

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17097

研究課題名（和文）広範囲顎骨欠損に対するメカノバイオロジー最適化スキャフォールドの開発

研究課題名（英文）Development of a mechanobiology-optimized scaffold for critical-size jaw bone defects

研究代表者

宮下 英高（Miyashita, Hidetaka）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：20445290

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、スキャフォールドの材料やそれらを3次元造形した後の物性が、細胞挙動および骨再生に与える影響を検証した。スキャフォールドの基盤材料としては、polycaprolactone (PCL) を設定し、材質、気孔径、および支柱径などの条件検討を実施し、機器によるメカニカルストレスが付与可能なスキャフォールドを作製した。その後、スキャフォールドに再現性高く圧縮刺激を与えられるようなチャンバーを作製し、MC3T3-E1をスキャフォールド上で培養し、メカニカルストレスによる細胞応答を観察した。引き続き、スキャフォールドを介したメカニカルストレスが細胞挙動に与える影響を解析予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

広範囲顎骨欠損に対する再建治療は未だ多くのメディカルアンメットニーズが存在する。これらの広範囲顎骨欠損に対する再建治療には自家骨を用いることが未だにゴールドスタンダードとされるが、患者負担軽減の観点より、人工材料を使用した新規治療法の開発が望まれている。しかしながら、広範囲顎骨欠損再建においては、強度の担保や長期的な生体安定性の向上など解決すべき点が多く、荷重部位の広範囲顎骨欠損に対する人工材料による再建方法は確立されていない。本研究により、人工材料を用いた顎骨再建を視野に入れた研究の基盤部分が確認され、今後の研究に向けた一つの成果を得た。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the influence of scaffold materials and their physical properties after three-dimensional printing on cell behavior and bone regeneration. Polycaprolactone (PCL) was chosen as the base material for the scaffold, and various parameters such as material composition, pore size, and strut diameter were examined to fabricate scaffolds capable of applying mechanical stress via equipment. Subsequently, a chamber was created to reproducibly apply compressive stimulation to the scaffold, and MC3T3-E1 cells were cultured on the scaffold to observe cellular responses to mechanical stress. Further analysis is planned to elucidate the effects of mechanical stress mediated by the scaffold on cell behavior.

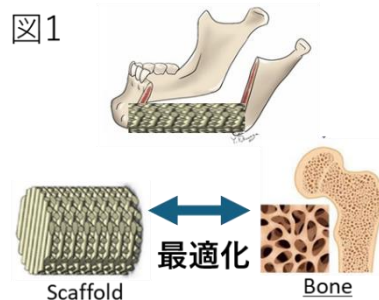
研究分野：口腔外科

キーワード：スキャホールド メカノバイオロジー 顎骨再建

## 1. 研究開始当初の背景

外傷、感染、および悪性腫瘍切除等に起因する広範囲顎骨欠損は、顔貌の変形や著しい咀嚼機能障害をきたし QOL の低下を招く。これらの広範囲顎骨欠損に対する治療は、自家骨を用いた再建術が世界的にゴールドスタンダードとされるが、骨採取部位への外科的侵襲や医療費の増加など改善すべき点が多く、未だ多くのメディカルアンメットニーズが存在する。下顎骨再建においては、腸骨や腓骨を用いた再建術が世界的に広く実施されるが、これら手術は、手術工程が複雑で、術者には経験に裏付けされた卓越した手術技術が求められる。しかしながら、我が国においては、手術技術の研鑽は on the job トレーニングに依存し、高度な技術を持つ外科医不足は深刻の度合いを増しており、術者の技量に依存しない人工材料を使用した新たな治療法の開発が望まれている (図 1)。

ハイドロキシアパタイトを代表とするリン酸カルシウムは、優れた骨伝導能を有し骨補填材として汎用されているが、賦形性および強度に乏しく広範囲の顎骨欠損にそのまま用いる事が出来ない。近年、CAD/CAM 技術を応用したカスタムメイド人工骨が開発され、頭蓋骨欠損症例における患者固有の骨形態を正確に再現することが可能となった。しかしながら、下顎骨区域切除後の広範囲顎骨欠損再建においては、強度の担保や長期的な生体安定性の向上など解決すべき点が多く、荷重部位の広範囲骨欠損に対する人工材料による再建方法は確立されていない。



広範囲骨欠損に対する既存研究は、足場材に間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) や、骨形成タンパク質などの増殖因子を添加し骨再生能を評価する「細胞の特性」に注目したものであった。近年、足場材の物性が MSC の細胞分化に影響を及ぼすことが示され、メカニカルストレスを感知し生化学的反応へと変換するメカノトランスダクションの機構も解明されつつある。これらメカノバイオロジー領域の研究成果は、細胞や成長因子に依存しない足場の物性制御による新たなスキャフォールド治療の可能性を示唆するものである。しかしながら、再生医療に用いられる多孔質スキャフォールドにおけるメカニカルストレスの役割については余り知られていない。よって、本研究では、細胞挙動に影響を与えるであろう、スキャフォールドの材質や物性に着眼し検証を進めることとした。

## 2. 研究の目的

現在臨床応用されているカスタムメイド人工骨の特性は、材料自体の物性や骨伝導能に依存しているものである。よって、本研究の目的は、スキャフォールドに使用される材料の性質やそれらを 3 次元造形した後の物性が、細胞挙動および骨再生に与える影響を検証し、人工材料による再建治療に有益な情報を得ることを目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、スキャフォールドを介したメカニカルストレスが細胞挙動に与える影響を解析するため、力学刺激培養実験を計画した。まず、最初にスキャフォールドの基盤となる材料を選定し、その後、気孔径、および支柱径などの条件検討を行う。その後、作製したスキャフォールドに対しメカニカルストレスを与えるための機器の条件を検討し、それらを用いて、力学刺激培養実験を実施した。

## 4. 研究成果

### ・スキャフォールドの選定

スキャフォールドの基盤材料としては、生分解性プラスチック製で再生医療研究における Scaffold (足場材) として広く用いられている polycaprolactone (PCL) を設定した。具体的には、3D Insert-PCL (3D Biotek 社) を基盤材料として選定し (図 2)、力学的負荷により造形されたスキャフォールドが伸展圧縮可能かつ細胞増殖が期待できる気孔径および支柱径を検討した。最終的に、気孔径を 700  $\mu\text{m}$ 、支柱径を 300  $\mu\text{m}$  に設定し、円柱形上のスキャフォールドを作製した。

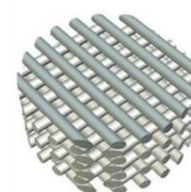


図2：3D Insert-PCL (Funakoshiホームページより抜粋)

### ・メカニカルストレスの付与

スキャフォールドに対するメカニカルストレスは、ネッパジーン株

式会社製 自動培養細胞伸展装置 NST-1400-04-R1 を用いて実施した。スキャフォールドに対し、長軸方向に再現性高く圧縮刺激を与えられるようなシリコン製のチャンバーを作製し、培養液と共にスキャフォールドを挿入し、周期的な圧刺激を付与する事とした(図3)。



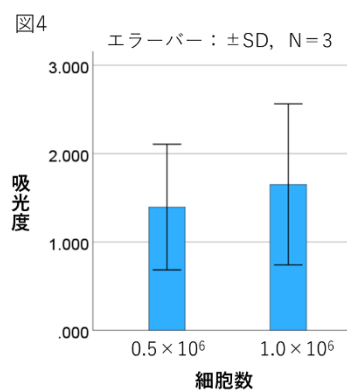
図3

#### ・力学刺激培養

本実験では MC3T3-E1 細胞を使用し、スキャフォールドに周期的な力学負荷を加える実験を実施した。異なる細胞数で、滴下法を用いて細胞をスキャフォールドの上にゆっくりと滴下して播種した。プレートは 96well プレートを用いた。7 日目に alamarBlue™ Cell Viability Reagent を用いて吸光度を測定したところ、生細胞数に違いはみられたものの、統計学的有意差は認めなかった(図4)。

スキャフォールド1個に対し、 $1.0 \times 10^6$ の細胞を滴下法で播種し、5日目に周期的なメカニカルストレスを3時間付与し、7日目に同様に細胞の活動性を評価したが、明らかな変化を確認することはできなかった。

スキャフォールドを用いた三次元培養系では、スキャフォールドの種類や播種の方法、使用する細胞数により生着率や細胞分布が大きく異なることが知られている。今後は、三次元培養における細胞増殖の非破壊的評価を確立していくとともに、スキャフォールドに対し、コラーゲンコーティングを実施するなどして細胞生着率を高めていく予定である。また、確実な細胞増殖を促すためのスキャフォールドの設計についても再検証を実施していく。さらに、初期の播種密度の検討や、細胞の増殖や分化応答に関与するであろう、細胞分布(密度)にも留意して実験を進めていく予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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