

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462979

研究課題名(和文)3次元配向性コラーゲンマテリアルによる骨再生

研究課題名(英文)Bone augmentation using 3D oriented collagen scaffold

研究代表者

池田 貴之 (IKEDA, Takayuki)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：30366603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：容易で確実な歯槽骨の垂直骨増生は歯科インプラント治療を長期に成功させるために求められている。この研究は3次元配向性コラーゲンを使用して垂直性骨増生の効果を検討した。3次元配向性コラーゲン担体は、分化メディアとラット血液によって形態が変化しない適切な強さを持っており、細胞接着数でコントロールよりも大きな値を示した。マイクロCT画像はコントロールと3次元配向性コラーゲン担体間の骨化比率に違いを示した。また、摘出したラット大腿骨に突起状の骨を認めた。以上の結果から3次元配向性コラーゲン担体は、垂直の骨増生を促進するための新しい可能性であることを示したが、結果は不安定でありさらなる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：Simple and reliably vertical bone augmentation of alveolar bone is desired for enduring achievement of dental implant treatment. This study examined the effects of vertical bone augmentation using 3D oriented collagen scaffold in vitro and in vivo. 3D oriented collagen scaffold had adequate strength as no morphology alteration was observed in culture medium and rat blood. The number of attached cells was significantly greater on 3D oriented collagen scaffold. micro-CT showed a difference in ossification ratio between the controls and the 3D oriented collagen scaffold group.

研究分野：再生歯学

キーワード：3次元配向性コラーゲン 骨増生

1. 研究開始当初の背景

自家骨移植は医科における組織移植において最も歴史が古く本世紀初頭にはすでに臨床応用され、歯科における自家歯槽骨移植も早くから行われてきた。自家骨移植には補填する骨採取の必要性から外科的侵襲が大きく、適用範囲も限られる欠点があるため、自家骨に変わる材料として多くの人工骨が研究、開発され臨床応用されてきた。人工骨とメンブレンを併用する組織再生誘導法は1980年代の初頭に発表され欧米において1986年から臨床応用された。有効な治療法として現在も使用されているが、外科的手技が複雑になるうえ自家骨と同様の骨量を再生することはできず、適用も限られている。自家骨および人工骨を用いる外科手技は多くの経験や修練が必須の処置であるため、より簡便で確実な方法の確立が術者、患者の両者から望まれている。組織工学においてコラーゲンベースのバイオ材料は細胞の挙動を支配する中心的な役割を担っている細胞外基質として広く研究されている。細胞外基質は形態、配向性が細胞の接着、成長等に影響を与え、組織全体の物理的特性、機能にも影響を与えることから、生体内の細胞外基質に基づいた、3次元空間において配向性が自由に設計できるコラーゲン材料の開発が重要とされていた。配向性を付与方法として磁場を利用する方法等が研究されていたが商業ベースでの生産までにはいたらなかったため、抜歯保護材として臨床応用されているコラーゲン材料には配向性が付与されていない。近年3次元配向性コラーゲン材料を設計、作製する技術が米国スタンフォード大学の研究などによって開発され整形外科、眼科等、多くの医科分野において *in vivo*、*in vitro* での試験が継続されている。

2. 研究の目的

歯槽骨再生は歯周病治療およびインプラント治療において必要不可欠な処置である。歯槽骨再生には自家骨、人工骨、人工骨とメン

ブレンの併用などの方法があるが、方法を用いても垂直方向に充分量の骨再生をすることは難しく、術式も複雑である。コラーゲンベースのバイオ材料は取り扱いが容易であるため術式を簡便にできるが、骨再生能において他の材料に劣っている。そこでコラーゲンベースのバイオ材料のなかでも3次元配向性を持つコラーゲン材料を用い垂直方向への骨再生能を明らかにすることで、簡便かつ垂直方向へ充分量の骨再生を可能にすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 3次元配向性コラーゲン材料配向性を付与したコラーゲン線維で形成されたシートを積層することで3次元的な形態が構築できる。シートのコラーゲン線維の数、コラーゲン線維の幅径を変更することで空間密度を変更できる。幅径 0.1mm のコラーゲン線維を 20 本および 30 本配列したシートを積層し、厚さ 7mm、直径 10mm の円柱に成型したコラーゲン材料を作製する。コラーゲン束の配向性は垂直方向(増骨のために)に付与する。比較対照群となるテルブラグ、コラーゲン線維 20 本配列および 30 本配列の材料を培養液中に設置し形体保持力を観測する。

