

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究 B  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791476  
 研究課題名（和文） 幾何学的特性を有する炭酸アパタイトスキャフォールドと低出力超音波を用いた骨再生医療  
 研究課題名（英文） Bone regeneration using scaffold of carbonic acid and low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) with geometric property

研究代表者  
 伊藤秀寿（ITO HIDETOSHI）  
 昭和大学歯学部顎口腔疾患制御外科学教室 助教  
 研究者番号：80384303

## 研究成果の概要：

今日において、欠損補綴の治療としてインプラント治療は、大きな役割となりつつある。しかしながら、インプラント治療の問題として、周囲骨の形成を如何に促進させるかが鍵となり、まだ完全とは言えない。さらに、実際には骨リモデリング活性の低下している高齢者や、埋入距離の獲得のため人工骨（アパタイト）を用いた症例が多く、早期荷重を難しくしている。

そこで、本研究では、安全で且つ効果的に骨を造成するために、低出力超音波(LIPUS)と炭酸アパタイト scaffold、さらに増殖因子による化学的刺激の併用によって、脂肪細胞からの骨芽細胞への分化誘導を試み、自家骨移植の基礎的研究を行い、次いで、その臨床的応用への考察を行った。

本研究では、炭酸アパタイトに直径 300～400 $\mu\text{m}$  のポアを付与することにより、骨芽細胞の誘導および骨形成能を活性化し、長期的に安定したリモデリングを可能にする scaffold を作成する。そして、LIPUS を併用することにより、サイトカインを刺激し骨芽細胞や軟骨細胞の増殖を促し、骨形成を促進させる。その結果、以上の併用により、脂肪幹細胞は、骨芽細胞および軟骨細胞の分化マーカーを発現し、形態的にも機能的にも骨芽細胞様細胞、あるいは、軟骨細胞様細胞に分化することが可能であることが明らかとなった。これらの結果は、炭酸アパタイト scaffold と骨および軟骨の分化誘導に関与する増殖因子（化学的刺激）、さらに、LIPUS による機械的刺激との何らかの相乗的刺激によって、自家細胞の *ex vivo* における硬組織再生の可能性を示唆するものである。

以上より、本研究において、インプラント治療の新たな手法の可能性が示唆されたと考えられ、同時にこれは、患者の QOL 向上の道が開かれたことを意味している。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1700000		1700000
21 年度	1400000	510000	1910000
年度			
年度			
年度			
総計	3100000	510000	3610000

研究分野：口腔外科

科研費の分科・細目：

キーワード：インプラント、骨再生、scaffold

## Abstract

To date, the dental-implant therapy plays a more important role than ever. However, one of the critical problems of this therapy depends on growing the surrounding alveolar bone, representing a difficult key of completely successful cure. Moreover, often clinically, that is applied to the aged patients with low activity of bone remodeling, and with requirement of artificial bone (apatite) for acquirement of sufficient bone width for implantation, also meaning a difficulty of early loading.

Herein, in order to achieve safer and more effective bone formation, we made a basic trial to self-bone-implantation, in which adipocyte stem cells (ASCs) were allowed to differentiate and induce to osteoblasts and/or chondrocytes, by the utilization of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) and carbonate apatite scaffold, together with chemical stimulation of several growth factors. Thereby, we made discussion for the clinical application of this novel technique.

In the present study, carbonate apatite pellets with micro pores (diameter, 300 - 400  $\mu\text{m}$ ) were utilized as a scaffold, which enabled ASCs to induce osteoblasts and/or chondrocytes, and to activate potential of bone formation, thus, resulted in long-term and stabile bone remodeling. Moreover, together with LIPUS, osteoblasts and/or chondrocytes, which were differentiated from ASCs by growth factors, underwent promotion of proliferation and of bone formation. As a result, it is revealed that these treatments enabled ASCs to express the differential marker gene of osteoblast and chondrocyte, and to differentiate, both morphologically and functionally, to osteoblast-like or chondrocyte-like cells. These results suggest that some synergic effects of the carbonate apatite scaffold and the growth factors (chemical stimulation), which are involved in differentiation and induction to bone and cartilage, together with mechanical stimulation by LIPUS, are capable of regenerating hard tissues by self-cell-implantation *ex vivo*.

