

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10089

研究課題名(和文) 亜鉛徐放性チタンと歯髄幹細胞の骨形成メカニズムの解明と顎骨再建への応用

研究課題名(英文) Elucidation of bone formation mechanism of sustained-release zinc titanium and dental pulp stem cells and their application to jaw bone reconstruction

研究代表者

遊佐 和之 (Yusa, Kazuyuki)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：80636960

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)：顎顔面領域における腫瘍等に起因する広範な顎骨欠損に対して顎骨再建およびデンタルインプラントを用いた咬合再建が行われる。申請者らはこれらの治療が顎骨欠損患者の機能回復およびQOLの回復に寄与する事を報告してきた。

一方で自家骨移植による顎骨再建は、採取できる骨量、ドナーサイトへの侵襲など様々な問題を抱えており、再生医療学的アプローチによる低侵襲な顎骨再建法の開発への期待が高まっている。本研究では申請者らが開発した亜鉛修飾処理を施した亜鉛徐放性チタンメッシュシートおよび歯髄幹細胞を用いた顎骨再建法の構築を目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行により、低侵襲かつ安全性を有した顎骨再建法の構築に貢献できると考えられる。さらに、現在までに行ってきた予備的研究では早期の骨芽細胞分化が確認されており臨床応用が可能となれば、治療期間の短縮により患者の身体的・経済的負担の改善にも寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Jawbone and occlusal reconstruction using dental implants are performed to address extensive jaw defects caused by tumors in the oral and maxillofacial region. Our previous reports have shown that these treatments can restore the function and quality of life of patients with jaw defects.

However, autogenous bone grafting for jawbone reconstruction has several issues, such as the limited amount of available bone and donor site invasion. Consequently, there is a growing need for minimally invasive jawbone reconstruction approaches that utilize regenerative medicine. The aims of this study are to establish a jawbone reconstruction method using zinc-modified titanium mesh sheets and dental pulp stem cells.

研究分野：口腔外科学

キーワード：顎骨再建 骨芽細胞 幹細胞 再生医学 分子生物学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域における腫瘍等に起因する広範な顎骨欠損に対して顎骨再建およびデンタルインプラントを用いた咬合再建が行われる。申請者らはこれらの治療が顎骨欠損患者の機能回復および QOL の回復に寄与する事を報告してきた(Yusa K et al. Evaluation of quality of life and masticatory function in patients treated with mandibular reconstruction followed by occlusal rehabilitation with dental implants: A preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol* 2017, Yusa K et al. Rehabilitation after maxillectomy in patients with implant-retained obturator: a preliminary report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2020, Yusa K et al. A case of glandular odontogenic cyst with mandibular segmental resection and secondary reconstruction. *Oral Sci Int* 2020, Yusa K et al. Quality of life and masticatory function assessment in a patient with immediate alveolar bone reconstruction using particulate cancellous bone marrow and rehabilitation with dental implant: a case report *SN Compr Clin Med* 2022)。

一方で自家骨移植による顎骨再建は、採取できる骨量、移植後の骨吸収、ドナーサイトへの侵襲など様々な問題を抱えており、再生医療学的アプローチによる低侵襲な顎骨再建法の開発への期待が高まっている。

2. 研究の目的

申請者らはこれまで生体内微量元素の1つである亜鉛の骨芽細胞分化、骨形成促進作用に着目し研究を行ってきた。その中で、亜鉛修飾処理を行った亜鉛徐放性チタンインプラントを作製しウサギ大腿骨へ埋入実験を行った所、骨接着性が増強される事を報告するとともに(Alvarez K, Fukuda M, Yamamoto O. Titanium Implants after alkali heating treatment with a $[Zn(OH)_4]^{2-}$ complex: analysis of interfacial bond strength using push-out tests. *Clin Implant Dent Res* 2010)、亜鉛徐放性チタンから徐放された亜鉛イオンが骨芽細胞分化を促進する事を種々の成体幹細胞を用いた培養系において明らかにしてきた(Yusa K et al. In vitro prominent bone regeneration by release zinc ion from Zn-modified implant. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, Yusa K et al. Eluted zinc ions stimulate osteoblast differentiation and mineralization in human dental pulp stem cells for bone tissue engineering. *Arch Oral Biol* 2016)。さらに予備的検討として、ラット頭蓋骨にトレフィンバーを用いて径 8mm 大の骨欠損を形成しコラーゲンスポンジを骨欠損部に充填し亜鉛徐放性チタンメッシュシートで被覆し骨形成能を観察したが、細胞成分を含まない実験系ではチタンメッシュシート群と亜鉛徐放性チタンメッシュシート群で骨再生能に有意な差はみられなかった。

そこで本研究では細胞成分が重要となると考えられた事から、申請者らが開発した亜鉛修飾

処理を施した亜鉛徐放性チタンメッシュシートおよび歯髄幹細胞を用いた顎骨再建法の構築を目的として *in vitro* における骨芽細胞分化促進作用および分化メカニズムの解析と *in vivo* における骨欠損部での骨形成能に関して基礎的研究を行うことを目的とした。本研究結果から得られるアウトプットは骨再生を応用した新規顎骨再建法の臨床応用につながる事が期待された。

