

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792228

研究課題名（和文） 長鎖型ポリリン酸吸着アパタイト人工骨の骨再生能

研究課題名（英文） Bone regeneration of artificial bone adsorbed inorganic polyphosphate with long chain length

研究代表者

森田 晃司（MORITA KOJI）

広島大学・病院・助教

研究者番号：30555149

研究成果の概要（和文）：

長鎖型である鎖長130のポリリン酸の骨再生能と比較して中鎖型である鎖長65のポリリン酸は骨再生能が高く、またポリリン酸とbFGFとをアパタイトに組み合わせることで早期に骨形成を促進する人工骨になりうる可能性があることが *in vitro* および *in vivo* の実験結果から明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

These results *in vitro* and *in vivo* may indicate that inorganic polyphosphate with medium chain length of 65 accelerated bone regeneration compared to inorganic polyphosphate long chain length of 130. Within the limited results of this study, it may be concluded that artificial bone adsorbed inorganic polyphosphate with medium chain length of 65 and bFGF enhanced initial bone regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：補綴学分野

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：ポリリン酸、骨再生

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの研究では、生体に近似する鎖長60の中鎖型ポリリン酸を用いてきた。予備実験からこの中鎖型ポリリン酸より長い鎖長を持つ長鎖型ポリリン酸が、破骨細胞によるポリリン酸の分解を遅らせて、骨吸収の抑制とポリリン酸の骨形成効果を持続できる可能性が明らかになった。

そこで、鎖長の長いポリリン酸を用いることで、骨芽細胞の活性化が低下している骨内での骨再生がポリリン酸の作用延長によりさらに確実にならないかと着想した。

## 2. 研究の目的

鎖長の長いポリリン酸を吸着させたアパタイト人工骨の骨再生能を骨粗鬆症モデルラットを用いて明らかにすることを目的とする。

る。

## 3. 研究の方法

## 【平成23年度】

1) 目的：鎖長の長いポリリン酸における骨再生メカニズムの解明

2) 材料：

●細胞：マウス骨髄間葉系幹細胞、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞、マウス破骨細胞

●細胞培養用プレート：アパタイトプレート（ネオボーン<sup>®</sup>、直径：13 mm、高さ：1.0 mm）

●ポリリン酸：

①中鎖60ポリリン酸（鎖長60）

②長鎖120ポリリン酸（鎖長120）

③長鎖240ポリリン酸（鎖長240）

④長鎖360ポリリン酸（鎖長360）

⑤ポリリン酸なし（コントロール）

### 3) 方法:

①、②、③および④のポリリン酸を25%濃度に調整し、その溶液中にアパタイトプレートを24時間含浸する。その後、2500回転、2分間遠心分離を行い、37℃で3日間以上乾燥させる。このことより、それぞれの鎖長をもったポリリン酸吸着アパタイトプレートを作製する。ポリリン酸を吸着しないプレートも同時に用意する(コントロール)。

↓  
マウス由来骨髄間葉系幹細胞、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞およびマウス破骨細胞を①～⑤のプレート上で1、5、10、15、20日間培養する。各時期での細胞増殖数を測定する。また、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞ではアルカリフォスタターゼ(ALP)、オステオポンチン(OPN)およびオステオカルシン(OCN)の発現量をRT-PCR法を用いて測定する。さらに、アリザリンSレッド染色を用いて、石灰化度を光顕的に観察する。酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)活性を用いて破骨細胞数を測定する。

↓  
ポリリン酸吸着アパタイトプレートがマウス骨髄間葉系幹細胞、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞およびマウス破骨細胞の細胞増殖数および骨分化に及ぼす影響を生化学的に評価することにより、鎖長の長いポリリン酸の骨再生メカニズムを明らかにする。



#### 【平成24年度】

- 1) 目的: 鎖長の長いポリリン酸を用いたポリリン酸吸着型人工骨の骨再生能の解明
- 2) 動物: ニュージーランドホワイトラビット18羽  
(①、②および③の材料は直径を3mm、長さを5mmとする。)  
(W: 3.0-3.5 kg)
- 3) 材料:  
①ポリリン酸吸着型人工骨(鎖長: 前年度で明らかとなる骨再生能のもっともよい鎖長を選択する)

②中鎖60ポリリン酸吸着型人工骨(鎖長60、ポジティブコントロール)

