

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17072

研究課題名(和文)新規足場材と培養骨膜細胞の併用による低侵襲かつ高効率な歯槽骨再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of minimally invasive and highly efficient alveolar bone regeneration therapy using a combination of new scaffold materials and human cultured periosteal cells

研究代表者

都野 隆博 (Tsuzuno, Takahiro)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：40907383

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)：歯周炎に起因する歯槽骨吸収は様々な口腔機能障害を引き起こし、QOLを著しく低下させる。実臨床においてヒト培養骨膜細胞と自家骨、そして多血小板血漿を併用した歯槽骨再生療法は優れた骨再生が確認されている。本研究課題では、外科的侵襲の大きい自家骨採取に代わる新規人工足場材を応用し、低侵襲かつ高効率な骨再生療法を検討することである。頭蓋骨欠損モデルを作製し、炭酸アパタイトおよびヒト型コラーゲン様リコンビナントペプチドを併用したヒト培養骨膜細胞のin vivo移植実験から、人工足場材の単独移植と比較し、優れた骨再生能が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題から、ヒト培養骨膜細胞と新規人工足場材である炭酸アパタイトおよびヒト型コラーゲン様リコンビナントペプチドとの併用移植によって優れた骨再生が認められた。実臨床の現行プロトコルにおいて、ヒト培養骨膜細胞との併用移植に用いられている自家骨採取は外科的侵襲が大きく、また採取骨量に制限がある。今後、ヒト骨培養骨膜細胞を用いた歯槽骨再生療法において、自家骨併用移植に代替可能な新規人工足場材の応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Alveolar bone loss due to periodontitis adversely influences on oral health-related quality of life. Cell-based alveolar bone regeneration therapy using human cultured periosteal cells in combination with autologous bone exhibits great potential in the treatment of alveolar bone defects, but it is necessary to be combined with new artificial scaffold materials for less invasive and highly efficient treatment. In this study, carbonate apatite granules and recombinant human collagen peptides were mixed with human cultured periosteal cells respectively and transplanted into calvarial bone defect model in vivo. From histological and micro-CT analysis, transplantation of these new scaffold materials with human cultured periosteal cells had great effect on bone regeneration compared to transplantation of these materials alone.

研究分野：歯周病学

キーワード：ヒト培養骨膜細胞 培養骨膜細胞シート 人工足場材 骨再生能

## 1. 研究開始当初の背景

歯周炎に起因する歯槽骨の吸収は歯の動揺および脱落につながり、咀嚼や構音、審美などの障害を引き起こすことで、QOL を著しく低下させる。失った歯周組織の再生を目的として、GTR 法、エナメルマトリックスデリバティブ、リコンビナント線維芽細胞増殖因子、人工骨・自家骨の単独使用もしくはそれらの併用による歯周組織再生療法が日常的に行われている。最近のメタ解析において、単独使用に比較して併用療法は中長期的に良好な臨床効果が得られることが報告されており (Stavropoulos A et al. J Clin Periodontol. 2021)、適切な足場材との併用療法が長期的な安定した歯周組織の維持に有効と考えられる。

申請者らは歯槽骨や顎骨の再建・再生を目的として、培養自家骨膜細胞を用いた細胞移植再生治療を患者に施行している。骨膜は骨表層を覆う結合組織であり、骨芽細胞前駆細胞や間葉系幹細胞を含み、FGF-2 や VEGF などの成長因子を産生し、骨分化誘導により高い ALP 活性を示すこと、すなわち骨膜細胞は優れた骨形成能を有することが示されている (Uematsu K et al. J Tissue Eng. 2013)。現行プロトコールでは、培養自家骨膜細胞と自家骨片、そして多血小板血漿 (PRP) を混和して作製された骨形成性移植材が用いられる。口腔外科領域の臨床研究において、インプラント治療前の比較的小範囲な骨欠損部位に対する骨造成として優れた治療成績も報告されている (Ogawa S et al. Clin Implant Dent Relat Res. 2016)。しかしながら、現行プロトコールに含まれる自家骨片採取のプロセスは、採取時の外科的侵襲の大きさや採取骨量に限界があり、適用症例が限定されることが課題である。多量の自家骨採取を要する広範囲骨欠損症例への適応拡大には、非侵襲的かつ使用量に制限がない人工足場材への代替が必要と考える。

外科的侵襲を伴う自家骨採取に代わる足場材として、様々な材質・性状の人工骨が歯周組織再生療法においても用いられてきた。しかしながら、ハイドロキシアパタイトなどの非吸収性材料は、線維性の被包化や異物反応としての炎症の惹起が問題となる。その中、2018 年に骨の無機質成分と組成が近似した炭酸アパタイト性足場材サイトランスグラニュール® (GC 社) が本邦で薬事承認され、骨補填材として使用されている。また、動物由来成分を含まないヒト型コラーゲン様リコンビナントペプチド (FUJIFILM 社) は、in vivo 移植実験における優れた骨再生能が報告されており (Ito M et al. Materials. 2021)、現在は欧州において臨床試験が進められている。いずれの足場材も高い骨再生能を有しかつ経時的に吸収し骨に置換される、すなわち高い生体親和性を具備する新たな人工材料として注目されている。足場材の性状が幹細胞の増殖や分化に影響することから (Zhang Y et al. Front Bioeng Biotechnol. 2020)、骨膜細胞の有するポテンシャルを最大限に引き出すことができる足場材との組み合わせが、自家骨片との併用に劣らない骨再生能を発揮させることに極めて重要と考える。

