

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592884

研究課題名(和文) 骨再生のための幹細胞・有機無機複合体の開発

研究課題名(英文) Development of stem cell and organic-inorganic composite for promoting bone regeneration

研究代表者

岩井 聡一 (Iwai, Soichi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：10362675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：大阪大学歯学部倫理委員会において承認を得た上で臨床研究を遂行した。小児の顎裂患者に対して、あごの骨とHAp・ヒドロキシアパタイト・アガロースゲル(HApゲル)混和して移植した。自家骨移植と同様に、術後約3ヶ月で骨再生が認められた。HApゲルを使用することにより、骨移植において、腸骨採取を回避することができた。すなわち、患者への手術侵襲及び身体的苦痛の軽減、入院期間の短縮、術後運動制限の緩和をもたらした。さらに、HApゲル単体よりも、骨髄間葉系幹細胞をHApゲル上で培養し、骨欠損部へ移植したほうが、より速くより多くより質の良い骨再生ができることを、培養実験及び動物実験で明かにした。

研究成果の概要(英文)： We developed hydroxyapatite agarose composite gel (HAp gel) which is more promptly absorbed and replaced by new bone, and enforced clinical study. HAp gel was placed mixed with autologous bone into alveolar clefts associated with cleft lip and palate. The HAp gel and mandibular bone were completely replaced by new bone, similar to results obtained using iliac bone alone. By using HAp gel, iliac bone extraction can be avoided in cases where it was previously thought necessary. This translates into less bone harvest site trauma and postoperative complications, which may be greatly beneficial for child patients with alveolar cleft.

Moreover, we clarified the osteogenic abilities of Mesenchymal stromal cells (MSCs) loaded in HAp gel using a rat cranial defect model compared to HAp gel. MSCs-loaded gel strengthened their osteogenic ability and improved the quality of new bone. These indicated that MSC-loaded gel could represent viable therapeutic biomaterial for bone tissue engineering.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 歯科医用工学・再生歯学

キーワード：バイオマテリアル 骨再生 吸収性人工骨補填材 ハイドロキシアパタイト アガロースゲル 骨髄由来幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯科・口腔外科領域において、骨欠損部に対して自家骨移植が行われている。しかし、自家骨採取による手術侵襲など患者の負担が重い上に、供給量も制限される。このため、自家骨と同等あるいはそれを上回る生体材料の開発が必要とされる。これまでは、ハイドロキシアパタイト或いは三燐酸カルシウム (TCP) が注目されてきたが、現状で完全に自家骨に代わりえる生体材料とはなっていない。

共同研究者の明石らは、骨伝導能を有し分解吸収性に優れ、安全性の高いハイドロキシアパタイトゲル (以下 HAp ゲル) を開発した。動物実験によって、HAp ゲルが生体内で速やかに骨組織に置換されることが明らかになっている(1)。本材料は、厚生労働省のガイドラインを遵守した生物学的安全性試験 (GLP 毒性試験) を実施し、医療機器の認可申請に必要である安全性に問題がないことを確認した。このデータをもとに、臨床研究 (translational research: TR) を、大阪大学歯学部倫理委員会に申請し、2009年6月に承認された。

(2) 近年、組織工学 (tissue engineering) において、骨芽細胞による骨組織の再生が注目されている。これには、細胞が接着・増殖・分化できる足場となる生体材料の構築が必要不可欠であり、細胞親和性、生体内吸収性、成形性などに優れていることが要求される。

臨床においては骨移植を必要とする場合に、骨再生材料だけでは新生骨が生成し難い環境が存在する。このような環境において、HAp ゲルなどの骨再生材料のみの移植ではなく、自己の骨髄間葉系幹細胞を採取し、これら骨再生材料上で培養し、骨芽細胞へ分化・増殖させた後に、移植することによって、より高い骨生成が期待できると考えられる(2)(3)。

上において培養・分化誘導が可能であることを実験にて確認している。

(1) Tabata M, Shimoda T, Sugihara K, Ogomi D, Serizawa T, Akashi M, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.: 15;67,680, 2003.

(2) Akahane M, Nakamura A, Ohgushi H, Shigematsu H, Dohi Y, Takakura Y, J. Tissue Eng. Regen. Med. : 2(4):196-201 2008.