3. 研究の方法

材料として純度 99.5% のチタンディスクおよびチタンメッシュを使用する。また、未処理のチタンディスクおよびチタンメッシュをコントロールとして使用する。表面処理はテトラヒドロキシ亜鉛酸錯体 ($\text{Zn}(\text{OH})_4^{2-}$) を含む水溶液にチタンメッシュプレートおよびチタンディスクを浸漬して亜鉛修飾処理を行う ($\text{NaOH} + \text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Zn}(\text{OH})_2 \downarrow + \text{NaOH} \rightarrow \text{Zn}(\text{OH})_4^{2-}$) (Alvarez K, Fukuda M, Yamamoto O. *Clin Implant Dent Relat Res* 2010)。24 時間表面処理を行った後、超純水中へ 72 時間浸漬し、徐放性亜鉛イオンからなる亜鉛溶出液を精製する。亜鉛溶出液中の亜鉛イオンの濃度測定は誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES; inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry) を用いて行う。

細胞は CD44、CD73 陽性かつ CD14、CD45 陰性を確認した歯髄幹細胞を用い亜鉛徐放性チタンディスクおよびコントロール上に播種し標準培地に 0.28mM アスコルビン酸、10mM β グリセロリン酸、100mM デキサメタゾン を添加した骨芽細胞誘導培地により骨芽細胞分化の誘導を行う。

細胞増殖に関しては MTT アッセイを用いて評価した。また、骨芽細胞分化に関しては骨芽細胞分化マーカーの mRNA を real-time PCR 法で、基質石灰化をアリザリンレッド S 染色で評価した。さらに BMP/TGF- β シグナルに関しては Smad1、Smad4、p-Smad1/5/8 を Wnt シグナルに関しては Wnt3a、TAZ、LEF1 のタンパク発現をウエスタンブロットで検索した。

続いて *in vivo* における検討のため、ラット頭蓋骨にトレフィンバーを用いて径 8mm 大の骨欠損を形成する。この骨欠損に歯髄幹細胞を播種したコラーゲンスポンジを充填し亜鉛徐放性のチタンメッシュプレートおよびコントロールのチタンメッシュプレートにより被覆し、移植後 4 週で試料を摘出し骨再生を組織学的に評価した。

4. 研究成果

亜鉛溶出液の濃度測定に関しては 7 日目前後でプラトーに達することが確認された。亜鉛徐放性チタンディスクおよびコントロール上での歯髄幹細胞の培養において細胞増殖に有意な差は確認されなかった。骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現に関して培養 3 日目、5 日目、7 日目においてタイプ 1 コラーゲン、BMP2、アルカリフォスファターゼ、オステオポンチン、オステオカルシン、骨シアロプロテイン等の骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現を real-time PCR 法で検索した所、いずれの分化マーカーも亜鉛徐放性チタンディスク上での培養を行った細胞において発現が増強することが確認された。アルカリフォスファターゼ活性の測定およびアルカリフォスファターゼ染色を追加で行った所、同様の傾向が確認された。さらにアリザリンレッド S 染色では亜鉛徐放性チタンディスク上での培養を行った細胞では早期から石灰化が確認され、サンプルを溶解し吸光度測定を行った所、有意な基質石灰化の増強が確認された。

