

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21890160

研究課題名（和文） bFGF を用いたポリリン酸結合型人工骨による骨形成促進の解明

研究課題名（英文） Effect of combined application of bFGF and inorganic polyphosphate-adsorbed hydroxyapatite for initial bone regeneration

研究代表者

森田 晃司 (MORITA KOJI)

広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号：30555149

研究成果の概要（和文）：本研究では、bFGF とポリリン酸とを結合させた人工骨を応用することで細胞増殖および石灰化により骨形成が促進されることが示唆された。さらに、このことから、bFGF とポリリン酸とを結合させた人工骨の応用が、臨床で使用される骨移植材として新しい安心安全で確実に骨再生を獲得できる材料となる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：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
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：補綴系歯学

科研費の分科・細目：補綴系歯学

キーワード：再生医療、歯学、生体材料

1. 研究開始当初の背景

口腔領域に小規模な骨欠損が生じた場合、通常生体の修復機能により修復・再生が行われるが、腫瘍や損傷などの原因により大規模な骨欠損が生じてしまうと生理的な再生能ではその回復ができず、骨移植が適用される。また、歯牙欠損の補綴処置としてインプラント治療が現在行なわれているが、骨吸収の大き

な症例においては理想的な位置にインプラントを埋入できず、このような症例においては、骨移植材によるインプラント周囲の骨再生が必要となる。これらに用いる骨移植材料として、欧米では、牛骨から作製される Bio-oss[®] やヒト凍結脱灰乾燥骨が骨移植材として用いられているが、我が国では BSE 問題や未知の感染性などからこれらは薬事法で認可されていないため、もっぱら、患者自身の腸骨など

から採取される自家骨が用いられている。しかしながら、採取時の外科的侵襲や採取量が限られるなどの問題があり、自家骨に替わる新しい骨移植材、すなわち「人工骨の開発」が強く望まれている。

このような背景のもと、人工骨材料に生体内に存在する高分子であるポリリン酸の応用が注目されている。このポリリン酸は、組織再生に重要な成長因子である線維芽細胞成長因子 (basic Fibroblast Growth Factor, bFGF) を安定化させる作用や骨芽細胞の石灰化を促進させる作用を持つことが近年明らかとなっており、骨再生を促進させる効果が期待される。また、ポリリン酸は古くから食品添加物として用いられており、安全性に問題はない。そこで申請者は、ポリリン酸を連通多孔性ハイドロキシアパタイト (Interconnected Porous Calcium Hydroxyapatite, IP-CHA) に結合させることでハイドロキシアパタイトの持つ骨伝導性とポリリン酸の生理活性作用を併せ持つ新しい「**ポリリン酸結合型人工骨**」を着想した。

2. 研究の目的

「ポリリン酸結合型人工骨」はスカフォールドとしての連通多孔性アパタイト単体と比較して、骨形成をより促進することが明確となっている。しかしながら、骨形成促進のメカニズムについてはまだ不明のまま残されている。そこで、本研究の目的は、「ポリリン酸結合型人工骨」による骨形成促進のメカニズムを分析し、さらに、骨芽細胞の活動の効果的な時期で bFGF を作用させることによりポリリン酸の生理活性がさらに生かされ、より確実な骨形成ができる可能性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(*in vitro*)

骨形成促進メカニズムと bFGF 有効時期を決定する。

① bFGF+ポリリン酸添加群

② bFGF 添加群

③ポリリン酸添加群

④基礎培地のみ (コントロール)

の各①～④のディスク型細胞培養プレート上で MC3T3-E1 細胞を培養しアルカリフォスタファアーゼ (ALP)、オステオポンチン (OP)、オステオカルシン (OC) の発現量を測定した。

(*in vivo*)

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。

①bFGF を含浸させた IP-CHA

②25%人工骨

③bFGF を含浸させた 25%人工骨

④IP-CHA (コントロール)

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 は埋入前にスカフォールドに含浸させ作製した。実験動物にはニュージーランドホワイトラビットを用いた。実験動物の大腿骨部に規定の円柱状骨欠損 (直径 3 mm、高さ 5 mm) を 2 ヶ所形成し、同部に各条件の移植材をそれぞれ埋入した。埋入から、2、3 週後に動物を屠殺、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