(3) Suzawa Y, Funaki T, Watanabe J, Iwai S, Yura Y, Nakano T, Umakoshi Y, Akashi M, J. Biomed. Mater. Res. 93A ;965-975, 2010.

2. 研究の目的

(1) HAp ゲルを用いた臨床研究 (TR) : 抜歯 (特に埋伏智歯) 及び顎嚢胞や腫瘍摘出後に骨欠損を生じる患者及びインプラント埋入時の骨量不足に対する骨造成 (上顎洞挙上術を含む) が必要な患者に対して、HAp ゲルを充填し、骨の生成速度、生成骨の状態、感染の有無、骨吸収の程度などを検討することによって、臨床応用の条件を明らかにする。

口唇口蓋裂患者の顎裂に対する骨移植に対して、自家骨 (オトガイ骨) と HAp ゲルを共に充填することによって、腸骨移植の回避する。

(2) 骨髄間葉系幹細胞を HAp ゲル上にて培養し、骨へ分化誘導をさせ、動物に埋植する手法を用いて、骨形成の至適条件を検討する。

In vitro における実験を行い、次に in vivo のラットの頭蓋骨欠損モデルにて解析する。

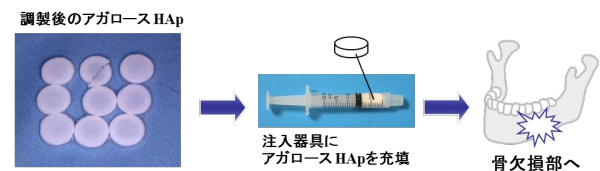
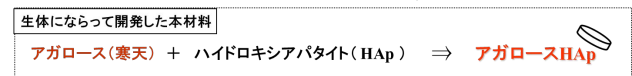
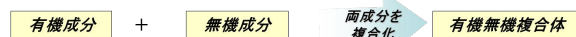
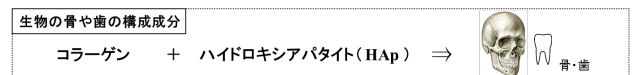
(3) 顎裂への骨移植モデルとして、ビーグル犬の顎裂モデルを用いる。HAp ゲルを埋植して、骨形成の至適条件を決定する。

(4) 厚生労働省のガイドラインを遵守した生物学的安全性試験 (GLP 毒性試験) 及び有効性試験を実施し、臨床研究の申請及びヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針申請の準備を行う。

3. 研究の方法

(1) HAp ゲルの臨床研究を遂行する。大阪大学歯学部倫理委員会において承認を得たプロトコルにしたがって遂行する。智歯抜歯、嚢胞摘出後の顎骨欠損、口唇口蓋裂患者の顎裂骨欠損等に対し、HAp ゲルの臨床試験を行う。術前、術後の骨生成の評価はデンタルX線写真、パノラマX線写真、デンタル CT の撮影により行う。レントゲン画像の透過性をデータ解析ソフトによって評価し、非充填症例と比較検討する。さらに創部治癒不全、術後感染、骨吸収の有無を確認する。

共同研究者の明石らは、従来と異なる合成法 (交互浸漬法) により、無機物の形成量や配向性の制御が可能で、従来法と比較して100倍の速度で HAp とアガロースとの複合体を得ることができる手法である。この新規作成方法により、HAp ゲルを作成する。



(2) ラット骨髄間葉系幹細胞を HAp ゲル上で培養し、ラット頭蓋骨欠損部に埋植し骨形成の至適条件を検討する。

HAp ゲル上で、ラット間葉系骨髄幹細胞の初代培養を行う。細胞親和性、接着性や増殖性、骨芽細胞への分化能に及ぼす効果について解析し、HAp ゲルの組成や形状の至適条件を確立する。細胞の増殖能及び親和性を増

殖曲線や DNA 量測定を指標に検討し、至適培養条件を決定する。さらに、骨への分化を誘導する因子であるデキサメタゾンの添加によって、骨芽細胞への分化や骨基質の生成、石灰化を促進する。アルカリフォスファターゼ活性（骨芽細胞への分化の指標）やオステオカルシンの発現量（骨分化の指標）を測定し、分化誘導能を解析する。カルセインの沈着量、アリザリンレッド S 染色（骨基質のカルシウムを染色）炎色反応による Ca 量などを測定し骨の生成量を測定する。

