

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09988

研究課題名(和文)リン酸オクタカルシウム・コラーゲンとiPS細胞を用いた顎骨再建治療の新機軸

研究課題名(英文) New innovation of jaw bone reconstruction using octacalciumphosphate/collagen composite and iPS cells

研究代表者

高橋 哲 (Takahashi, Tetsu)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：60226850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：自家骨を採取することなく大規模な顎骨欠損をリン酸オクタカルシウム(OCP)・コラーゲンとiPS細胞を用いた新しい顎骨再建方法を確認するべく、iPS細胞とOCPを含む各種骨補填材と3次元スフェロイド培養を行った。その結果、既存の -TCP、ハイドロキシアパタイト、無添加のコントロールと比較してサイズの大きいスフェロイドの形成がみられ、iPS細胞とリン酸オクタカルシウム(OCP)コラーゲンを用いた再建方法の確立の端緒を開くことができた。今後は実験動物を用いたin vivoでの本方法の検証実験が必要であると思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リン酸オクタカルシウム(OCP)・コラーゲンは新しい骨補填材として歯槽骨の再建に使われているが、iPS細胞と組み合わせることで、さらに大規模な顎骨再建に用いることが示唆され、外傷、腫瘍などによって生じた顎骨欠損に対し、自家骨を採取することなく再建が可能になり、自家骨採取などに伴う長期間の入院、術後の歩行障害などの後遺症を回避でき患者の肉体的、精神的な負担を大幅に軽減することができることが考えられた。また入院などの期間を回避することで医療経済学的にも大きな貢献ができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to establish a new method for jawbone reconstruction using octacalcium phosphate (OCP)-collagen and iPS cells without harvesting autologous bone, we conducted three-dimensional spheroid culture with various bone graft materials containing iPS cells and OCP. As a result, we observed the formation of larger spheroids compared to existing -TCP, hydroxyapatite, and the untreated control. This opened the door to establishing a reconstruction method using iPS cells and octacalcium phosphate (OCP)-collagen. It was concluded that further validation experiments in vivo using experimental animals are necessary in the future.

研究分野：口腔外科学

キーワード：顎骨再建 リン酸オクタカルシウム iPS細胞 3次元スフェロイド培養 -TCP ハイドロキシアパタイト

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍切除に伴う骨欠損などに対して、自家骨を用いた骨組織の再建が一般的である。その際には、腸骨、腓骨といった他部位からの骨採取が必要となり、本来の疾患とは無関係な二次的な部位に侵襲を加えることが必要である。そのため、手術時間も長時間を要し、また腸骨や腓骨などの骨採取部位によっては術後の歩行障害を伴うことから、治療に要する入院期間が長期にわたっている。骨組織の再建以外では、チタンプレートによる再建法も広く行われているが、顎骨形態の回復には有意義だが、顎骨とともに失われた歯牙に対する咬合の回復法は義歯のみとなっている。骨組織で再建された場合には、インプラント治療による咬合の回復が可能であり、患者の生活の質も向上する。近年では、腫瘍切除や、先天性疾患に伴う歯牙欠損に対しては、インプラント治療が広範囲顎骨支持装置として保険治療が適用されている。このため、現在の臨床において、顎骨の欠損には骨組織による再建が不可欠であると。しかし大規模な骨欠損に対しては腸骨、腓骨などの自家骨の移植が必ず伴う。歯槽骨の欠損部に対する市販骨補填材料としては、HA や β -TCP などのリン酸カルシウム材料や、ウシなどの骨を用いた異種骨が挙げられるが、それら材料のみでは大規模な顎骨欠損の修復は不可能である。新規骨補填材料として OCP/Collagen が挙げられ、これまでの市販骨補填材料と比較して、骨再生能と生体内吸収性が有意に優れていることが明らかになっている。われわれはこれまで、OCP/Col を用い、口腔外科領域における顎骨欠損モデルとして、大型動物であるイヌを用い人工的顎裂、垂直的な下顎骨の辺縁切除モデルを作成し、OCP/Col は他の β -TCP や破イドロキシアパタイト (HA) に比較し、優れた骨再生能をもち、これら人工的顎裂や下顎骨の辺縁切除モデルの再建には応用可能であることを示してきた。しかしさらに大規模な下顎骨の区域切除モデルを持っていた研究に老いては、OCP/Col のみでは顎骨再建は難しく、OCP/Collagen での顎骨再建に限界があることも明らかになった。そこで再生医療を応用した細胞導入の必要性から、OCP/Collagen に未分化細胞を組み合わせることにより、大きな顎骨欠損部に対して、自家骨に代わり得る骨補填材料の作製が可能になるという仮説をたてた。多分化能と無限の増殖能をもち iPS 細胞は再生医療の細胞源として期待されており、現在は免疫拒絶反応を抑えて多くの患者に対する移植を可能とする HLA (ヒト白血球抗原) をホモ接合体として持つドナーから作製した iPS 細胞株のストック事業が進められている。これらの背景から、今回は OCP/Col と iPS 細胞を用いた大規模な骨再生の可能性を探ることを目的として研究を行った。

