MSCにとっての足場としての機能だけでなく、骨補填剤としても評価可能であることがわかった。以上のことから、PLAと人工コラーゲンは各々が足場として有用であり、さらに機能を付与させることで細胞の足場としてだけでなく、それ自体が骨再生能を有する材料に置き換わる可能性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：

The purpose of this research is development of functional dental implantable scaffolds under the occlusal pressure by using of PLA which we have already development of biodegradable fabric composite with dynamically high strength, artificial collagen and also bone formation using mesenchymal stem cells(MSCs). First of all, we investigate bone formation as scaffolds made from fabric composite PLA in vitro. Second, we assessed osteogenic ability as the scaffolds using experimental animal model of bone defects in cranium. On the other hands, we evaluated bone formation as the scaffolds made from artificial collagen. And we assessed periodontal regeneration ability as each scaffolds using experimental animal model of bone defects. As the results, it confirmed that using fabric composite PLA as the scaffolds can be bone formation in vitro, can be bone regeneration itselfs even in the animal models but depend on circumstance, and can be periodontal regeneration ability. It cleared for the MSCs that artificial collagen using as the scaffolds can be not only beneficial functional materials but also bone augmentations itself. Considering the circumstances results, it suggested that PLA and artificial collagen can perform its beneficial materials as the scaffolds, and can be not only scaffolds but also bone replaceable materials itself which have bone regeneration ability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
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・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生医療、足場

1. 研究開始当初の背景

国内外を通じて、狭義の幹細胞及び幹細胞からの分化誘導により分化形質を獲得した細胞の機能発現に適した足場を用いた再生医療の臨床はまだ存在しない。それに加え、移植部位に要求される力学的特性を充足した足場に関しては、基礎研究においても報告が少ないというのが現状である。申請者のグループでは、動物実験において、未分化間葉系幹細胞及び培養骨芽細胞を移植し骨再生を確認してきたが、臨床での適応を鑑み、咬合支持を可能とする生体吸収性足場を細胞移植と共に利用する必要性に駆られた。そこで、平成16～18年度科学研究費(基盤研究C)「咬合支持を可能とする生体吸収性足場を用いた培養骨の開発」(研究代表者：馬場俊輔)において、重度歯周病疾患への適応を想定し、天然歯の咬合力を負担しうる強度を有する生体吸収性足場の開発に着手した。当該研究において、ポリ乳酸(PLA)、乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)、ポリカプロラクトン(PCL)などの生体吸収性材料を用いて機械的強度を有する足場を開発し、さらに申請者が共同研究者として参加したJST研究成果活用プラザ京都市育成研究(平成16年10月～平成19年9月、代表研究者：北條正樹)では、高強度のPLA繊維よりなる編物・織物構造の生体吸収性足場を開発し、力学的強度を具備した足場の開発に成功した。

2. 研究の目的

上記で開発したPLAなどの生体吸収性材料からなる繊維を骨格とした足場の設計を検討し、足場材料間と細胞複合化方法を検討し、in vitroにおいて足場環境での培養骨芽細胞の増殖能及び分化能を確認することを目的として、手術の実験モデルには中・大動物を用いた動物実験を実施し、開発した骨形成材料の骨誘導能を評価すると同時に病理組織学的検査を行い、炎症反応など

の移植材料に対する局所反応を評価し、さらに開発した骨形成材料の生物学的安全性に関しても検討を加える。

3. 研究の方法

生体吸収性足場(PLA)とコラーゲンの複合化に関する検討として既に開発済みの人工コラーゲンとJST研究成果活用プラザ京都市育成研究で開発済みのPLAとを複合化が有効であるかを確認するためにPLA・コラーゲンのそれぞれの材料で細胞培養を行い、増殖能、分化形質の発現を指標として、どちらの材料に細胞を組み合わせることが有効であるかについて判断し、決定した方法に従って作製された足場で細胞培養を行い、細胞と足場の組み合わせ方を決定する。足場における細胞の活性の評価は、ALP活性などの骨芽細胞の分化形質マーカーの確認をはじめ、プロコラーゲンI型末端ペプチドやオステオカルシンなどの骨基質タンパク質、サイトカインなどの分泌タンパク質の経時変化を測定することにより評価する。