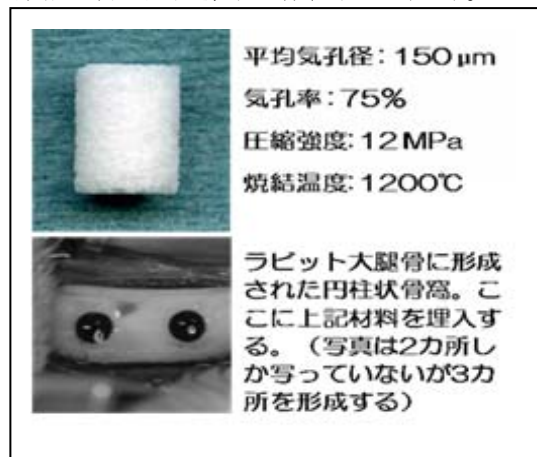
③アパタイト(ネガティブコントロール)

### 4) 方法:

動物の左側大腿骨に円柱状骨窩(直径: 3.0mm、長さ: 5.0mm)を3カ所形成、上記材料①～③を埋入する。

↓  
左側の埋入1週、右側大腿骨にも同様の骨窩を形成、上記材料①～③を埋入する。

↓  
左側の埋入から1、2、3週の各時期で動物を屠殺し、組織ブロックを採取する。①～③の凍結試料と脱灰標本作製する(N=8)。



- ① 骨組織中の骨形成マーカーの評価  
各凍結試料をホモジェナイズ処理した後、RT-PCR法により各移植材に発現したALP、OPNおよびOCN発現量を測定する。
- ② 免疫抗体染色による評価  
各標本に免疫染色を施し、ALP、OPNおよびOCN発現を組織学的ならびに組織形態計測学的に検討する。

↓  
以上の結果より、鎖長の長いポリリン酸吸着型人工骨による生体内での骨再生促進の様相を明らかとする。

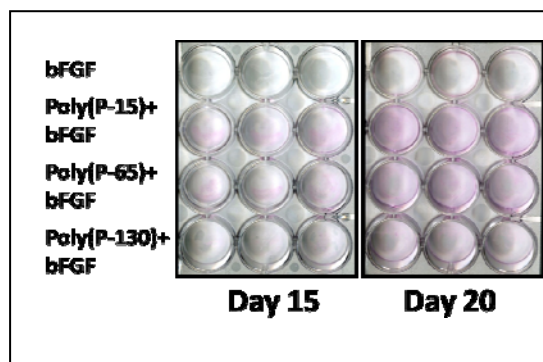
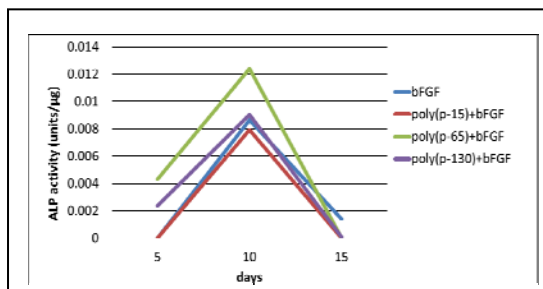
↓  
平成23、24年の研究結果を総括して、鎖長の長いポリリン酸吸着型人工骨が確実な骨再生を促進するか否かを明らかにする。

### 4. 研究成果

#### 【平成23年度】

平成23年度では『鎖長の長いポリリン酸吸着型アパタイト人工骨』に関して従来の鎖長65に加えて、15および130の鎖長に調整したポリリン酸とマウス頭蓋骨由来骨芽細胞を培養し、骨形成時に特異的に発現するアルカリフォスタターゼ(以下、ALP)活性およびオステオカルシン(以下、OCN)を28日後までに経時的に測定した。さらに、アリザリンSレッド染色(以下、アリザリン染色)を用いて同様

に21日、28日後での石灰化度を光顕的に観察した。得られた結果から、21日および28日後のALP活性およびOCNの発現は、鎖長65のポリリン酸の場合で他の鎖長と比較して有意差は認められなかったものの高かった。また、石灰化においては鎖長15および65のポリリン酸の場合に顕著な石灰化を認めた。また、鎖長15、65および130に調整したポリリン酸と破骨細胞とを培養し、ピットフォーメーションを観察した結果、鎖長による違いは認められなかった。これらの結果から、骨形成において従来の鎖長65のポリリン酸が骨形成能を促進する可能性が示され、鎖長65のポリリン酸の骨芽細胞への作用の一端が解明された。