2. 研究の目的

OCP/Collagen と iPS 細胞とを組み合わせた in vitro の 3 次元培養において骨形成を検出し、本方法の大規模顎骨欠損への応用の可能性を調べること。

3. 研究の方法

マウス歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞 (iPSC) を 10cm dish で浮遊培養し、胚葉体を形成し、その後 6well plate に播種し、骨芽細胞様細胞に分化させた。酸素透過型培養器 (oxy chip) および非酸素透過型培養器 (non-oxy chip) を作製し、それぞれの培養器で培養した。またリン酸カルシウム (ハイドロキシアパタイト (HA), β -リン酸三カルシウム (β -TCP), OCP) 共存下で iPSC を oxy chip 上で培養した。培養期間は 7 日, 14 日, 21 日とし、スフェロイドの直径, DNA 量, ALP 活性, 培地の pH, Ca²⁺濃度, 無機リン酸 (Pi) イオン濃度を測定した。

4. 研究成果

Oxy chip では non-oxy chip と比較して直径の大きなスフェロイドが均一に形成された。また oxy chip で培養したスフェロイドは経時的に増大の傾向を認めたが、リン酸カルシウムの共存の有無やその結晶相による差は認められなかった。iPSC 単独での培養では、oxy chip 群では non-oxy chip 群と比較して DNA 量, ALP 活性はどちらも有意に増加した。また、リン酸カルシウム共存下の oxy-chip での培養 14 日後では、ALP 活性は、iPSC 単独で培養した群と比較して OCP 群で有意に増加した、また、OCP 群の ALP 活性は、HA 群, β -TCP 群と比較して高値を示す傾向を認めた。Oxy chip 群では non-oxy chip 群と比較して pH が高くなる傾向を認めた。また oxy chip においてリン酸カルシウム共存下で培養した群では iPSC のみ培養した群と比較して pH が高くなる傾向を認めた。Oxy chip 群では non-oxy chip 群と比較して Ca²⁺濃度は低値を示し、Pi イ

オン濃度は高値を示す傾向を認めた。またリン酸カルシウム共存下で培養した群では iPSC のみを培養した群と比較して Ca^{2+} 濃度は低値を示し、 P_i イオン濃度は高値を示す傾向を認めたがリン酸カルシウムの種類による差は認めなかった。

以上の結果から、iPSC を OCP 共存下で oxy chip に 3 次元培養することで、酸素供給および OCP との複合化により、iPSC スフェロイドの高い骨芽細胞分化の結果が得られた。