HAp ゲル上における骨髄間葉系幹細胞の骨細胞への分化と骨形成能を、ラットの頭蓋骨欠損モデルへの埋植を行うことにより評価する。すでに解析済みである HAp ゲル材料単体のみの埋植と比較して骨の生成速度、生成した骨量や再生骨の評価を行う。

(3) ビーグル犬顎裂モデルの作成と生体材料移植実験：ビーグル犬の顎裂に HAp ゲル単体を埋植し、骨の生成速度、再生骨の評価を行う。さらに、骨髄間葉系幹細胞を HAp ゲル上で培養し、顎裂に埋植する。

4. 研究成果

(1) HAp ゲルの臨床研究

大阪大学歯学部倫理委員会において承認を得たプロトコルにしたがって臨床研究を遂行した。智歯抜歯、嚢胞摘出後の骨欠損に対して HAp ゲルを単体で充填した。一方、口唇口蓋裂患者の顎裂閉鎖骨移植に対して、オートガイ骨と HAp ゲルを混和して充填した。骨生成の評価は X 線写真にて行った結果、全症例に骨生成が認められた。特に、顎裂閉鎖骨移植において、これまでは十分な骨量を採用できる腸骨から採取してきたが、その場合の骨再生が認められる時期は術後 3 ヶ月遅くても 6 ヶ月であった。これと比較して、オートガイ骨と HAp ゲルの充填においても、全例 10 例において同じ時期に骨再生が認められた。その後の矯正治療にも支障を与えていない。さらに、全症例 18 症例において、創部治癒不全、術後感染、過度な骨吸収などの有害事象は認めなかった。特筆すべきことは、HAp ゲルを使用することにより、小児の顎裂患者への骨移植において、腸骨採取を回避することができたことである。すなわち、患者への手術侵襲及び身体的苦痛の軽減、入院期間の短縮、術後運動制限の緩和をもたらした、このことは実用化に向けて大きな成果となった。この臨床研究の結果は現在英文雑誌に投稿中である。それと同時に、国内外にて成果を発表し、実用化に協力していただける企業を公募中である。

(2) ラット骨髄間葉系幹細胞(BMSCs)を HAp ゲル上で培養し、ラット頭蓋骨欠損部に埋植する研究

Disk 型に作製した Agarose gel から、交互浸漬法により HAp gel, CaCO₃ gel を調製した。ラットの大腿骨から採取した BMSCs を初代培養後、Disk 型 gel に播種し、一昼夜培養したものを Fissure344 ラット頭蓋骨骨欠損部へ埋植した。材料単独群、欠損のみの群(欠損群)を対照群として設定し、埋植 4 週間および 8 週後に検体を摘出して、生成骨量及び骨質について検討した。(図 1,2) 再生骨の定性評価は μ CT 撮影、骨量評価は体積骨密度測定装置(以下 pQCT)にて行い、骨質の指標となる生体アパタイト結晶の配向性は微小領域 X 線回折装置(以下 μ XRD)にて測定した。組織学的評価として、H-E 染色により病理組織像を観察し、その組織像より Image Pro という解析ソフトを用いて再生骨骨面積を測定した。

図 1

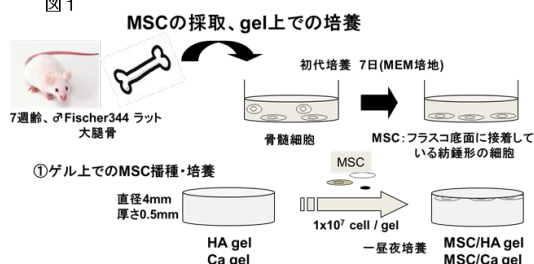
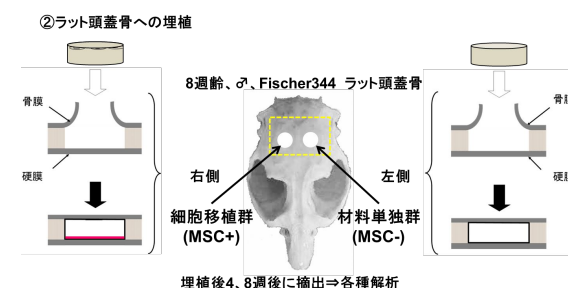


