

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592306

研究課題名（和文）歯の移動時における歯槽骨再生を目的とした骨補填材の開発

研究課題名（英文）Development of the bone substitute material for alveolar bone regeneration during tooth movement

研究代表者

松本 尚之（MATSUMOTO NAOYUKI）

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70199884

研究成果の概要（和文）：

プロリン(P)-ヒドロキシプロリン(H)-グリシン(G)の共重合体により構成される人工コラーゲンであるコラーゲン様ポリペプチド Poly(PHG)は、炎症性を示すことなく、細胞増殖・分化のための足場としての役割を担うことが知られている。今回はミニブタの頭蓋骨欠損モデルを用いて、Poly(PHG)に α -TCP粒子を混合した実験、Poly(PHG)に骨髄間葉系幹細胞を混合した実験を行ったところ優れた骨再生能を示すことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Implantable scaffolds of the chemical synthesis of collagen model polypeptides consisting of a Pro-Hyp-Gly [poly(PHG)] sequence for tissue regeneration need to be biodegradable, have no ability to induce inflammation and to act as a scaffold for cell proliferation and differentiation. The combining poly(PHG) and alpha-tricalcium phosphate particles, or mesenchymal stem cells showed extremely rapid bone regeneration in a calvarial defect model in mini-pigs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学、生体材料学、組織工学、人工コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

成人を対象とした歯科矯正治療においては、成熟した歯槽骨及び歯周組織の中に歯根が固定されていることから、歯牙の初期移動に時間を要し、矯正治療の完了までに多大な時間を要する。また、成人の場合、多くは歯周疾患に罹患しているため、若年者の場合と比べ、負荷できる矯正力に制限があることも治療期間の長期化の一因となっている。

このような現状に対し、歯科矯正分野では、

成人に特化した矯正技術の開発に重点を置いてきたが、本研究は、若年者の矯正治療において使用される技術を可及的に成人においても利用できるようにするため、成人の歯槽骨及び歯周組織を増強しようとする、全く逆の発想に基づくものである。申請者らは、これらの発想を実現するために、再生医療を歯科矯正治療分野に導入しようとするものであり、本研究は、これまで試みられたことの無い独創的研究である。また、本研究で開

発する骨再生材料は生体内で作用することから、骨形成作用のみならず、安全性においても優れたものでなければならず、また填入操作性の高い材料である必要がある。これらの条件を満たすために本研究で開発する骨再生材料は、世界で唯一の人工コラーゲンを利用することが第一の特色である。

天然コラーゲンはこれまでも牛・ブタ等から得られているがこれらは未知のウイルス等の問題が残存する。一方、人工コラーゲンはアミノ酸を人工的に配列することで低コストの製造が可能で、既に知的財産の確保も終えている。第二に、人工コラーゲンとの複合化を考えている α -TCPは、細胞の成長を促すように気孔径の設計が可能な α -TCPとして世界で唯一であり既に知的財産の確保も終えている。これらの特色ある材料を複合化する意義は、細胞を呼び込む作用の強い人工コラーゲンと、スペースメイキングが可能で骨置換の速い α -TCPを利用することで、低コストで操作性・予知性の高い再生材料の製造が可能になることである。こうして、歯科矯正治療に、再生医療を応用した新しい分野を開拓し、普及させることができるものと確信している。

2. 研究の目的

近年、歯周外科・顎顔面外科の分野では、組織工学・再生医療の概念が導入され、これらを応用した新たな治療が試みられ、着実に成果をあげている。この歯周疾患に対する新しいアプローチは、破壊された歯周組織や吸収された歯槽骨を再生する目的で、歯槽骨、セメント質、歯根膜を再生する。そのため、間葉系幹細胞を患者自身の細胞を採取・増幅し、患部に移植する。申請者らは、移動歯周囲の歯周組織及び歯槽骨に見られる破壊的病変の補充療法としての再生医療を応用することで歯科矯正学的治療にも有用であると考え。本研究では、これまでの歯周組織再生治療で用いた生体吸収性材料を進展させ、歯槽骨の形態形成可能な人工コラーゲンと α -TCPを複合化させる生体吸収性材料を開発して、さらには患者自身の間葉系幹細胞を組み合わせた、新たな骨再生材料を開発する。