Taken together, the present study shows the ability, not only to exploit a novel technique on dental-implant therapy, but also to enrich patients' quality of life (QOL).

## Key Words

Dental-Implant, Bone Regeneration, Scaffold

## 1. 研究開始当初の背景

日常歯科診療において欠損補綴を可撤式義歯で行う際の代替治療としてインプラント治療を選択肢の一つに加えなければならない時代になった。昨今では、インプラントを短期間、且つ部位を問わずに植立し、患者の QOL をより考慮した治療へと変革が進んでいる。

その一つに、インプラント埋入後の免荷期間を従来のプロトコルより短縮した【即時付加】・【早期荷重】を可能とするために、インプラント周囲骨の形成を如何に促進させるかが鍵となる。

しかし、実際には骨リモデリング活性の低下している高齢者や上顎洞および下歯槽管への埋入距離の獲得のため人工骨（アパタイト）を用いた症例が多く、早期荷重を難しくしている。インプラント治療の適応症を拡大するためにも、リモデリングの行われている新生骨がインプラント周囲に必須と云える。

## 2. 研究の目的

安全で且つ効果的に骨を造成するために、低出力超音波(LIPUS)と幾何学的側面を考慮した scaffold の応用を検討した。

## 3. 研究の方法

炭酸アパタイトに直径 300~400 $\mu\text{m}$  のポアを付与することにより、骨芽細胞の誘導および骨形成能を活性化し、長期的に安定したリモデリングを可能にする scaffold を作成する。そして、LIPUS を併用することにより、サイトカインを刺激し骨芽細胞や軟骨細胞の増殖を促し、骨形成を促進させる。

## 4. 研究成果

まず、*in vitro*において、ヒト脂肪幹細胞を、炭酸アパタイト scaffold ( $\phi=300\ \mu\text{m}$ ) 上で培養し、骨芽細胞様細胞あるいは、軟骨細胞様細胞への分化を試みた。

10%ウシ胎児血清 (FBS) 血清のみ存在下のコントロール群では、分化誘導は困難であった。次に、デキサメタゾン、L-アスコルビン酸、 $\beta$ -グリセロリン酸、BMP-2、BMP-4、および BMP-7 と 10% FBS の共存下で、脂肪幹細胞を培養した。すると、PT-PCR 法によって、PPAR $\gamma$ 遺伝子 (脂肪細胞特異的マーカー) の発現は減少し、一方、Runx2、Osterix および、Sox9 (骨芽細胞および軟骨細胞特異的マーカー) 遺伝子の発現の上昇が見られた。同様に、I 型コラーゲンおよび、II 型コラーゲン遺伝子の発現の上昇も見られた。さらに、細胞形態は未分化間様細胞の特徴を示す紡錘形から、骨芽細胞あるいは軟骨

細胞様の特徴を示す多角形細胞への変化が見られた。細胞組織化学的にも、アリザリンレッド染色 (リン酸カルシウムの沈着)、トルイジンブルー染色 (プロテオリカンの蓄積)、が鮮明となり、アルカリフォスファターゼ活性染色の上昇が見られた。

加えて、以上の結果は、新規作成した LIPUS による機械的刺激を併用することにより、より上昇する傾向が確認された。

これらの結果は、炭酸アパタイト scaffold と骨および軟骨の分化誘導に関与する増殖因子 (化学的刺激)、さらに、LIPUS による機械的刺激との何らかの相乗的刺激によって、自家細胞の *ex vivo*における硬組織再生の可能性を示唆するものである。ただし、分子生物学的、あるいは細胞生物学的に、これらの効果の作用機序は未だ不明であり、今後の検討すべき課題である。

なお、本研究の結果は、本年度の学会に発表予定であり、同様に、論文も投稿準備中である。

## 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤秀寿 (ITO HIDETOSHI)

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし