

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21030

研究課題名（和文）ラクトフェリンによる骨再生増進効果と臨床への応用

研究課題名（英文）Effect of lactoferrin on bone regeneration and clinical application

研究代表者

岩間 亮介（Iwama, Ryosuke）

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：20866628

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：ラクトフェリン（LF）を4週間全身投与したRat頭蓋骨にOCPコラーゲンを埋入、更にLF溶液に浸漬したOCPコラーゲンを埋入し、8週後に頭蓋骨を回収した。新生骨形成量を放射線学的に評価、またHE染色による組織学的評価を行った。LFを全身投与した群においては骨再生効果が一定に観察されたが、コントロール群との有意差を認めなかった。LF溶液にOCPコラーゲンを浸漬して埋入した群においてはコントロールと比較し新生骨形成量に有意差を認めなかった。免疫染色（Runx2, Osteocalcin）においても同様に、LFを腹腔内投与した群において陽性細胞が多く観察され、LFの効果により骨芽細胞の誘導が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔がんや顎骨骨髄炎などの治療に際し、顎骨再建を図ることがある。硬組織再建を行うことで、咬合機能獲得が可能となり、十分な咀嚼機能が得られる。現在最も信頼されている再建方法は、患者自身の骨を採取して骨欠損を補うといった自家骨移植である。自家骨を用いることにより、骨欠損部の良好な再建が可能であるが、採取する二次的な部位には原因疾患とは関係ない侵襲を加えることとなる。

本研究ではOCP/CoIとLF局所投与または全身投与を組み合わせることにより、更なる新生骨形成が得られるかということ、骨芽細胞や破骨細胞におよぼす影響を明らかにし、顎骨再建への臨床応用性を検討することを目的とする。

研究成果の概要（英文）：Rat skulls were intraperitoneally injected with lactoferrin for 4 weeks, implanted with OCP collagen, and further implanted with OCP collagen soaked in lactoferrin solution, and the skulls were retrieved 8 weeks later. The amount of new bone formation was evaluated radiologically by micro-CT and histologically by HE staining. The lactoferrin intraperitoneally administered group showed a constant bone regenerative effect, but there was no significant difference from the control group, while the group implanted with OCP collagen immersed in LF solution showed no significant difference in the amount of new bone formation compared to the control group.

Similarly, immunostaining (Runx2, Osteocalcin) showed more positive cells in the group treated with intraperitoneal LF, suggesting osteoblast induction by LF.

研究分野：骨再生医療

キーワード：リン酸オクタカルシウム 骨再生 ラクトフェリン

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は2014年4月～2018年3月まで、東北大学大学院 歯学研究科 顎顔面・口腔外科学講座に大学院生として所属し、顎口腔機能創建学講座と連携してリン酸オクタカルシウム(OCP)/Gelatin 複合体の骨形成能および細胞活性に関する研究を行った。2019年4月から東北大学病院に医員として所属し、臨床においては口腔外科領域全般の診療に加え、特に口腔がん治療や顎骨再建、デンタルインプラントによる咬合再建に従事した。口腔外科領域において、顎骨切除を伴う手術の頻度は一定あり、OCPが顎骨再建に応用可能な材料であれば、既存の顎骨再建法よりも侵襲が低く、機能障害の生じにくい治療法として確立できると考え、本研究の着想に至った。また、ラクトフェリン(LF)は入手が非常に容易でかつ安価であり、副作用となるような毒性がなく優れた費用対効果を期待できるため、本研究への応用に選択した。

## 2. 研究の目的

口腔がんや顎骨骨髓炎などの治療に際し、顎骨再建を必要となる場面が多くある。硬組織再建を行うことで、咬合機能獲得が可能となり、十分な咀嚼ができるようになる。現在最も信頼されている再建方法は、患者自身の骨を採取して骨欠損を補うといった自家骨移植である。腓骨や腸骨、肩甲骨などから遊離皮弁として、あるいは腸骨海綿骨細片を移植骨として用いることにより、骨欠損部の良好な再建が可能であるが、採取する部位には原因疾患とは関係ない侵襲を加えることとなる。

本研究ではOCP/CoIとLF局所投与または全身投与を組み合わせることにより、更なる新生骨形成が得られるかということ、骨芽細胞や破骨細胞におよぼす影響を明らかにし、顎骨再建への臨床応用性を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物実験

Wistar ラット(12週齢、オス)を使用する。東北大学動物実験施設の示すガイドラインに準じて実験動物に全身麻酔を行った後、頭頂部皮膚・骨膜を切開し、頭蓋冠を明示する。直径9mmのトレフィンバーを用いて円形の骨欠損を形成し、OCP/CoIを埋入する。実験動物はランダムに以下の3群に分かれる。

OCP/CoI-LF 局所投与群

OCP/CoI-LF 全身投与群

コントロール群 (OCP/CoI 単独使用、LF 投与無し)

OCP/CoI-LF 局所投与群においては、OCP/CoI をラクトフェリン(100 µg/ml) に1時間浸漬させたものを用いる。OCP/CoI-LF 全身投与群においては手術後より LF 溶液 100mg/kg(body weight)/day を4週間腹腔内投与する。

各群のラット数は8匹とし、OCP/CoI は直径9mm、厚さ1mmのDisk状に成型したものを使用する。手術から6、12週後、ペントバルビタール過剰投与にて屠殺する。

### (2) µCT

Scan Xmate-E090(Comscantecno Co.) を用いてµCT撮影を行う。得られたデータをもとに、骨形態計測ソフトウェア TRI/three-dimensional BON(Ratoc System Engineering) を用いて骨形態計測、骨密度計測を行い、骨質に及ぼす影響を検討する。

### (3) 組織染色

得られた標本を10%EDTAにて脱灰し、パラフィン包埋を行う。ミクロトームにて薄切し、ヘマトキシリン-エオジン染色、TRAP染色、免疫組織化学染色(Runx2, Osteocalcin, SOST)を行う。

TRAP染色は破骨細胞の観察を目的として行う。Runx2は前骨芽細胞から骨芽細胞への分化に必要な転写因子で、Osteocalcinは成熟骨芽細胞により合成されるカルシウム結合タンパク質であり、骨芽細胞分化の前期・後期のマーカーとして利用する。電子顕微鏡にて観察し、画像解析ソフトを用いて組織学的な新生骨形成割合や新生骨の構造、骨芽細胞・破骨細胞の局在性について解析するとともに、LFが骨芽細胞分化のどの段階で促進作用を示すのかを検討する。

## 4. 研究成果

ラクトフェリン(LF)を4週間全身投与したRat頭蓋骨にOCPコラーゲンを埋入、更にLF溶液に浸漬したOCPコラーゲンを埋入し、8週後に頭蓋骨を回収した。新生骨形成量を放射

線学的に評価、また HE 染色による組織学的評価を行った。CT 上でも LF を全身投与した群においては骨再生効果が一定に観察されたが、コントロール群との有意差を認めなかった(図)。LF 溶液に OCP コラーゲンを浸漬して埋入した群においてはコントロールと比較し新生骨形成量に有意差を認めなかった。

免疫染色 (Runx2, Osteocalcin) においても同様に、LF を腹腔内投与した群において陽性細胞が多く観察され、LF の効果により骨芽細胞の誘導が示唆された。

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