

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870452

研究課題名(和文)顎骨骨膜細胞と骨伝導能を有する新規生体吸収性足場を用いた顎骨再生療法の開発

研究課題名(英文)The feasibility of newly developed bioresorbable porous hydroxyapatite/poly-DL-lactide composite and periosteal derived osteogenic cells for maxillofacial bone regeneration

研究代表者

管野 貴浩(Kanno, Takahiro)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：60633360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：顎骨切除後欠損への低侵襲で効率的な顎骨再建治療の確立を目的に、新規開発された生体活性力を有する生体吸収性足場材料の多孔質u-HA/PDLLA複合体と骨形成細胞として骨膜由来細胞に着目し、治療法開発に向け研究を行った。In vitroにおいて、本足場材料の評価として、骨形成細胞の内部での増殖と分化能について検索をおこなったところ、有意な細胞増殖と骨芽細胞分化亢進が明らかとなった。また、In vivoにてラットを用いた顎骨欠損モデルに移植したところ、従来からの骨補填材料と比較し、有意な骨再生能が形態組織学的検索により明らかとなった。さらに骨膜由来細胞移植は、骨再生を高める可能性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research was to develop and apply feasible and less invasive surgical treatments for maxillofacial bony defects using novel bioactive and bioresorbable scaffold materials of uHA/PDLLA composite for bone regeneration therapy in combination use of periosteal derived osteogenic progenitor cells. In vitro study, we elucidated the osteogenic cells could induce cell viability, growth and osteogenic differentiation in this novel scaffold showing the feasibility as a maxillofacial bony regenerative scaffold material. Further, in vivo study, we developed an animal model of critical bony defect with a diameter of 4mm in mandible using a rat. Then we grafted this scaffold materials into bony defects. The morphological and histomorphological studies obtained in this study showed this novel scaffold might induce bioactive function of osteogenic activity inducing bone regeneration. Also the periosteal derived osteogenic cells might further induce bone regenerative effects.

研究分野：口腔顎顔面外科学

キーワード：顎骨再生 顎骨再建 生体材料 骨芽細胞 足場材料 顎骨骨膜 口腔顎顔面外科

### 1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域において、顎口腔腫瘍切除など各種手術治療により、比較的広範な顎骨欠損とそれらへの再建治療を要する症例は多い。再建には、従来から血管柄付き遊離骨移植に代表される新鮮自家骨を用いた移植手術が広く行われるが、外科的侵襲性と機能形態的合併症は大きい。一方、医療材料工学の進歩から、人工骨による顎骨補填材料の開発が進み、ハイドロキシアパタイトやリン酸カルシウム、コラーゲン材料などを応用した生体親和性の比較的高い生体材料が開発され、臨床で用いられている。しかしこれらの応用は、顎骨の中の歯槽骨レベルでの非常に小さな骨欠損での骨増生・造成に関する研究がほとんどである。

現在、再生医療が注目されるが、顎骨再生については依然として細胞ソースをどこから得るのか、再生の足場材料と成長因子など、臨床応用性の高い組織工学的手法の確立が急務であり、骨形成細胞-足場材料による広範な顎骨再建に向けた有用性の高い複合体形成の検索が求められている。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、新規に研究開発され、整形外科領域等でその有用性データが明らかとされつつある、機械的強度と簡易加工性を有し、また熱変形性能と骨伝導性および高い生体吸収置換性を有することから、顎骨再生の足場材料として画期的新材料と考えられる多孔質未焼成ハイドロキシアパタイト(u-HA)とポリ-DL-乳酸(PDLLA)の複合体(以下 u-HA/PDLLA 複合体)を応用させ、顎骨再生の足場材料としての有用性を検討する。さらに、この足場材料に、近年安全かつ高効率な骨形成誘導が可能と考えられ報告される、骨芽細胞前駆細胞である顎骨骨膜由来細胞を応用し、より効率的な顎骨再生・骨形成手法の確立について検索することは、今後の顎骨再生療法として有用性臨床応用性が高く、顎骨欠損患者への骨再生治療法確立に向けた実験的研究を目的とする。

### 3. 研究の方法

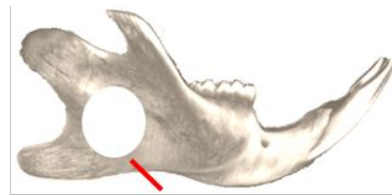
#### In vitro 検索：

u-HA/PDLLA 複合体に関して、顎骨再生の足場材料としての生物学的物性に関して評価検討を行った。

マウス頭蓋冠由来前骨芽細胞様細胞 cell line 株 (MC3T3-E1 細胞) を用いて、u-HA/PDLLA 複合体内部での細胞増殖に関して alamarBLUE® assay を用いて評価を行った。また骨芽細胞分化に関して、定量的評価目的に qRT-PCR を用いて骨芽細胞分化の転写因子である Runx2、Osterix、分化マーカーの Osteocalcin の発現を検討した。比較対象には、同一組成で 3 次元多孔質構造を有さない緻密体 HA/PDLLA を用いた。