MC3T3-E1細胞を基礎培地に播種したのち、① bFGF+ポリリン酸添加群 ② bFGF添加群 ③ポリリン酸添加群 ④基礎培地のみ (コントロール) に分け継代培養を行い、各期にお

ける細胞数および骨形成マーカーをRT-PCR法にて測定した。細胞数の測定結果では① bFGF + ポリリン酸添加群がコントロール群に対して有意に高い値を示し、bFGFによる細胞増殖作用およびポリリン酸によるbFGFの安定化作用が明らかとなった。骨分化マーカーの測定ではコントロール群に対して① bFGF + ポリリン酸添加群および③ポリリン酸添加群が有意に高い値を示した。これらの細胞実験の結果より、I : bFGFをポリリン酸が安定化することにより、細胞増殖を促進させた II : ポリリン酸添加群およびbFGF + ポリリン酸添加群が骨分化マーカーの発現を促進したが、ポリリン酸添加群が最も高い値を示した。以上より *in vitro*におけるbFGFおよびポリリン酸の相互作用の一端が解明された。この骨移植材の材料学的評価および骨形成の様相を *in vivo*にて検討した。IP-CHAに濃度25%のポリリン酸結合型人工骨(25%人工骨)を作製し、人工骨の表面構造をSEMにて観察したところ、IP-CHAと比較して構造的に変化はなく、三次元的構造を有していた。また、埋入2週および3週後の皮質骨欠損部における気孔内再生骨の骨面積率では、bFGFを含浸させた25%人工骨は良好な骨再生を観察できた。以上の結果から、濃度25%のポリリン酸を結合させた多孔性ハイドロキシアパタイトにbFGFを含浸させた「bFGF含有ポリリン酸結合型人工骨」は、骨形成を促進させる骨移植材である可能性が示唆された。

これらの結果より、「bFGF含有ポリリン酸結合型人工骨」は、骨形成を早期に促進するメカニズムの一端が明らかとなり、より予知性の高い人工骨による安心安全な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. Kubo T, Comparative evaluation of bone regeneration using spherical and irregularly shaped granules of interconnected porous hydroxyapatite. A beagle dog study, J Prosthodont Res, 査読あり、2011、55(2)、pp104-109

2. Morita K, Enhanced initial bone regeneration with inorganic polyphosphate-adsorbed hydroxyapatite, Acta Biomater, 査読あり、2010、6(7)、pp2808-2815

[学会発表] (計 8件)

1. Maretaningtias Dwi Ariani, Development of new bone graft material using carbonate apatite-chitosan composit, The 32nd Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials, 29 November 2010, Hiroshima City

2. 大上 博史、連通多孔性ハイドロキシアパタイト・インプラント複合体の新規開発の試み、第32回日本バイオマテリアル学会大会、2010. 11. 29、広島市

3. Maretaningtias Dwi Ariani, Fabrication and cell compatibility evaluation of newly developed carbonate apatite-chitosan scaffold for bone tissue engineering, 6th Meeting of Asian Academy of Osseointegration, 13 November 2010, Seoul Korea

4. Hiroshi Oue, New development of interconnected porous calcium hydroxyapatite/implant complex, 6th Meeting of Asian Academy of Osseointegration, 13 November 2010, Seoul Korea

5. Ayumu Matsuura, Cell proliferative ability of newly developed carbonate apatite-collagen sponges with some cytokines, 6th Meeting of Asian Academy of Osseointegration, 13 November 2010, Seoul Korea

6. 竹下 亮、実験的に露出させたインプラント周囲のGBRに対するポリリン酸吸着人工骨の効果、第40回日本口腔インプラント学

会学術大会、2010 9 18、札幌市

7. Morita K, Application of bFGF-gelatin hydrogel complex for bone regeneration around fenestrated implants, 5th Asian Academy of Osseointegration, 21 November 2009, Bali Indonesia

8. Ayumu Matsuura, Bone formation ability of a newly developed carbonate apatite collagen sponge scaffold, 5th Asian Academy of Osseointegration, 21 November 2009, Bali Indonesia

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 晃司 (MORITA KOJI)

広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号：30555149

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：