

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791428

研究課題名（和文） インテリジェント人工骨による顎骨の再生

研究課題名（英文） Bone regeneration using the Intelligent artificial bone

研究代表者

土井 一矢 (DOI KAZUYA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80444686

研究成果の概要（和文）：本研究は連通多孔性ハイドロキシアパタイトにポリリン酸を吸着させた人工骨に bFGF を併用するインテリジェント人工骨の骨形成促進作用を評価して、骨移植材としての有用性を明らかとすることである。結果として、ポリリン酸・bFGF で構成するインテリジェント人工骨は *in vitro* にて石灰化を促進することを確認し、*in vivo* での骨形成を促進することが明らかとなり GBR 法への応用が期待できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： The purpose of this study is to evaluate the combined effect of bFGF and poly(P) on bioactivities of osteoblasts and initial bone regeneration *in vitro* and *in vivo*. This study indicated that co-application of bFGF and poly(P) may provide enhanced bone formation by modulating cell proliferation and the mineralization process. It is anticipated that a combined application of bFGF and poly(P) can provide a novel method for bone regeneration in clinical use.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：補綴系歯学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：骨再生・人工骨

1. 研究開始当初の背景

自家骨に代わる安全で予知性が高く、かつ幅広い臨床応用に叶う人工骨の開発が望まれている。我々は生体親和性および骨伝導能に優れた連通多孔性ハイドロキシアパタイトに着目し、これをスカフォールドとして Tissue engineering を基に新規人工骨の開発を行ってきた。まず、初めに骨髄間質細胞を連通多孔性ハイドロキシアパタイトに導入し骨誘導を付与したハイブリッド人工骨を作製し、ビーグル犬大腿骨での埋入実験において優れた骨再生能を確認した。しかしながら、このハイブリッド人工骨は安全性、骨再生能に優れたものの、作製するにあたりインフラ設備の設置、作製に時間を要することなどの問題が残り、幅広い臨床応用への実現は課題が残されている。

近年、生理活性物質であるポリリン酸が骨再生へ有用に作用することが報告されている。ポリリン酸は FGF の安定化作用、石灰化促進作用などが報告されており、骨再生への応用が期待される。このポリリン酸を連通多孔性ハイドロキシアパタイトに吸着させたポリリン酸結合人工骨を作製したところ、材料特性の評価およびラビット大腿骨での埋入実験より、早期の骨形成促進が認められた。

そこで我々は、ポリリン酸と bFGF との相互作用を検討することにより、より骨形成を促進する人工骨の開発に着目した。そこでこれらを組み合わせることにより骨形成促進するインテリジェント人工骨の開発を目指した。

2. 研究の目的

連通多孔性ハイドロキシアパタイトにポリリン酸を吸着させ、さらに bFGF を併用したインテリジェント人工骨を開発し、その有用

性を *in vitro* および *in vivo* にて評価することにより新たな人工骨の創製を目指すこととした。

3. 研究の方法

in vitro :

実験群を

- (1) ポリリン酸群
- (2) bFGF 群
- (3) ポリリン酸・bFGF 群
- (4) コントロール群

の 4 条件とした。α-MEM 培地にて MC 3 T 3 - E 1 細胞を各条件下のもと一定期間の培養を行った。各期間の培養後、次の評価項目にて評価した。細胞増殖数、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、リアルタイム RT-PCR 法による骨形成マーカー発現および石灰化度の評価をアリザリンレッド S にて行った。

in vivo :

実験群。

次に、連通多孔性ハイドロキシアパタイト (シリンダー型、直径 3 mm、高さ 5 mm) に各濃度のポリリン酸を吸着させ、次の実験群を設定した。実験群を

- (1) ポリリン酸群
- (2) bFGF 群
- (3) ポリリン酸・bFGF 群
- (4) 連通多孔性ハイドロキシアパタイト

の 4 条件とした。ポリリン酸は 25%w/t 濃度で吸着させ、ガンマ線滅菌を施した。bFGF は 30 μg を埋入前に担体中含浸させ作製した。実験動物にはニュージーランドホワイトラビット 10 羽を用いた。実験動物の大腿骨部を皮膚、筋膜の剥離の後、露出させた。露出した大腿骨部に規定の円柱状骨欠損 (直径 3 mm、高さ 5 mm) を 2 ヲ所形成し、同部に各条件の移植材をそれぞれ埋入した。埋入から、1、

2 および 3 週後に動物を屍殺，移植材を含む組織ブロックを採取し，脱灰標本を作製しヘマトキシリン・エオジン染色を施した。得られた組織標本から，光顕的に組織学的観察ならび組織形態計測として新生骨の骨面積率を測定した。

4. 研究成果

*in vitro*の結果は次の通りとなった。

細胞増殖数は条件（3）ポリリン酸・bFGF 群が，他の条件群に対して有意に高い値であった。

ALP 活性は（1）ポリリン酸群が最も高い値であったが，（2）bFGF 群では低い値であった。

生化学的評価において（1）ポリリン酸群および（3）ポリリン酸・bFGF 群は骨形成マーカー（オステオネクチン，オステオポンチン，オステオカルシン，）が（4）無コントロール群有意に高い発現を示した。

石灰化度の観察では，培養期間 20 および 25 日において，（1）ポリリン酸群および（3）ポリリン酸・bFGF 群は他の条件群に対して濃染していた。

*in vivo*の結果は次の通りとなった。埋入 1 週後の組織像では，すべての条件群において，欠損部気孔内は肉芽様組織が多く占められており，新生骨はあまり観察されなかった。一方，埋入 3 週後組織像では，すべての条件群において新生骨が観察され，特に（3）ポリリン酸・bFGF 群では新生骨が多く観察された。骨面積率の結果では，埋入 3 週後において，（1）ポリリン酸群および（3）ポリリン酸・bFGF 群は他の条件群に対して有意に高い値となり，また

（3）ポリリン酸・bFGF 群は（1）ポリリン酸群に対しても有意に高かった。以上より生体内における骨形成では（3）ポリリン酸・bFGF 群が最も骨形成を促進した。

これらの結果より，（3）ポリリン酸・bFGF 群で作成されるインテリジェント人工骨による骨形成を促進するメカニズムの一端が明らかとなり，安全でより予知性の高い人工骨による骨再生療法の確立が可能となった。

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 2 件）

① Yuan Q, Enhanced initial bone regeneration with inorganic polyphosphate-adsorbed hydroxyapatite, *Acta Biomaterialia*, 査読あり, 2010, In press

② Yuan Q, Kubo T, Doi K, Morita K, Takeshita R, Katoh S, Shiba T, Gong P, Akagawa Y.

Effect of combined application of bFGF and inorganic polyphosphate on bioactivities of osteoblasts and initial bone regeneration.

Acta Biomater, 査読あり、5:1716-1724, 2009.

〔学会発表〕（計 1 件）

① Doi K et al.

[Development of inorganic polyphosphate-adsorbed interconnected porous calcium hydroxyapatite as a new bone regeneration material]

Poster competition 受賞, The 13th Meeting of the International College of Prosthodontists 2009 年 9 月 10 日 (Cape town, SA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井 一矢 (DOI KAZUYA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号： 80444686

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：