

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861911

研究課題名(和文) 亜鉛イオンによる骨芽細胞分化促進と骨再生療法の開発

研究課題名(英文) Stimulating effect of osteoblast differentiation and development of bone regenerative therapy applied zinc ion.

研究代表者

遊佐 和之 (YUSA, KAZUYUKI)

山形大学・医学部・医員

研究者番号：80636960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、亜鉛放出型チタンより溶出した溶出亜鉛液を応用した骨再生療法の開発を試みた。溶出亜鉛添加による骨芽細胞分化促進に対する効果に関しては、アルカリフォスファターゼ染色、リアルタイムPCR、アリザリンレッド染色による基質石灰化などの点を検討した。溶出亜鉛液添加により骨芽細胞分化が亢進することが確認された。また、培養7日目の細胞を実験動物皮下および頭蓋骨欠損モデルへ移植した。溶出亜鉛を添加した細胞で著明な骨形成を認めたサンプルもあったが、再生骨量の不安定性と手術部位感染の問題があり、十分な結果は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to develop the bone regenerative therapy applied to zinc ion released from zinc modified titanium. To evaluate the stimulative effect of the zinc ion on osteoblast differentiation, we performed alkaline phosphatase staining, real time PCR, alizarin red staining and von Kossa staining. And we confirmed zinc ion released from zinc modified titanium prominently induced osteoblast differentiation. We transplanted the cell cultured for 7 days into subcutaneous and cranial bone defect of experimental animals, however we did not confirm acceleration of bone formation because of instability of regenerative bone and surgical site infection.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔学顔面再建外科学 骨再生

### 1. 研究開始当初の背景

頭頸部領域における腫瘍の術後や外傷による広範な骨欠損に対する治療法として骨再生療法への期待が高まっている。現在、前述の骨欠損に対する治療法としては腸骨骨髓海綿骨細片や腓骨、肩甲骨などの血管柄付骨移植などが多く行われているが、採取できる骨量、骨質や移植後の手術部位感染、骨吸収などの問題も抱えている。また本法ではドナーサイトとなる健常部への侵襲も避けられない。

組織再生においては細胞、細胞増殖の足場および増殖成長因子の3要素が重要となり、とりわけ骨再生においては骨髄中の未分化間葉系幹細胞を用いた研究が多くの施設で行われている。また、種々の増殖成長因子の添加や転写因子の遺伝子導入などが試みられているが安全性および遺伝子発現の制御など不明な点も多い。

生体内微量元素である亜鉛は骨芽細胞分化におけるシグナル因子の1つとされており、亜鉛放出型チタンの実験動物大腿骨埋入モデルにおいて有意な骨接着性を示すことが報告されている(Clin Implant Dent Relat Res. 2010;12 Suppl 1:e114-25.)。申請者はこれまで前述の亜鉛放出型チタンより溶出された溶出亜鉛液が従来、骨芽細胞分化の増殖成長因子として用いられてきた亜鉛化合物(塩化亜鉛水溶液)と比較して有意に骨芽細胞の分化を誘導する事を明らかにしてきた(Biochem Biophys Res Commun. 2011 26;412(2):273-8.)。この研究成果は溶出亜鉛液が従来行われてきた骨芽細胞分化、骨再生に対する亜鉛化合物の添加の代替となりうる事を示している。

### 2. 研究の目的

本研究では増殖成長因子の添加や遺伝子導入の代わりに亜鉛放出型チタンより溶出された溶出亜鉛液および歯髄幹細胞などの幹細胞を用いて新たな骨再生療法の確立を試みる。

### 3. 研究の方法

本研究では溶出亜鉛液を骨芽細胞の増殖成長因子として応用した新しい骨再生療法の開発を目指すため、以下の2点を計画する。

(1)溶出亜鉛液が様々な幹細胞から骨芽細胞への分化促進シグナルとなることを明らかにする。

(2)分化誘導した細胞を実験動物へ移植し骨組織を形成させ、骨再生療法への応用の可能性を検討する。

上記の計画を遂行するため、以下に示す in vitro、in vivo での実験を行った。

in vitro における検討の予備実験として培地へ添加する亜鉛濃度の希釈系列を設定し、添加する亜鉛濃度は 3.2nM とした。

in vitro での骨芽細胞分化の評価としては、細胞増殖試験、アルカリフォスファターゼ染色、リアルタイム PCR、アリザリンレッド染色、von Kossa 染色による基質石灰化を評価した。