## 2. 研究の目的

以上の背景から、本研究課題の目的は、自家骨併用移植に代替可能な人工足場材を用いた、より低侵襲かつ高効率な培養骨膜細胞移植再生治療の開発を検討することである。

## 3. 研究の方法

インフォームドコンセントの得られた提供者から採取したヒト骨膜組織を 1mm×1mm 大に細片化し、専用培地 MSC-PCM (コージンバイオ社) を用いて直径 60mm セルカルチャーディッシュにて 4 週間組織片培養して細胞シートを作製し、実験に供した。足場材としては、生体吸収性を有する炭酸アパタイト (サイトランスグラニュール®: CG) やヒト型コラーゲン様リコンビナントペプチド (RCP)、非吸収性のハイドロキシアパタイト (HA) を用いた。

### (1) ヒト培養骨膜細胞および人工足場材を用いた複合化移植材の同所性骨再生能の検討

他種細胞に対して拒絶反応が起こらない免疫不全動物のヌードラットを用い、頭蓋骨欠損モデルとして頭蓋骨に直径 5mm の骨欠損を作製し、同部に人工足場材の単独移植もしくはヒト培養骨膜細胞 (PC) と人工足場材の複合化移植材の移植を行った (各 N=6)。4 週間後、頭蓋骨のサンプリングを行い、パラフィン切片の H-E 染色による組織学的解析およびマイクロ CT 撮影による画像解析を行った。

### (2) 炭酸アパタイトおよびハイドロキシアパタイト内における細胞親和性の検討

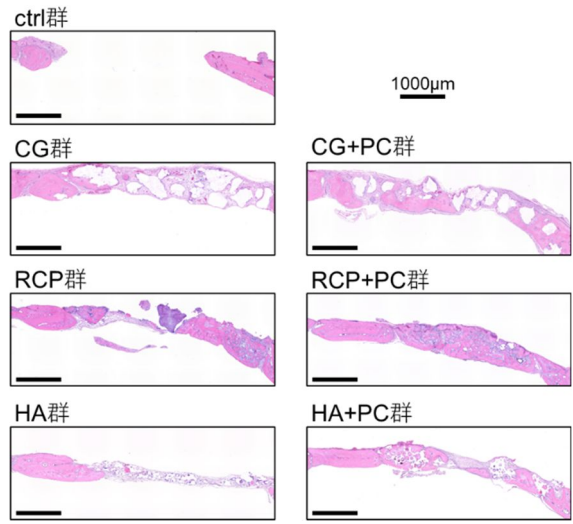
ヒト培養骨膜細胞の炭酸アパタイトおよびハイドロキシアパタイトへの細胞接着能の解析を目的に、直径 60mm セルカルチャーディッシュに炭酸アパタイトおよびハイドロキシアパタイトをそれぞれ播種後、さらにヒト骨膜細胞を播種し、培養を行った。3 日後、4%PFA にて固定し、走査型電子顕微鏡 (SEM) 撮影を行い、細胞接着の様子を観察した。また、細胞増殖能の解析を目的に、24 ウェルプレートにヒト培養骨膜細胞を播種・培養を行ったのち、炭酸アパタイトおよびハイドロキシアパタイトをそれぞれ播種した Transwell を挿入し、共培養を行った。その後、MTT アッセイにて増殖能の比較解析を行った。

4. 研究成果

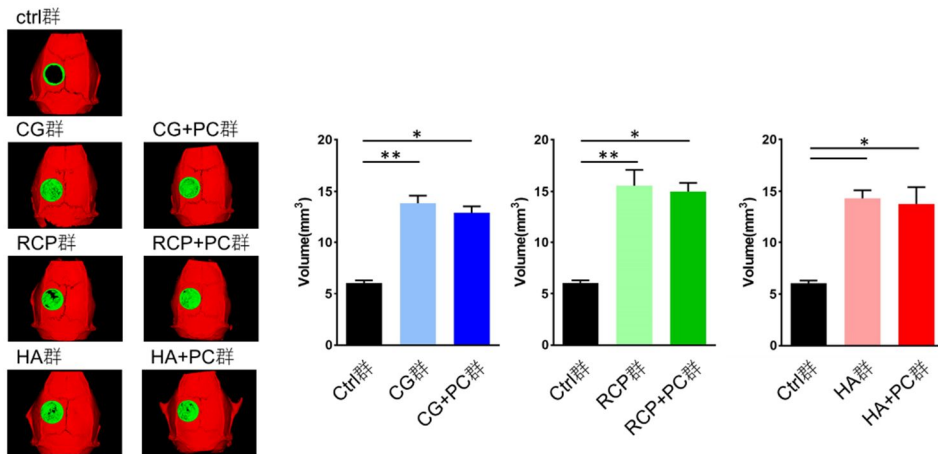
(1) ヒト培養骨膜細胞および人工足場材を用いた複合化移植材の同所性骨再生能の検討