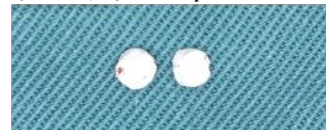
#### In vivo 検索：

一方、In vivo における本新規 u-HA/PDLLA 複合体の顎骨再生の足場材料としての評価検索が必要であるため、Sprague-Dawley (SD) ラット(オス、10 週齢：約 300 330g) を用い、下顎骨に直径 4mm の顎骨欠損モデルを、トレフィンバーを用いて頬舌側貫通骨欠損を作製し Critical bone defect モデルを作製確立し研究に応用した。同部に u-HA/PDLLA 複合体(直径 4mm 厚さ 2mm のディスク)を移植し、1、2、4、8 週にてそれぞれ 3 個体ずつ実験群、顎骨欠損のみコントロール群 1 個体ずつを作製し、それぞれの術後期間にて安楽死を行い、研究検体検体を採取し骨形態学的に Micoro-CT にて、また組織学および免疫組織学的に評価した。



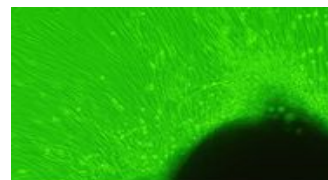
Critical bone defect

#### 多孔質 u-HA/PDLLA



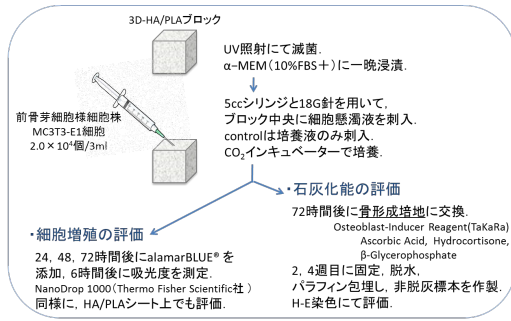
顎骨骨膜由来細胞を用いた多孔質 u-HA/PDLLA と顎骨骨膜由来骨形成細胞複合体による顎骨再生に関する In vivo 検索：

われわれの過去の方法に準じ、クローズドコロニーにて繁殖された同一系統 SD ラット顎骨より採取した顎骨骨膜より Outgrowth 法にて細胞を培養増殖させ、得られた細胞を顎骨骨膜由来細胞として使用した。以降の諸実験には 2 代目の継代細胞を使用した。この顎骨骨膜由来細胞を Ex Vivo にて前述と同様に多孔質 u-HA/PDLLA (直径 4mm 厚さ 2mm のディスク) 内へ、 $2 \times 10^4$  注入移植し多孔質 u-HA/PDLLA - 顎骨骨膜由来骨形成細胞複合体を作製した。と同様に、SD ラット(オス、10 週齢：約 300 330g) 下顎骨に作成した Critical bone defect 部へ移植し、1、2、4、8 週にてそれぞれ 2 個体ずつを作製し、それぞれの術後期間にて安楽死を行い、研究検体検体を採取し骨形態学的に Micoro-CT にて、また組織学および免疫組織学的に評価した。

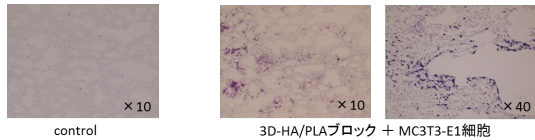
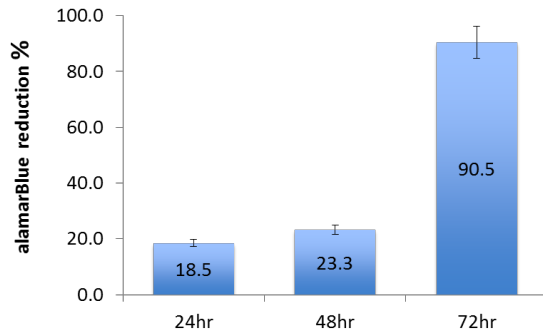