また、細胞ソースとしては歯髄幹細胞を用いた。

in vivo での骨形成評価として、溶出亜鉛液添加下で培養した細胞の実験動物皮下移植実験および実験動物頭蓋骨欠損モデルへの移植実験を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)細胞増殖試験

培養8日目までの細胞数をカウントした。培養8日目までの培養期間において、亜鉛無添加群、塩化亜鉛添加群および溶出亜鉛添加群で細胞増殖に有意な変化は認めなかった。

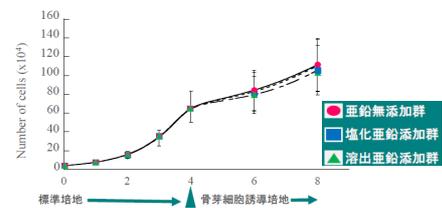


図1 細胞増殖性試験

#### (2)アルカリフォスファターゼ染色

培養7日目のサンプルにおいて固定後アルカリフォスファターゼ染色を行った所、溶出亜鉛添加群において著明な染色性の亢進を認めた。

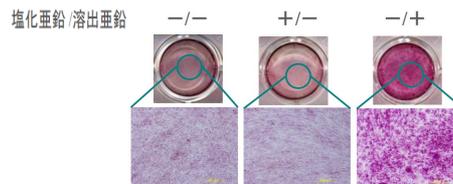
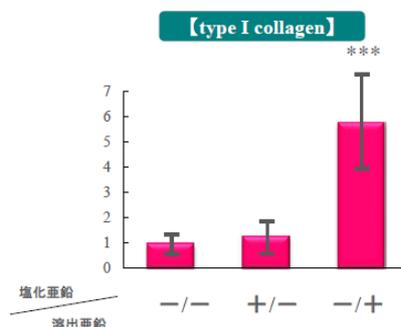


図2 アルカリフォスファターゼ染色

#### (3)リアルタイム PCR

培養7日目のサンプルにおいて mRNA 抽出後、リアルタイム PCR を用いて代表的な骨芽細胞分化マーカーである type I collagen、ALP、osteocalcin(OCN)、RUNX2、BMP2 の発現量を検索した。