これらの結果から、OCP 存在下に iPSC 細胞に由来する骨芽細胞様細胞の培養条件で細胞スフェロイドを形成することができ、より多くの細胞形成ができた。このことは OCP/Col と iPSC 細胞の 3 次元培養により大規模な顎骨欠損を自家骨に頼らず再建できる方法が切り開かれたと考えている。iPSC と OCP/Col を用いた大規模な顎骨欠損の再建方法を確立するために、今後は大規模動物を用いた *in vivo* での検証が必要であると考えられ、さらなる研究を継続して行っていく所存である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Xianchen Liu, Yukari Shiwaku, Ryo Hamai, Kaori Tsuchiya, Tetsu Takahashi, Osamu Suzuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Effect of octacalcium phosphate crystals on the osteogenic differentiation of tendon stem/progenitor cells in vitro	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 1235-1235
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24021235	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kei-ichiro Miura, Miho Sasaki, Seigo Ohba, Sawako Noda, Misa Sumi, Shinji Kamakura, Tetsu Takahashi, Izumi Asahina	4. 巻 16
2. 論文標題 Long-term clinical and radiographic evaluation after maxillary sinus floor augmentation with octacalcium phosphate-collagen composite: A retrospective case control series study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of tissue engineering and regenerative medicine	6. 最初と最後の頁 621-633
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/term.3301	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 松井桂子, 高橋 哲, 川井 忠, 野上晋之介, 山内健介	4. 巻 47
2. 論文標題 リン酸オクタカルシウム・コラーゲン複合体（OCP/Col）埋入顎裂部に形成された骨架橋への犬歯萌出症例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本口蓋裂学会雑誌	6. 最初と最後の頁 45-53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsui Keiko, Kawai Tadashi, Ezoe Yushi, Yanagisawa Toshiki, Takahashi Tetsu, Kamakura Shinji	4. 巻 15
2. 論文標題 Segmental Bone Reconstruction by Octacalcium Phosphate Collagen Composites with Teriparatide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.tea.2020.0150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kouketsu A, Matsui K, Kawai T, Ezoe Y, Yanagisawa T, Yasuda A, Takahashi T, Kamakura S.	4. 巻 14
2. 論文標題 Octacalcium phosphate collagen composite stimulates the expression and activity of osteogenic factors to promote bone regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Tissue Eng Regen Med	6. 最初と最後の頁 99-107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/term.2969	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawai T, Kamakura S, Matsui K, Fukuda M, Takano H, Iino M, Ishikawa S, Kawana H, Soma T, Imamura E, Kizu H, Michibata A, Asahina I, Miura K, Nakamura N, Kibe T, Suzuki O, Takahashi T	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinical study of octacalcium phosphate and collagen in oral and maxillofacial surgery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Tissue Eng	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2041731419896449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 10.Sasaki T, Niizuma K, Kanoke A, Matsui K, Ogita S, Rashad S, Kawai T, Watanabe M, Takahashi T, Kamakura S, Tominaga T	4. 巻 6
2. 論文標題 Octacalcium phosphate collagen composites (OCP/Col) enhance bone regeneration in rat model of skull defect with the defect of dura	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e03347	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 松井桂子, 高橋 哲	4. 巻 45
2. 論文標題 コラーゲンを活用した人工骨「ボナーク」の開発と臨床応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dental Diamond	6. 最初と最後の頁 100-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori Y, Hamai R, Aizawa T, Suzuki O	4. 巻 260
2. 論文標題 Impact of octacalcium phosphate/gelatin (OCP/Gel) composite on bone remair in refractory bone defects	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 245-252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.2023.J040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki O, Hamai R, Sakai S	4. 巻 158
2. 論文標題 The material design of octacalcium phosphate bone substitute: increased dissolution and osteogenecity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2023.02.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 松井桂子、高橋 哲、川井 忠、江副祐史、鎌倉慎治
2. 発表標題 顎裂部自家骨移植の代替材料リン酸オクタカルシウム・コラーゲン複合体の治療効果
3. 学会等名 第65回公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会 (Web開催), 2020/11/13~12/15, 名古屋
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齊藤志都・塩飽由香利・濱井 瞭・長谷川智香・網塚憲生・高橋 哲・鈴木 治
2. 発表標題 リン酸八カルシウム (OCP) が新生骨基質の骨細胞分化に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会, 2021/3/11
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齊藤志都・塩飽由香利・濱井瞭・長谷川智香・網塚憲生・高橋哲・鈴木治
2. 発表標題 リン酸八カルシウム（OCP）表面に形成された骨基質と骨細胞の免疫組織化学的・形態学的検討
3. 学会等名 東北骨代謝・骨粗鬆症研究会， 2021/2/6， web開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松井桂子、高橋 哲
2. 発表標題 自家骨移植代替としてOCP/CoIを使用した顎裂閉鎖
3. 学会等名 第44回日本口蓋裂学会総会・学術集会， 2020/6/4-5， 学会誌 紙面開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅井優生、濱井 瞭、塩飽由香利、穴田貴久、土屋香織、但野愛美、山内健介、高橋 哲、江草 宏、鈴木 治
2. 発表標題 リン酸八カルシウムの複合化がiPS細胞スフェロイドの骨分化に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第81回日本歯科理工学会学術大会． 2023/4/15， 東京
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅井優生、濱井 瞭、塩飽由香利、穴田貴久、土屋香織、但野愛美、山内健介、高橋 哲、江草 宏、鈴木 治
2. 発表標題 リン酸八カルシウム/iPS細胞ハイブリッドスフェロイドの3D培養による骨分化評価
3. 学会等名 第45回日本バイオマテリアル学会， 2023/11/6， 神戸
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅井優生、濱井 瞭、塩飽由香利、穴田貴久、土屋香織、山内健介、高橋 哲、江草 宏、鈴木 治
2. 発表標題 リン酸カルシウムの複合化が及ぼすiPSCスフェロイドの応答性の評価
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会, 2024/3/21, 新潟
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Tetsu Takahashi
2. 発表標題 Use of octacalcium phosphate and collagen composite (Bonarc) in oral and maxillfacial surgery
3. 学会等名 Takao Forum of OMFS, 2022/11/19, Kaohsiung, Taiwan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tetsu Takahashi
2. 発表標題 Use of Octacalcium/collagen composite (OCP/Col) for jaw bone reconstruction
3. 学会等名 47th Annual conference of Association of Oral and Maxillofacial Surgeons of India, 2023/11/23, Dehli, India (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tetsu Takahashi
2. 発表標題 Bony reconstruction by bone regeneration using octacalcum (OCP) and collagen
3. 学会等名 3rd South Asian Society of Oral and Maxillofacial SImplants, 2022/12/21, Ahmedabad, India (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 哲
2. 発表標題 新規骨補填材Bonarcのインプラント治療への応用
3. 学会等名 第51回公益社団法人日本口腔インプラント学会, 2021/10/23, 広島 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	岩間 亮介 (Iwama Ryosuke) (20866628)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	江草 宏 (Egusa Hiroshi) (30379078)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	鈴木 治 (Suzuki Osamu) (60374948)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	鎌倉 慎治 (Kamakura Shinji) (80224640)	東北大学・医工学研究科・教授 (11301)	

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