### 4. 研究成果

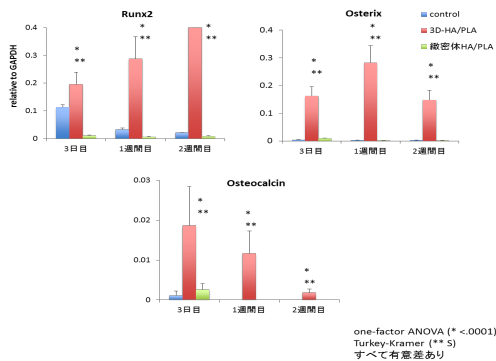
#### In vitro 検索：



・前骨芽細胞様細胞は、3次元 u-HA/PDLLA 複合体にて、経時的に有意な細胞増殖能を示し、また内部への細胞生着と増殖が確認された。さらに骨形成培地に置き換えることで、石灰化能が示された。



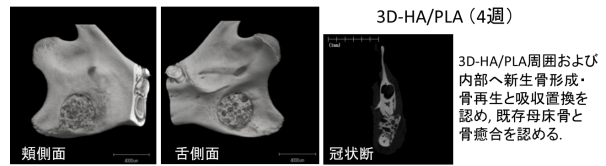
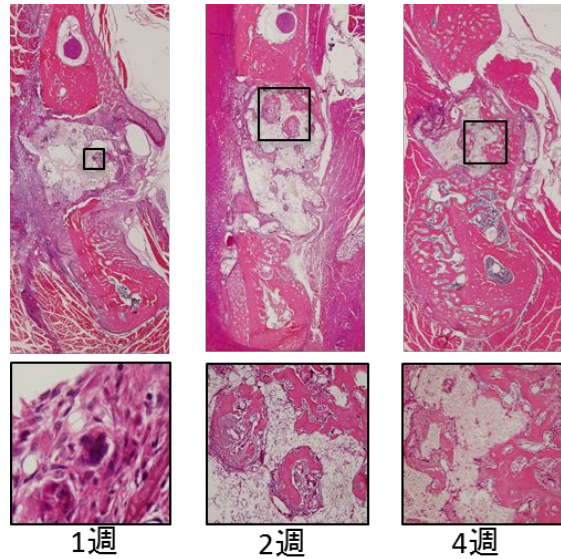
・多孔質 u-HA/PDLLA は、有意に前骨芽細胞様細胞において、骨芽細胞転写因子活性 (Runx2、Osterix) および分化マーカー (オステオカルシン) の発現増強を示した。



#### In vivo 検索：

ラットを用いた顎骨 Critical bone defect モデルによる In vivo モデルでは、1週目より3次元多孔質 u-HA/PDLLA 内への骨誘導再生が認められ、2週以降では顎骨新生が明らかとなり、4週において著明な新生顎骨再生による欠損部の骨架橋が認められた。

さらに Micoro-CT を用いた、また骨形態学評価においても組織学的検索と同様の良好な顎骨再生の足場材料となる可能性が示された。



したがって3次元多孔質 u-HA/PDLLA は、生体吸収性と骨誘導能を有し、さらに熱可塑性と強度から顎骨再生足場材料として非常に有用であると考えられた。

顎骨骨膜由来細胞を用いた多孔質 u-HA/PDLLA と顎骨骨膜由来骨形成細胞複合体による顎骨再生に関する In vivo 検索：

・ラット顎骨骨膜を Outgrowth 法にて細胞を培養増殖させ、得られた細胞を顎骨骨膜由来細胞として使用した。

この細胞は、ALP 活性陽性を示し、骨芽細胞・骨形成細胞の phenotype を示した。

これにより得られた骨膜由来細胞を用いて、多孔質 u-HA/PDLLA - 顎骨骨膜由来骨形成細胞複合体を作製し、ラット顎骨欠損モデルへの移植を行ったところ、組織学および骨形態学的に有用な顎骨再生・骨形成が確認された。しかしながら、明らかな有意性を示すには、さらなる解析検討および客観的評価の必要性和、移植細胞量や3次元複合体としての3次元培養法の確立など、課題も残され、今後本骨膜由来骨形成細胞と多孔質 u-HA/PDLLA による顎骨再生療法確立に向け更なる研究の拡大と方向性が示された。

今回の研究は、ほぼ当初の研究申請および仮定・想定された様な、新規顎骨再生治療への優れた有用性が示され、成果があげられ、成果は国内外の学術大会において発表し、国

内外の学術雑誌へ報告を行うことが出来たことから有用な研究が行え、また今後のさらなる顎骨再生・骨形成研究発展への方向性を示すことが出来た。

#### 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 7 件)

Sukegawa S, Kanno T, Kawai H, Shibata A, Takahashi Y, Nagatsuka H, Furuki Y: Long-term bioresorption of bone fixation devices made from composites of unsintered hydroxyapatite particles and poly-L-lactide. *Journal of Hard Tissue Biology*, 査読有り Vol.24(2):219-224, 2015

doi: <http://doi.org/10.2485/jhtb.24.2192>

菅野貴浩、助川信太郎、成相義樹、恒松晃司、辰巳博人、渡邊正章、古木良彦、関根浄治: コンピューターシミュレーション下に設計したインプラント顎義歯の1例. *顎顔面インプラント誌*, 査読有り, Vol. 13, No. 2, pp. 57-63, 2014.