4. 研究成果

PLA+PCLの複合化によって生体吸収性足場としての操作性と構造剛性の向上が確認できた。また、足場としての機能よりもスパーサーとしての新規材料として多孔質α-TCPを開発して骨再生が可能であるか検討し、それらの複合化条件も併せて検討したところ、気孔径を200-1000μmでの設計になるよう作製することが可能になり、粒径を分類して200-500μと1000-1500μの2種類のα-TCPを製造分類できた。また人工コラーゲンの濃度は0.1, 0.5, 1.0, 2.0%と比較検討したところ低濃度で細胞増殖に優れていることが明らかとなり、人工コラーゲンは濃度を決定させた。この材料を用いてのブタの頭蓋骨と顎骨に埋植し、材料吸収速度と骨再生を確認するために、μCTを用いて骨増生過程を定量的

に検索するシステムを確立してきた、具体的にはチタン製の1mm角柱クリップを成形して作成した顎骨および頭蓋骨の骨欠損部（φ6×2mm）に挿入することで、作成した骨欠損と自家骨との境界が明瞭になりより骨再生能のより定量的評価が可能になった。一方、自己幹細胞を用いた細胞培養においては増殖・分化の後、ブタの自己血から調整したPRPを用いて手術時に再生材料と混和させるという培養系を確立することが可能になった。犬の実験的歯周病モデルにおいては確立させて培養系を用いて犬の自己血を利用して歯周組織の再生が確認できた。また、幹細胞の培養により分化誘導させた骨芽細胞をそれぞれの骨再生材料に播種して、培養系を確立させて、in vitroでの細胞増殖能試験をおこなって生体吸収性材料のもつ骨再生過程を明らかにした。その後、自己幹細胞を用いた細胞培養においては増殖・分化の後、自己血から調整したPRPを用いて手術時に再生材料と混和させるという培養系を確立することが可能になった。そこで、培養過程における骨再生能を検討するために、未分化間葉系幹細胞（MSC）の増殖能を評価する目的で予め培養工程にて増殖させた細胞を移植した場合の再生能と、生体内に直接移植してその再生能を比較した結果、ブタ骨髄由来間葉系幹細胞では移植時の培養細胞混和中に比較して足場による培養細胞が骨再生に優れていたことからヒト臨床に応用する際は詳細な検討が必要である。これらのことから、織物構造PLAは、in Vitroでの骨形成は動物モデルにおいて移植環境の変化で差があったものの足場としての骨再生能、そして歯周組織の再生能が確認できた。人工コラーゲン・TCP複合体は、MSCにとっての足場としての機能だけではなく、骨補填剤としても評価可能であることがわかった。以上のことから、PLA+PCLと人工コラーゲン・TCP複合体は各々が足場として有用であり、さらに機能を付与させることで細胞の足場としてだけではなく、それ自体が骨再生能を有するマテリアルに置き換わる可能性が明らかになった。

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5件）

1. Daisuke Kimura, Shunsuke Baba, Masatoshi Ueda.
Efficacy of bone regeneration with Poly(pro-hyp-gly) synthetic polypeptide sponge as scaffold using bone marrow derived mesenchymal stem cells.

Journal of Oral Tissue Engin, 査読有、2011 : 8(3) ; 162-172.

2. Shunsuke Baba, Yoshiya Hashimoto, Takeomi Inoue, Daisuke Kimura, Saeko Sumikura, Yumi Sonoda, Yoichi Yamada, Kenji Ito, Masaki Hojo, Taiji Adachi.
Evaluation of a 3D, woven-fabric, composite scaffold using experimental canine models of bone defects in mandibles.
Journal of Oral Tissue Engin, 査読有、2011 : 8(3) ; 212-221.

3. Kana Sakai, Yoshiyuki Arima, Kenichirou Yasui, Tomoko Kojima, Fumito Sakamoto, Yoshiya Hashimoto, Shunsuke Baba and Naoyuki Matsumoto.
Bone regeneration efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a 3-D woven fabric composite scaffold.
Journal of Osaka Dental University, 査読有、2011 : 42(2) ; 151-157.

4. Shunsuke Baba, Takeomi Inoue, Nobuo Tanaka, Chiaki Hiwa, Taiji Adachi, Masaki Hojo, Hidetoshi Morikuni, Aki Nishiura, Naoyuki Matsumoto and Takayoshi Kawazoe.
In-vitro assessment of fabric structural composite scaffold applicable to tissue regeneration around implants.
Journal of Osaka Dental University, 査読有、2008 : 42(2) ; 107-112.