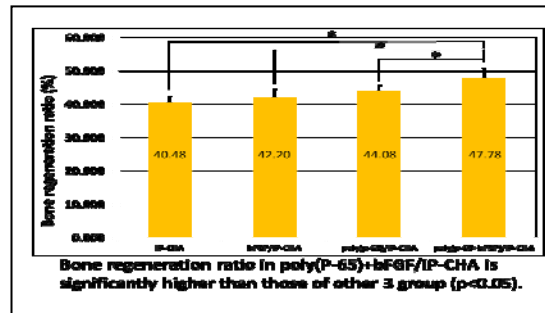


#### 【平成24年度】

平成24年度では平成23年度の結果から骨形成に有効なポリリン酸の鎖長を65と決定し動物3頭を使って実験を行った。まず鎖長65を持つポリリン酸と成長因子の1つであるbFGFを吸着させた人工骨、ポリリン酸吸着人工骨、bFGF吸着人工骨およびアパタイトを作製した。これらの人工骨を形成したラビット大腿骨円柱状骨窩（直径：3.0 mm、長さ：5.0 mm）に埋入し、埋入2週における骨再生の組織学的な観察および組織形態計測を行った。その結果、組織学的な観察では、アパタイトを埋入した骨窩において幼弱な線維骨が観察されたのに対して、ポリリン酸とbFGFを吸着させた人工骨を埋入した骨窩において骨芽細胞は石灰化している像が観察された。また、組織形態計測では、ポリリン酸とbFGFを吸着させた人工骨での骨再生量がポリリン酸人工骨、bFGF人工骨およびアパタイトのそれと比較して有意

に高かった。得られた結果から、鎖長65のポリリン酸とbFGFを組み合わせた人工骨は骨形成能を促進する可能性が示され、鎖長65のポリリン酸とbFGFの相互作用の一端が明らかとなった。

以上の結果より、長鎖型である鎖長130の骨再生能と比較して中鎖型である鎖長65のポリリン酸は骨形成能が高く、またポリリン酸とbFGFとをアパタイトに組み合わせることで早期に骨形成を促進する人工骨になりうる可能性があることが明らかとなった。



#### 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 4件）

1. The influence of fixation in formalin on the measurement of stability of implants using resonance frequency analysis and Periotest M®: A study in a dog.  
Doi K, Kajihara S, Morita K, Makihara Y, Okada S, Akagawa Y  
Br J Oral Maxillofac Surg, 13 : 00058-2, 2013.  
（査読有り）

2. Inorganic polyphosphates stimulate FGF23 expression through the FGFR pathway  
Sun N, Zou H, Yang L, Morita K, Gong P, Shiba T, Akagawa Y, Yuan Q  
Biochem Biophys Res Commun, 428:298-302, 2013.（査読有り）

3. Development of Novel Implant/Interconnected Porous Calcium Hydroxyapatite Complex as New Concept Graft Material  
Doi K, Oue H, Morita K, Kajihara S, Kubo T, Koretake K, Perrotti V, Iezzi G, Piattelli A, Akagawa Y  
PLOS ONE, 7:e49051, 2012.（査読有り）

4. Influence of formalin fixation on implant stability quotient and bone mechanical characteristics  
Morita K, Doi K, Oue H, Kajihara S, Hayashi K, Akagawa Y

Br J Oral Maxillofac Surg, 12 : 00519-0,  
2012. (査読有り)

[学会発表] (計 3件)

1. Morita Koji, The influence of formalin fixation on implant stability quotient in an animal model, The 8<sup>th</sup> Congress of the Asian Academy of Osseointegration (AAO) , 2-4 November 2012, Taipei, Taiwan

2. Morita Koji, Influence of formalin fixation on implant stability quotient and bone mechanical characteristics, European Association For Osseointegration (EAO) , 10-13 October 2012, Copenhagen, Denmark

3. Morita Koji, Development of composite of poly(P) and bFGF with interconnected porous calcium hydroxyapatite, 2012 Sino-Japan Dental Conference, 26-28 April 2012, Chengdu, China

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森田 晃司 (MORITA KOJI)

広島大学・病院・助教

研究者番号 : 3 0 5 5 5 1 4 9

### (2) 研究分担者

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

研究者番号 :