3. 研究の方法

(1) α -TCP とアテロコラーゲンスポンジ (CS) 複合体

α -TCP とアテロコラーゲンを混合したものの (α -TCP/CS 群) を実験材料として用いた。生体親和性と骨再生能を評価するためにラットの頭蓋冠骨欠損モデルを用いた。ラットの頭蓋骨に臨床学的骨欠損を作成し、コラーゲンおよび欠損のみの群を対照群とした。移植後 2 週、4 週、6 週で頭蓋冠を摘出しマ

イクロ CT と骨質計測システムによる三次元構造解析を行い、ヘマトキシリンエオジン染色による病理組織学的評価を行った。

(2) α -TCP と人工コラーゲンの組み合わせ

α -TCP と β -TCP とは化学式 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ は同じであるが、結晶構造 (相) が違う。この結晶構造の違いが骨内での溶解性に差を生じさせる。また結晶構造の違いは焼成温度と焼成条件によって決定され、 β -TCP は低温型で、 α -TCP は高温型である。また、今回用いた α -TCP 粒子は骨伝導性を高めるためポーラス構造となっている。Poly (PHG) と α -TCP 粒子をミニブタの頭蓋骨欠損モデルを用いて骨再生能の評価を行った。縮重合によって合成された 0.5% Poly (PHG) 水溶液を凍結乾燥したスポンジと、平均粒径 $580.8 \mu\text{m}$ 、 $136.2 \mu\text{m}$ の 2 種類の α -TCP 粒子を使用した。さらにその 2 種類の粒子を重量比 50 : 50 で混合した。動物にはメスのクラウン系ミニブタを使用し、その頭頂骨にクリティカルサイズの骨欠損を形成した。平均粒径 $580.8 \mu\text{m}$ と Poly (PHG) の混合物、平均粒径 $136.2 \mu\text{m}$ と Poly (PHG) の混合物、2 種類の粒子と Poly (PHG) の混合物の 3 群を実験群とし、Poly (PHG) のみを対照群とし、ミニブタ頭頂骨へ移植した。

(3) 人工コラーゲンと骨髄間葉系幹細胞 (MSC) との組み合わせ

骨髄組織中に骨芽細胞の前駆細胞が存在し、この細胞が骨芽細胞に分化して骨を形成することが知られている。骨髄間葉系幹細胞は ES 細胞のように倫理的な問題がなく、iPS 細胞のように腫瘍化の心配もない。また、細胞を得ることが容易であることが最大の利点である。我々は、ミニブタの腸骨から骨髄組織を骨髄芯によって取り出し、フラスコで培養することによって MSC を培養した。7 日間、デキサメタゾンを含む骨芽細胞分化培地で培養し、アルカリフォスファターゼ活性が上昇した。骨髄組織を採取したミニブタのクリティカルサイズの頭蓋骨の骨欠損に対して分化した 700 万個の細胞を Poly (PHG) 水溶液と混合して移植した。

4. 研究成果

(1) α -TCP とアテロコラーゲンスポンジ (CS) 複合体

マイクロ CT と骨質計測システムによる三次元構造解析から、骨体積率 (BV/TV)、骨密度 (BMD)、骨塩量 (BMC) を定量し、BMD によるカラーマッピングを行った。実験群である α -TCP/CS 群 (図 1、図 2 a, b, c)、は対照群であるコラーゲンや欠損単独に対して骨再生量が有意に増加していた。図 1 の移植後 2 週の α -TCP/CS 群では Low-to-Medium 値を示す BMD 分布像を観察した。マイクロ CT 像では窩洞を埋める少量の硬組織像を観察した。移植後 4 週では対照群と CS 群で Low 値を示

す BMD 分布像を観察した。α-TCP/CS 群で Medium 値を示す BMD 分布像を観察した。マイクロ CT 像では窩洞を埋める多くの硬組織像を観察した。骨体積率、骨塩量では α-TCP/CS 群が最も高い値を示した。しかし、骨密度のみ 3 群間内に定量的有意差は認められなかった。移植後 6 週では、対照群と CS 群で Low 値を示す BMD 分布像を観察した。マイクロ CT 像で対照群と CS 群は窩洞を埋める少量の硬組織像を観察した。一方、α-TCP/CS 群では部分的に High 値を示す BMD 分布像を観察した。マイクロ CT 像では窩洞を完全に満たしている硬組織像を観察した。また CS 群、対照群に対して骨体積率、骨塩量、骨密度とも有意に高い値を示した。