以上の結果を細胞レベルにおける骨形成能の指標として総合的に評価し、*in vivo* への展開を

試みたが、手術手技や条件設定の問題から安定した結果に繋がらなかったため、今後は人工骨との併用や吸収性メンブレンの使用など条件設定を見直す方針となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yusa Kazuyuki, Ishikawa Shigeo, Hemmi Tomoharu, Kasuya Satoshi, Okuyama Naoki, Kunii Shunsuke, Suzuki Nagiko, Iino Mitsuyoshi	4. 巻 124
2. 論文標題 Evaluation of radiographic characteristics and surgical removal of 147 mesiodens	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 101427 ~ 101427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jormas.2023.101427	査読の有無 無
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 Ishikawa Shigeo, Morikane Keita, Konta Tsuneo, Ueda Shohei, Yusa Kazuyuki, Okuyama Naoki, Kasuya Satoshi, Kunii Shunsuke, Suzuki Nagiko, Eguch Moe, Maehara Kaori, Iino Mitsuyoshi	4. 巻 123
2. 論文標題 Association between the duration of antibiotic prophylaxis and surgical site infection after orthognathic surgery in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 e936 ~ e939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jormas.2022.06.009	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 Ishikawa Shigeo, Makino Naohiko, Togashi Hitoshi, Ito Nanami, Tsuya Atsushi, Hayasaka Makiko, Konta Tsuneo, Okuyama Naoki, Yusa Kazuyuki, Iino Mitsuyoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 A Cross-Sectional Survey on the Association between Dental Health Conditions and University Personality Inventory Scores among University Students: A Single-Center Study in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 4622 ~ 4622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph19084622	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 Yusa Kazuyuki, Ishikawa Shigeo, Takagi Akira, Kunii Shunsuke, Iino Mitsuyoshi	4. 巻 123
2. 論文標題 Bone marrow space volume of the mandible influencing intraoperative blood loss in bilateral sagittal split osteotomy: A pilot Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 429 ~ 433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jormas.2021.10.010	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 Yusa Kazuyuki, Ishikawa Shigeo, Hemmi Tomoharu, Ueda Shouhei, Iino Mitsuyoshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Quality of Life and Masticatory Function Assessment in a Patient with Immediate Alveolar Bone Reconstruction Using Particulate Cancellous Bone Marrow and Rehabilitation with Dental Implant: a Case Report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 SN Comprehensive Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s42399-022-01236-8	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 Ishikawa Shigeo, Morikane Keita, Konta Tsuneo, Ueda Shohei, Yusa Kazuyuki, Okuyama Naoki, Kasuya Satoshi, Kunii Shunsuke, Suzuki Nagiko, Eguch Moe, Maehara Kaori, Iino Mitsuyoshi	4. 巻 123
2. 論文標題 Association between the duration of antibiotic prophylaxis and surgical site infection after orthognathic surgery in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 e936 ~ e939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jormas.2022.06.009	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 Ishikawa Shigeo, Makino Naohiko, Togashi Hitoshi, Ito Nanami, Tsuya Atsushi, Hayasaka Makiko, Konta Tsuneo, Okuyama Naoki, Yusa Kazuyuki, Iino Mitsuyoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 A Cross-Sectional Survey on the Association between Dental Health Conditions and University Personality Inventory Scores among University Students: A Single-Center Study in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 4622 ~ 4622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph19084622	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 Yusa Kazuyuki, Ishikawa Shigeo, Hemmi Tomoharu, Takano Hiroshi, Fukuda Masayuki, Iino Mitsuyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Influences of Compressive Force and Zoledronic Acid on Osteoblast Proliferation and Differentiation: An In Vitro Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 11273 ~ 11273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app112311273	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 Yusa Kazuyuki、Ishikawa Shigeo、Takagi Akira、Kunii Shunsuke、Iino Mitsuyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Bone marrow space volume of the mandible influencing intraoperative blood loss in bilateral sagittal split osteotomy: A pilot Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jormas.2021.10.010	査読の有無 無
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 Ishikawa Shigeo、Sugimoto Masahiro、Konta Tsuneo、Kitabatake Kenichiro、Ueda Shohei、Edamatsu Kaoru、Okuyama Naoki、Yusa Kazuyuki、Iino Mitsuyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Salivary Metabolomics for Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2021.789248	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 Ishikawa Shigeo、Yusa Kazuyuki、Edamatsu Kaoru、Ueda Shohei、Sugano Ayako、Iino Mitsuyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Reconstruction after hemimandibulectomy by a titanium mesh and particulate cancellous bone and marrow harvested from posterior ilia: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Implantology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1563/aaid-joi-D-21-00001	査読の有無 無
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 Ishikawa Shigeo、Yamamori Iku、Takamori Satoshi、Kitabatake Kenichiro、Edamatsu Kaoru、Sugano Ayako、Oizumi Hiroyuki、Kato Hirohisa、Suzuki Jun、Sato Kaito、Yusa Kazuyuki、Sadahiro Mitsuaki、Iino Mitsuyoshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Evaluation of effects of perioperative oral care intervention on hospitalization stay and postoperative infection in patients undergoing lung cancer intervention	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Supportive Care in Cancer	6. 最初と最後の頁 135 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00520-020-05450-9	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 Ishikawa Shigeo, Kitabatake Kenichiro, Edamatsu Kaoru, Sugano Ayako, Yusa Kazuyuki, Iino Mitsuyoshi	4. 巻 78
2. 論文標題 Evaluation of a Semi-Solidifying Liquid Formula for Nasogastric Tube Feeding After Oral and Maxillofacial Surgery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 663.e1 ~ 663.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joms.2019.11.025	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 Yusa Kazuyuki, Ishikawa Shigeo, Yamanouchi Hideyuki, Edamatsu Kaoru, Hemmi Tomoharu, Ueda Shouhei, Kabasawa Takanobu, Iino Mitsuyoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 A case of glandular odontogenic cyst with mandibular segmental resection and secondary reconstruction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Science International	6. 最初と最後の頁 196 ~ 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/osi2.1056	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0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 (公社)日本顎顔面インプラント学会編 (第4章3-5 遊佐和之、飯野光喜)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ゼニス出版	5. 総ページ数 5
3. 書名 顎骨再建とインプラント治療による治療指針 広範囲顎骨支持型装置治療マニュアル.	

〔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	山本 修 (Yamamoto Osamu) (00230540)	山形大学・大学院理工学研究科・教授 (11501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	福田 雅幸 (Fukuda Masayuki) (20272049)	秋田大学・医学部附属病院・准教授 (11401)	

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