5. Shunsuke Baba, Takeomi Inoue, Yoshiya Hashimoto, Daisuke Kimura, Masatoshi Ueda, Kana Sakai, Naoyuki Matsumoto, Chiaki Hiwa, Taiji Adachi and Masaki Hojo.
Effectiveness of scaffolds with pre-seeded mesenchymal stem cells in bone regeneration -Assessment of osteogenic ability of scaffolds implanted under the periosteum of the cranial bone of rats-.
Dental Materials Journal, 査読有、2010 ; 29(6) : 673-681.

〔学会発表〕（計10件）

1. 安井憲一郎, 坂井加奈, 有馬良幸, 馬場俊輔, 橋本典也, 松本尚之.
PRPおよびPPPと骨髄間葉系細胞を組み合わせた骨再生能の評価.
第69回日本矯正歯科学会大会プログラム

2. Kana Sakai, Shunsuke Baba, Yoshiya Hashimoto, Kenichirou Yasui, Yoshiyuki Arima, and Naoyuki Matsumoto. Effectiveness of 3D Woven Fabric Composite Scaffold In Bone Regeneration. The Program Book of 88th General Session & Exhibition of the IADR 5th General Session of the Pan European Region of the IADR, 2010:141
 3. 有馬良幸, 坂井加奈, 安井憲一郎, 橋本典也, 馬場俊輔, 武田昭二, 松本尚之. ポリL乳酸三次元織物構造体スキャホールドと骨髄間葉系細胞を組み合わせた歯槽骨再生方法の可能性. 歯科産業学会雑誌, 2010; 24(1):89
 4. Daisuke Kimura, Shunsuke Baba, Masatoshi Ueda. The application of synthetic collagen in bone regeneration. Journal of the Japanese Society of Periodontology, 2010 ; 52(3) : 317.
 5. 木村大輔, 馬場俊輔, 上田雅俊. 骨髄由来間葉系幹細胞を用いて合成ポリペプチド Poly(Pro-Hyp-Gly) スポンジを足場とした骨再生の有効性. 日本再生歯科医学会講演集, 2010:40.
 6. 木村大輔, 馬場俊輔, 井上剛臣, 上田雅俊. 骨再生におけるコラーゲンミクロスフィアの足場としての有効性. 日本歯周病学会誌. 2009 ; 第 51 卷 (秋季特別号) : 95.
 7. 山田陽一, 伊藤憲治, 中村さやか, 片桐渉, 馬場俊輔, 原憲史, 梅村恵理, 上田実. 歯髄幹細胞による再生医療を用いたインプラント治療への応用—乳歯、永久歯歯髄幹細胞による骨再生パラダイムシフト—. 日本口腔インプラント学会誌, 2009;22(特別号) : 122
 8. Daisuke Kimura, Shunsuke Baba, Takeomi Inoue, Miwa Motegi, Yoshiya Hashimoto and Minoru Ueda. In-vitro assessment of collagen microspheres in bone regeneration. The Program Book of 2nd Meeting of International Association For Dental Research Pan Asian Pacific Federation/1st Meeting of the International Association For Dental Research Asia/Pacific Region, 2009:58
 9. Yoichi Yamada, Kenji Ito, Sayaka Nakamura, Ryoko Yoshimi, Hideharu Hibi, Shunsuke Baba and Minoru Ueda. Clinical application using injectable tissue-engineered bonefor minimally invasive and aesthetic dental implant treatment. Clin Oral Implants Res, 2009;20(issue9):986
 10. Kana Sakai, Shunsuke Baba, Yoshiya Hashimoto, Kenichi Yasui, Yoshiyuki Arima, and Naoyuki Matsumoto. Efficacy of bone regeneration using fabric structural composite scaffold. 2nd Meeting of the International Association For Dental Research Pan Asian Pacific Federation/1st Meeting of the International Association For Dental Research Asia/Pacific Region Program book 2009;58
6. 研究組織
(1) 研究代表者
馬場 俊輔 (BABA SHUNSUKE)
財団法人先端医療振興財団・再生医療研究開発部門・主任研究者
研究者番号 : 40275227
- (2) 研究分担者
山田 陽一 (YAMADA YOICHI)
名古屋大学・医学系研究科・助教
研究者番号 : 20345903