組織学的分析より実験材料の辺縁周辺から吸収が行われ新生骨に置換されていることが確認された。以上のことより生体親和性と優れた骨再生能をもつ骨補填剤の開発に成功したものと考えられる。

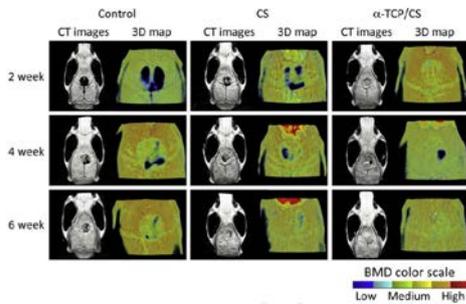


図 1. α-TCP/CS 群における BMD のカラーマッピング像

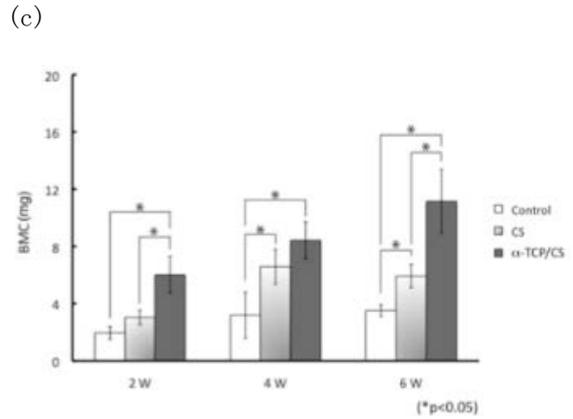
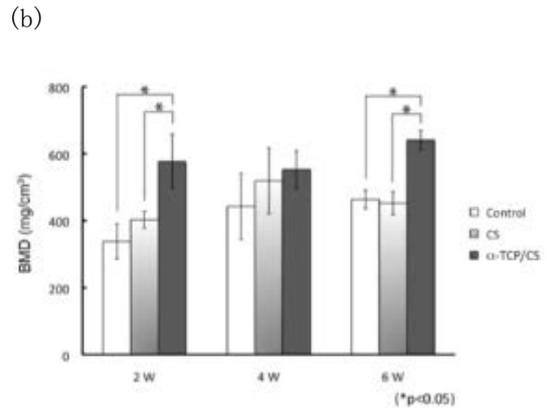
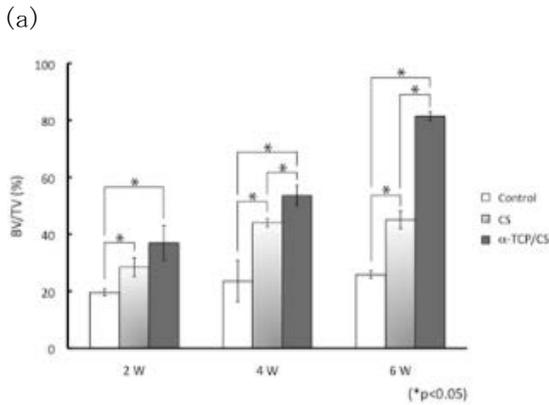


図 2. α-TCP/CS 群における、(a) 骨体積率 (BV/TV)、(b) 骨密度 (BMD)、(c) 骨塩量 (BMC)

(2) α-TCP と人工コラーゲンの組み合わせ

図3は8週で頭蓋骨を摘出しマイクロCTによる新生骨のマイクロCT像である。

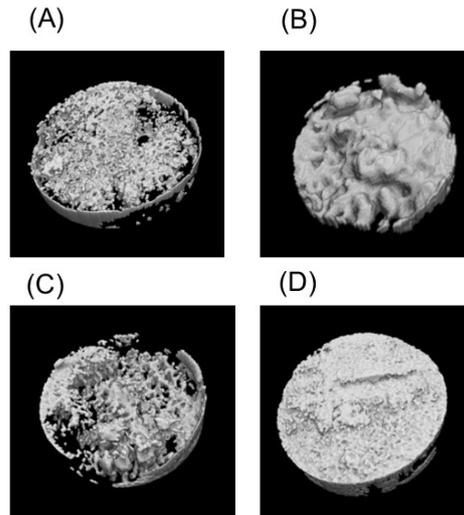


図 3. ミニブタ頭蓋骨骨欠損のマイクロCT画像 (A 対照群 B α-TCP 平均粒径 580.8 μm Poly(PHG) C α-TCP 平均粒径 136.2 μm Poly(PHG) D 2 種類の粒子と Poly(PHG))