図 2



(結果) μ CT 像において、材料単独群および欠損群に比べ、細胞移植群では、埋植後 4 週の時点で欠損部の X 線不透過像の占める割合は大きく、8 週になるとさらに不透過性の亢進を認めた。pQCT にて算出した再生骨量も、材料単独群および欠損群に比べ、細胞移植群では有意に増加していた。 μ XRD 装置を用いて得られる X 線回折パターンより、骨質の指標の一つとして有用なアパタイトの配向性を測定し、定量化を行った結果、生体アパタイト結晶の配向性においても、同様に材料単独群および欠損群に比べ、細胞移植群で有意に高値を示した(図 3)。HE 染色像において、材料単独群に比べて、細胞移植群では欠損部はより多くの新生骨が見られた。HE 染色像より得られた再生骨骨面積の割合は、4 週、8 週共に、材料単独群に比べて、細胞移植群で有意に骨面積の割合は大きかった(図 4)。

図3

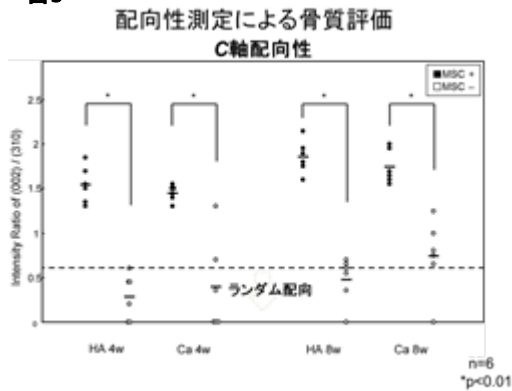
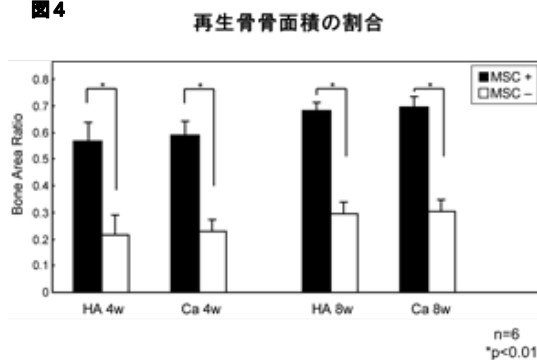


図4



さらに、HApゲル、Caゲル上でMSCは*in vitro*においても、良好な細胞接着・増殖性を示し、骨への分化も促進された。

細胞移植群はゲル単独群と比較し、骨再生効果が優れていた。これらの結果から、新規有機無機複合体材料であるHApゲル、Caゲルは細胞(MSC)の足場材料として応用が可能であり、周囲からの骨再生が困難な場合にも有用な骨補填材料となりうることを示した。

Mizuta N, Hattori K, Suzawa Y, Iwai S, Matsumoto T, Tadokoro M, Nakano T, Akashi M, Ohgushi H, Yura Y. Mesenchymal stromal cells improve the osteogenic capabilities of mineralized agarose gels in a rat full-thickness cranial defect model. *J Tissue Eng Regen Med* 2013;7:51-60.

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. Iwai S, Shimizu H, Takeshita A, Akashi M, Yura Y. Clinical study of HAp/agarose composite gels (HAp gel) used as a bone regenerative biomechanical material in jawbone defects

International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 42:10:1180-1181, 2013 査読無

2. Mizuta N, Hattori K, Suzawa Y, Iwai S, Matsumoto T, Tadokoro M, Nakano T, Akashi M, Ohgushi H, Yura Y. Mesenchymal stromal cells improve the osteogenic capabilities of mineralized agarose gels in a rat full-thickness cranial defect model. *J Tissue Eng Regen Med* 7:51-60, 2013. 査読有

DOI: 10.1002/term.495

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 岩井聡一、水田法彦、須澤佳香、明石満、大串始、由良義明
新規有機無機複合体材料を用いた骨髄由来間葉系幹細胞移植の骨再生効果
口腔組織培養学会 50 周年記念大会 東京 日本歯科大学生命歯学部 九段ホール 2013 年 11 月 23 日

2. Iwai S, Shimizu H, Takeshita A, Akashi M, Yura Y.

Clinical study of HAp/agarose composite gels (HAp gel) used as a bone regenerative biomechanical material in jawbone defects. ICOMS(International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery 2013 in Barcelona, Spain.