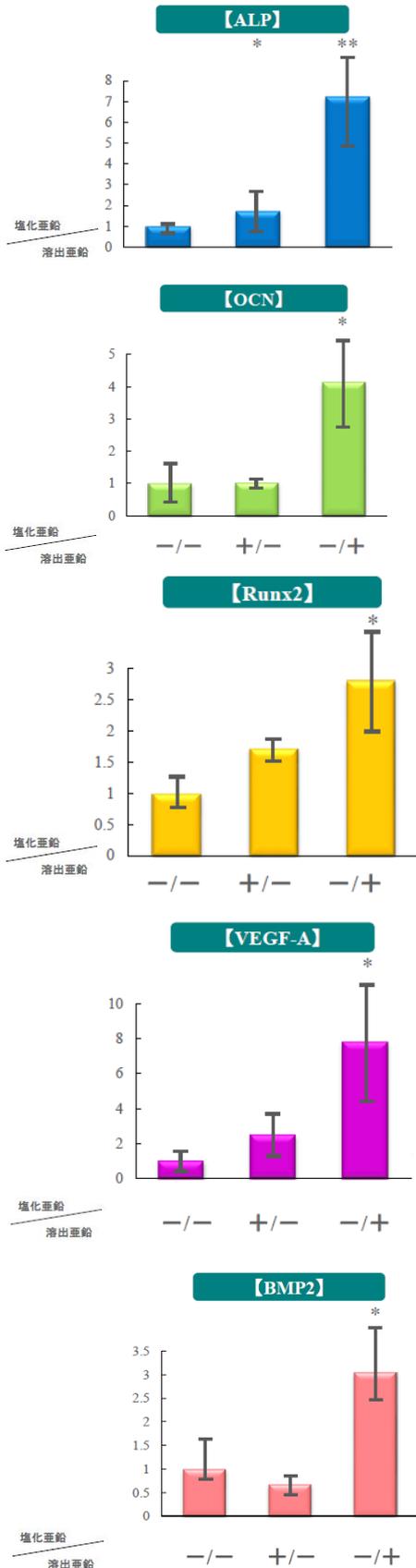


図3 リアルタイムPCR

いずれの骨芽細胞分化マーカーにおいても溶出亜鉛添加群において有意な発現の亢進を認めた。

(4)基質石灰化

培養 14、28 日目のサンプルにおいて固定後、アリザリンレッド染色、von Kossa 染色を行った所、溶出亜鉛添加群において著明な基質石灰化の亢進を認めた。

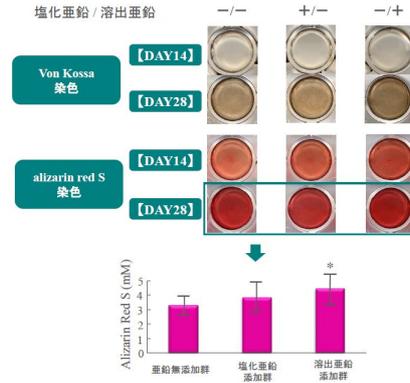


図4 基質石灰化

以上の実験結果をもとに、実験動物への皮下埋入実験および頭蓋骨欠損モデルへの移植実験を施行した。溶出亜鉛を添加した細胞で著明な骨形成を認めたサンプルもあったが、再生骨量の不安定性と手術部位感染の問題があり、十分な結果は得られなかった。

5. 主な発表論文

(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)

尾崎尚、石川恵生、遊佐和之、橘寛彦、櫻井博理、飯野光喜：下顎頭に生じた周辺性骨腫の1例 日口外誌 60 499-503, 2014(査読あり)

遊佐和之、尾崎尚、吉田雪絵、下山泰明、橘寛彦、櫻井博理、菊地憲明、飯野光喜：当科における下顎切除後の再建手術 頭頸部癌 40 426-431, 2014(査読あり)

〔学会発表〕(計10件)

遊佐和之、尾崎尚、山ノ内秀之、橘寛彦、櫻井博理、飯野光喜：下顎切除後の下顎再建およびインプラント治療による咬合再建に関する臨床的検討 第18回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会 ビッグハート出雲(島根) 2014年11月

遊佐和之、尾崎尚、橘寛彦、飯野光喜：当科における下顎再建およびインプラント治

療による咬合再建に関する臨床的検討 日本口腔インプラント学会第 34 回東北・北海道支部学術大会 山形テルサ(山形) 2014 年 11 月

遊佐和之, 高野裕史, 福田雅幸, 尾崎尚, 橘寛彦, 北畠健一郎, 中村麻里奈, 飯野光喜: 水和亜鉛イオンは歯髓由来細胞の骨芽細胞分化を促進する 第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会 幕張メッセ(千葉) 2014 年 10 月

山本修, 遊佐和之, 福田雅幸, 飯野光喜: 亜鉛修飾したインプラントの骨接着性と細菌付着 第 44 回日本口腔インプラント学会学術大会 東京国際フォーラム(東京) 2014 年 9 月

遊佐和之, 山本修, 高野裕史, 福田雅幸, 飯野光喜: 亜鉛イオン含有溶液による歯髓幹細胞の骨芽細胞分化促進作用 第 44 回日本口腔インプラント学会学術大会 東京国際フォーラム(東京) 2014 年 9 月

遊佐和之, 山ノ内秀之, 尾崎尚, 吉田雪絵, 下山泰明, 橘寛彦, 菊地憲明, 飯野光喜: 下顎悪性腫瘍切除後の再建手術に関する臨床的検討 第 40 回日本口腔外科学会 北日本支部学術集会 秋田市にぎわい交流館 AU (秋田) 2014 年 6 月

遊佐和之, 尾崎尚, 吉田雪絵, 下山泰明, 橘寛彦, 菊地憲明, 飯野光喜: 当科における下顎切除後の再建手術に関する臨床的検討 第 38 回日本頭頸部癌学会 東京ファッションタウンビルホール(東京) 2014 年 6 月

遊佐和之, 山ノ内秀之, 尾崎尚, 吉田雪絵, 下山泰明, 橘寛彦, 飯野光喜: 当科における下顎再建の臨床的検討 第 32 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 札幌コンベンションセンター(札幌) 2014 年 1 月

遊佐和之: 新規生体材料および骨再生療法の開発 第 12 回山形歯科インプラントミーティング 山形市歯科医師会館(山形) 2013 年 12 月

遊佐和之: 幹細胞移入療法を目指した骨芽細胞培養法に関する検討 第 2 回 YU-COE 生体機能修復医工学セミナー 山形大学工学部 100 周年記念会館(米沢) 2013 年 8 月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遊佐 和之 (YUSA KAZUYUKI )  
山形大学・医学部・医員  
研究者番号: 80636960