Poly(PHG)のみでも骨再生は起こるが、2種類の粒子とPoly(PHG)の混合物で骨再生能が高いことがわかる。また、病理組織学的評価から大きいサイズの α -TCP粒子は残存するがPoly(PHG)は完全に吸収し、新生骨が形成されている(図4)。再生部位は頭蓋骨と顎骨では異なるがブタの骨再生能はヒトと近いことが知られており、人工コラーゲンであるPoly(PHG)と α -TCPを組み合わせた試みは歯槽骨再生に有用であると考えられる。さらに、本実験では埋入直前にスポンジを生理食塩水にてゲル化し α -TCP粒子と混合している。粒子のみでは操作性が悪く、移植しにくい手術現場でも本方法は有効であると考えられる。

18週後に頭蓋骨を摘出しマイクロCTならびに病理組織学的に評価したところ対照群であるPoly(PHG)のみの群に比較して有意に骨体積率が大きく、病理組織学的にもPoly(PHG)の吸収と旺盛な新生骨の骨形成が認められた。本実験から、Poly(PHG)と自己のMSCを利用した骨再生の有用性は明らかとなった。

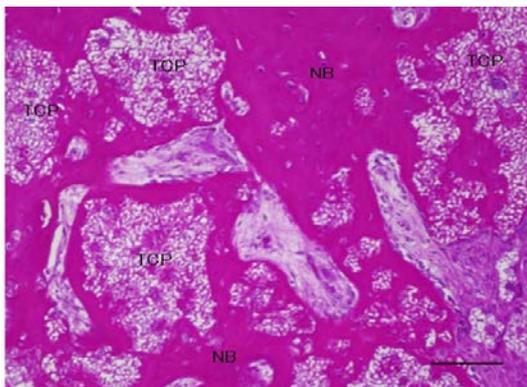


図4. 2種類の粒子とPoly(PHG)を移植したミニブタ頭蓋骨骨欠損の病理組織像(ヘマトキシリンエオシン染色)スケールバー: 100 μ m

しかし、一般の臨床医が行うには細胞培養の技術、設備、コスト、そして安全性など、多くのハードルが立ちはだかる。これまでわが国ではすぐれた骨伝導能を持つ骨再生材料が開発されてきたが、今後は成長因子を用いた骨誘導型のバイオアクティブな骨再生材料が開発され、早期に承認されることが望まれる。

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6件)

- ① Yoshiyuki Arima, Naoya Uemura, Yoshiya Hashimoto, Shunsuke Baba, Naoyuki Matsumoto. Evaluation of bone

regeneration by porous alpha-tricalcium phosphate/atelocollagen sponge composite in rat calvarial defects. *Orthod Waves*, 査読有り, 2013, 72(1), 23-29, DOI:10.1016/j.odw.2012.11.001

- ② Kenichirou Yasui, Yoshiya Hashimoto, Shunsuke Baba, Shigeki Hontsu, Naoyuki Matsumoto. Evaluation of Bone Regeneration of Apatite Coating Poly-L-lactide Scaffold in Rat Calvarial Defects. *Nano Biomed*, 査読有り, 2012, 4(2), 133-142

- ③ Kana Sakai, Yoshiyuki Arima, Kenichirou Yasui, Tomoko Kojima, Fumito Sakamoto, Yoshiya Hashimoto, Shunsuke Baba and Naoyuki Matsumoto. Bone regeneration efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a 3-D woven fabric composite scaffold. *J Osaka Dent Univ*, 査読有り, 2011, 45(2), 151-157

- ④ Kana Sakai, Yoshiya Hashimoto, Shunsuke Baba, Aki Nishiura, Naoyuki Matsumoto. Effects on bone regeneration when collagen model polypeptides are combined with various sizes of alpha-tricalcium phosphate particles. *Dent Mater J*, 査読有り, 2011, 30(6), 913-922