Kanno T, Sukegawa S, Nariai Y, Tatsumi H, Ishibashi H, Furuki Y, Sekine J: Surgical treatment of comminuted mandibular fractures using a low-profile locking mandibular reconstruction plate system. *Ann Maxillofac Surg* 査読有り vol. 4(2), 2014, 144-149.

doi: 10.4103/2231-0746.147103.

Tatsumi H, Hideshima K, Kanno T, Hashimoto R, Matsumoto A, Ohtani H, Sekine J: Effect of ageing on healing of bilateral mandibular condyle fractures in a rat model, evaluated by cell proliferation and osteochondrogenesis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 査読有り Vol. 43, 2014, 185-193.

doi: 10.1016/j.ijom.2013.07.742.

Imai T, Sukegawa S, Kanno T, Fujita G, Yamamoto N, Furuki Y, Michizawa M: Mandibular fracture patterns consistent with posterior maxillary fractures involving the posterior maxillary sinus, pterygoid plate, or both: CT characteristics. *Dentomaxillofac Radiol*, 査読有り Vol.43(2), 2014, 20130355.

doi: 10.1259/dmfr.20130355.

Kanno T, Sukegawa S, Tatsumi H, Nariai Y, Ishibashi H, Furuki Y, Sekine J: The retromandibular transparotid approach for reduction and rigid internal fixation using two locking miniplates in mandibular condylar neck fractures. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 査読有り Vol. 43, 2014, 177-184.

doi: 10.1016/j.ijom.2013.08.008.

Sukegawa S, Kanno T, Takabatake K, Takahashi Y, Furuki Y: Threaded reduction tool for maxillary manipulation and repositioning with fixation during Le Fort I corrective surgery: Technical note. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Pathology and Medicine*, 査読有り Vol. 25, 2013, 341-342.

doi:10.1016/j.ajoms.2013.01.009

〔学会発表〕(計 6 件)

菅野貴浩、辰巳博人、辰巳香澄、秀島克巳、関根浄治: 新規生体吸収性3次元多孔質u-HA/PDLLA複合体の顎骨再生足場材料としての有用性. 第14回日本再生医療学会総会ポスター発表, 2015.3.19 横浜, パシフィコ横浜

Takahiro Kanno: Up-to-date trend of "Computer Assisted Surgery" in Maxillofacial Surgery. The 39th Biennial World Congress of the International College of Surgeons Symposium 18: Plastic Surgery シンポジウム. 2014. 10. 21~24, 23 Bali Indonesia

Kanno T, Sekine J: Computer-assisted maxillofacial surgery: expanding applications from preoperative simulation to intraoperative smart surgery and the postoperative functional evaluation. 第5回頭頸部顎顔面再建 ADT (Advanced Digital Technology)世界大会 特別講演 ADT 日本部会代表講演 2014. 9. 7 北京 中華民国

Takahiro Kanno, Joji Sekine: The indications and limitations of distraction osteogenesis (DO) in maxillofacial surgery. 2014年第64回ドイツ口腔顎顔面外科学会・学術集会 国際学術シンポジウム 日本口腔外科学会代表講演, 2014. 6. 12 Mainz, Germany

Takahiro Kanno, Joji Sekine: Retrospective clinical study on reliability of pectoralis major myocutaneous flap for reconstruction of surgically induced oral and maxillofacial defect following oral cancer resection. 2014年台湾口腔顎顔面外科学会総会・学術集会, Special lecture, 2014.3.8 Tainan Taiwan.R.O.C

菅野貴浩、助川信太郎、狩野正明、渡邊正章、小池尚史、成相義樹、石橋浩晃、古木良彦、関根浄治: 下顎骨関節突起頸部骨折に対する下顎枝後方アプローチによる観血的整復固定術の有用性. 第58回日本口腔外科学会総会・学術大会 2013.10.11~13, 福岡, 福岡国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/oral/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

管野 貴浩 (KANNO Takahiro)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：60633360

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：