2013/10/22 136.00T2.OR004

3. Iwai S.

Development of biomineral /agarose composite gels as new bone grafting materials.

--from basic research to clinical study--

KNU-Osaka international symposium in Kyunpoku National University, Daegue, Korea “ Current Research in Management of Bone Disease” 2013 年 4 月 24 日
Kyunpoku National University, Daegue, Korea

4. Iwai S, Suzawa Y, Mizuta N, Takeshita A, Shimizu H, Ota Y, Matsumoto K, Akashi M, Yura Y. Clinical study for HAp / agarose composite gels (HAp gel) used as a bone reproduction biomechanical material to the jaw bone defect

KAOMS 2013 Daegue, Korea, 2013/4/26 B16-001.

5. 岩井聡一

Clinical study of HAp/agarose composite gels (HAp gel) used as a bone regenerative biomechanical material in jawbone defects. 第 6 回 MEI 産学連携部門勉強会講演会 日英国際交流シンポジウム (招待講演) 大阪大学銀杏会館, 2013 年 3 月 27 日

6. 岩井聡一、水田法彦、須澤佳香、竹下彰範、大串始、明石満、由良義明

新規有機無機複合体材料を用いた骨髄由来間葉系幹細胞移植の骨再生効果
大阪大学歯学会第115回例会 2013年1月10日

7. 須澤佳香、水田法彦、岩井聡一、由良義明、中野貴由、大串始、明石満
有機無機複合体ゲルによる骨再生に対する有用性に関する解析 第57回日本口腔外科学会総会 2012年10月19日 横浜 パシフィック横浜 演題番号 1-P7.1-2

8. Iwai S ,Suzawa Y ,Mizuta N, Takeshita A , Shimizu H , Yura Y .
Clinical study of HAp/agarose composite gels (HAp gel) used as a bone regenerative biomechanical material in jawbone defects. EACMFS2012 2012/9/14 Dubrovnik Croatia O-3302

9. 水田法彦、須澤佳香、岩井聡一、新谷素子、野田孝之、由井俊平、由良義明
新規有機無機複合体材料と骨髄由来間葉系幹細胞による骨再生効果
第43回日本口腔外科学会近畿地方会 2012年6月23日 千里ライフサイエンスセンター大阪

10. 岩井聡一、須澤佳香、水田法彦、竹下彰範、清水英孝、由良義明
顎骨骨欠損に対して骨再生生体材料として吸収性ハイドロキシアパタイトアガロースゲルを用いた臨床応用研究
第69回NPO法人日本口腔科学会・学術集会 2012年5月18日
広島国際会議場 広島 演題番号 2-B-16

11. 須澤佳香、水田法彦、岩井聡一、由良義明、中野貴由、明石満
有機無機コンポジットゲルによる再生骨および材料の特性に関する解析
第33回日本バイオマテリアル学会 2011年11月22日 京都テルサ 京都 演題番号 P-93

12. 岩井聡一、須澤佳香、水田法彦、竹下彰範、門脇功治、清水英孝、明石満 由良義明
顎骨骨欠損に対して骨再生生体材料としてハイドロキシアパタイトアガロースゲルを用いた臨床応用研究 第一報
第33回日本バイオマテリアル学会 2011年11月22日 京都テルサ 京都 演題番号 O29-4

〔図書〕(計 1件)

1. 岩井聡一

技術情報協会編集(書籍 No 1732)
体内埋め込み医療材料の開発とその理想的な性能・デザインの要件
第1章 埋め込み医療機器・材料に起こっているトラブルとその解決
第2節 骨補填材・接合剤【1】骨補・接合

で起こる感染症、炎症、痛み発生
2013年 全570頁 p14-18.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ

大阪大学歯学研究科ホームページ

臨床研究成果報告

URL

<http://hospital.dent.osaka-u.ac.jp/form/medical/attached/00000>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩井 聡一 (Iwai Soichi)

大阪大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：10362675

(2)研究分担者

明石 満 (AKASHI Mitsuru)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20145460

(3)連携研究者

()

研究者番号：