- ⑤ Shunsuke Baba, Yoshiya Hashimoto, Takeomi Inoue, Daisuke Kimura, Saeko Sumikura, Yumi Sonoda, Yoichi Yamada, Kenji Ito, Masaki Hojo, Taiji Adachi. Evaluation of a 3-D, woven-fabric, composite scaffold using experimental canine models of bone defects in mandibles. *J Oral Tissue Engin*, 査読有り, 2011, 8(3), 212-221

- ⑥ Shunsuke Baba, Takeomi Inoue, Yoshiya Hashimoto, Daisuke Kimura, Masatoshi Ueda, Kana Sakai, Naoyuki Matsumoto, Chiaki Hiwa, Taiji Adachi and Masaki Hojo. Effectiveness of scaffolds with pre-seeded mesenchymal stem cells in bone regeneration- Assessment of osteogenic ability of scaffolds implanted under the periosteum of the cranial bone of rats. *Dent Mater J*, 査読有り, 2010, 29(6), 673-681

[学会発表] (計8件)

- ① 安井憲一郎, 松本尚之, 橋本典也, 馬場俊輔, 有馬良幸, 坂本章人, 本津茂樹. レーザーアブレーション法を用いたアパタイトコーティングポリ乳酸足場

- の可能性. 第 22 回日本歯科医学会総会. 2012 年 11 月 10 日 大阪市
- ② 有馬良幸, 安井憲一郎, 坂本章人, 上村直也, 橋本典也, 馬場俊輔, 松本尚之. 骨補填材料としての Poly(PHG)アパタイト複合体の有用性. 第22回日本歯科医学会総会. 2012 年 11 月 10 日 大阪市
- ③ 安井憲一郎, 橋本典也, 馬場俊輔, 本津茂樹, 松本尚之. ラット頭蓋骨欠損におけるアパタイトコーティングポリ乳酸足場の骨再生の評価. 第71回日本矯正歯科学会大会. 2012 年 09 月 28 日. 盛岡市
- ④ 有馬良幸, 上村直也, 橋本典也, 松本尚之. ポーラス α -リン酸三カルシウム/アテロコラーゲンスポンジ複合体のラット頭蓋冠骨欠損での骨再性能の評価. 第 71 回日本矯正歯科学会大会, 2012 年 09 月 28 日 盛岡市
- ⑤ Kenichirou Yasui, Yoshiyuki Arima, Shigeki Hontsu, Yoshiya Hashimoto, Shunsuke Baba, Naoyuki Matsumoto. Evaluation of bone regeneration of Poly-l-lactide scaffold coating thin calcium phosphate by 3D image construction. 100th FDI Annual World Dental Congress, 2012 年 08 月 29 日 Hong Kong, China
- ⑥ Yoshiyuki Arima, Kenichirou Yasui, Fumito Sakamoto, Naoya Uemura, Yoshiya Hashimoto, Shunsuke Baba, Naoyuki Matsumoto. Evaluation of bone formation of combining α -TCP and atelocollagen by 3D image construction 100th FDI Annual World Dental Congress 2012 年 08 月 29 日 Hong Kong, China
- ⑦ Naoyuki Matsumoto, Kenichirou Yasui, Yoshiyuki Arima, Shigeki Hontsu, Yoshiya Hashimoto, Shunsuke Baba. Fabrication of poly-L-lactide scaffold coating thin calcium phosphate 90th General Session & Exhibition of the IADR. 2012 年 06 月 21 日 Iguacu Falls, Brazil
- ⑧ Kana Sakai, Yoshiya Hashimoto, Shunsuke Baba, Aki Nishiura, Naoyuki Matsumoto. Effects on Bone Regeneration When Collagen Model Polypeptides Are Combined with Various Sized Alpha-tricalcium Phosphate Particles. The international dental materials congress. 2011 年 5 月 28 日 Soul, Korea.

松本 尚之 (MATSUMOTO NAOYUKI)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：70199884

(2) 研究分担者

馬場 俊輔 (BABA SHUNSUKE)
大阪歯科大学・歯学部附属病院・教授
研究者番号：40275227

6. 研究組織

(1) 研究代表者