移植 4 週間後の頭蓋骨の H-E 染色の結果を Fig.1 に示す。直径 5mm の骨欠損を作製した ctrl 群では、4 週間後も欠損が確認された。各種人工足場材を単独移植した CG 群、RCP 群、HA 群において、足場材周囲に骨新生が確認され、さらに足場材にヒト培養骨膜細胞を混和し、移植を行った CG+PC 群、RCP+PC 群、HA+PC 群では顕著な骨新生が確認された。次に、マイクロ CT 撮影による 3 次元的画像構築後、移植部における硬組織の体積を解析した(Fig.2)。Fig.2 左側が 3 次元的に構築された画像で、緑色が移植部を示し、右側に体積結果をグラフ化したものを示す。ctrl 群と比較し、各種人工足場材の単独移植群およびヒト培養骨膜細胞併用の移植群どちらにおいても、有意な硬組織の体積増加を認めた。しかしながら、移植された足場材自体が硬組織として検出されたため、人工足場材の単独移植群とヒト培養骨膜細胞併用の移植群において有意な差は認められなかった。

(Fig.1) 各種足場材移植後の頭蓋骨の H-E 染色像



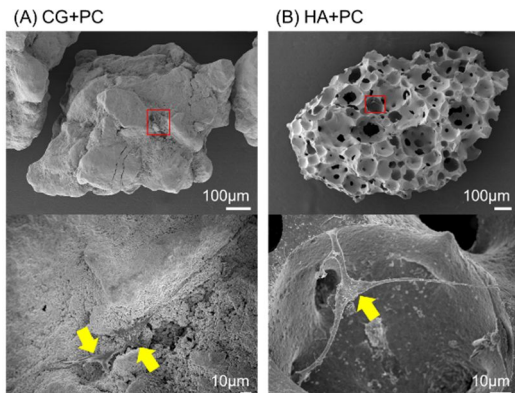
(Fig.2) 各種足場材移植後の頭蓋骨のマイクロ CT による 3 次元的画像解析



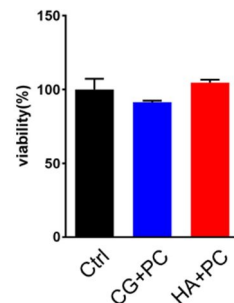
(2) 炭酸アパタイトおよびハイドロキシアパタイト内における細胞親和性の検討

すでに実臨床にて応用されている炭酸アパタイトとハイドロキシアパタイトについて、ヒト培養骨膜細胞との細胞親和性の検討を行った。Fig.3A および Fig.3B はそれぞれ CG および HA 上に播種したヒト培養骨膜細胞の細胞接着の様子を SEM 撮影したものである。どちらの人工足場材内においても、ヒト培養骨膜細胞は細胞突起をのぼし、細胞接着している様子が確認された。また、Fig.4 に示す MTT アッセイから、細胞単独培養の ctrl と比較し、CG および HA との共培養にてヒト培養骨膜細胞の増殖能に変化は認められなかった。

(Fig.3) 各種足場材内における細胞接着の様子



(Fig.4) 細胞増殖能の解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 都野隆博, 永田昌毅, 高橋直紀, 多部田康一, 中田光
2. 発表標題 ヒト培養骨膜細胞における in vitro 造腫瘍性の検討
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 都野隆博, 高橋直紀, 本杉駿弥, 中田光, 永田昌毅, 多部田康一
2. 発表標題 シングルセル遺伝子発現解析によるヒト培養骨膜細胞シートの骨形成評価
3. 学会等名 第66回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tran Diep Thi Thuy, 高橋直紀, 都野隆博, 永田昌毅, 多部田康一
2. 発表標題 コラーゲン様リコンビナントペプチドがヒト培養骨膜細胞に与える影響の解析
3. 学会等名 第66回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tran DTT, Takahashi N, Tsuzuno T, Nagata M, Tabeta K
2. 発表標題 Biological effects of recombinant collagen peptide on cultured human periosteal cells
3. 学会等名 The 71st Annual Meeting of the JADR (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tsuzuno T, Takahashi N, Nagata M, Motosugi S, Ueda Y, Nakata K, Tebeta K
2. 発表標題 Cellular heterogeneity and osteogenic capacity of cultured human periosteal cells
3. 学会等名 The102nd General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Tran Diep, Takahashi N, Tsuzuno T, Motosugi S, Ueda Y, Nagata M, Tebeta K
2. 発表標題 The role of recombinant collagen peptide in periosteal cell-derived osteoregeneration
3. 学会等名 The102nd General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高橋直紀, 都野隆博, 永田昌毅, 植田優太, 本杉駿弥, 山田葵, Tran Diep, 中田 光, 多部田 康一
2. 発表標題 顎骨由来培養骨膜細胞のheterogeneity解析と骨形成能への関与
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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