(2) ラット骨髄由来間葉系幹細胞

細胞はラット骨髄由来間葉系幹細胞を 8 週齢の雄 Sprague-Dawley ラットから採取する。細胞採取後 4 日目までに 100mm セルカルチャーディッシュに付着した細胞のみを分離、継代を行う。培養 7 日目までの細胞を使用する。セルカルチャーディッシュに播種する細胞濃度は 3×10^4 個/cm² とし、80% コンフルエントの状態にて担体を設置する。

(3) 接着細胞数

上記の配向性コラーゲン材料において最も細胞が接着しやすい材料を選択するために、コラーゲン設置後、24 時間細

胞を培養し、担体を別のセルカルチャーディッシュに移動させ WST-1(Roche Applied Science)を用い吸光度計 (ELISA) にて測定する。

(4) 細胞増殖

マテリアル設置後、培養4日目に、マテリアルを別のセルカルチャーディッシュに移動させ BrdU(Roche Applied Science)を投与。投与後、吸光度計 (ELISA) にて測定する。

(5) 移植実験

In vitro で決定した3次元配向性コラーゲンマテリアルの条件を基に移植用3次元配向性コラーゲンマテリアルを作製する。

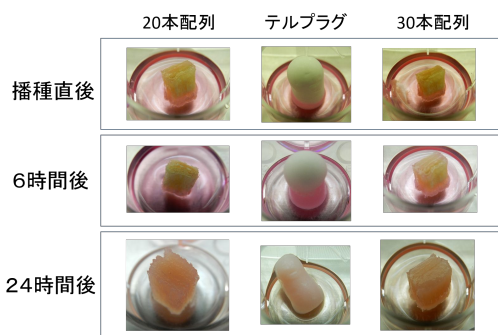
ラット大腿骨に直径3mm 深さ1mmの骨欠損を膝蓋骨から約10mmの部位に作製し、欠損部位に直径3mm 厚さ4mmの3次元配向性コラーゲンを移植する。マテリアルの高さが、残存骨辺縁から垂直方向に3mmになるように設定する。移植後、マイクロCT撮影を行い骨再生量および再生骨の形態を評価する。

4. 研究成果

(1) 3次元配向性コラーゲンマテリアル

配向性コラーゲン担体はテルプラグよりも立体的な強度が強く、配向性コラーゲン繊維20本配列および30本配列ともに培養液に浸漬した状態で24時間経過後も形体を保持していることが明らかとなった。

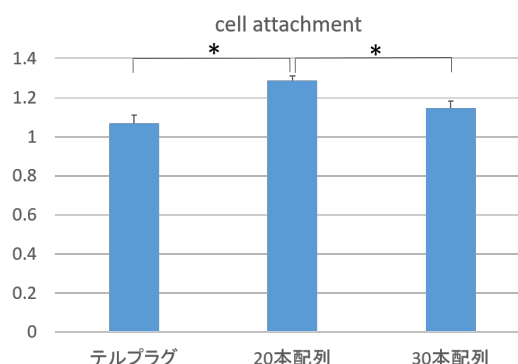
担体の形体保持力は、骨欠損部へ周囲組織が侵入することを防ぎ、骨再生を促すため、骨増生を目的とした担体が保持すべき重要な要件の一つである。



(2) 接着細胞数

3次元配向性コラーゲン担体は配向性を持たないコラーゲンマテリアル (テルプラグ) よりも細胞接着が多く有意であった。また、3次元配向性コラーゲン担体の配向性コラーゲン繊維配列は、30本配列よりも20本配列の細胞接着が多く有意であることが明らかとなった。

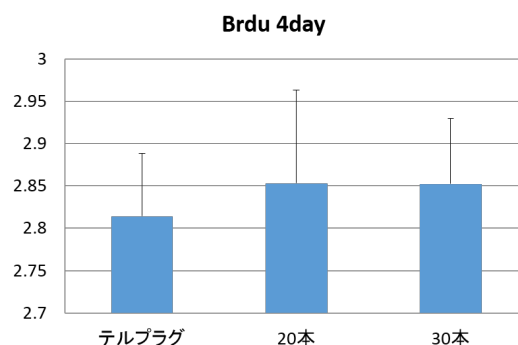
形体保持力などの担体強度は配向性コラーゲン線維の量が増えるほど高くなるが、コラーゲン線維間が狭くなるため、立体として考えた場合、ポーラスサイズが減少する。また、担体の培養液吸収量も減少するため、結果としてコラーゲン線維数の少ない20本配列が30本配列よりも多くの細胞接着を得たと考えられる。



(3) 細胞増殖

細胞増殖は3次元配向性コラーゲン担体とテルプラグで有意な差を認めなかった。また、3次元配向性コラーゲン担体の配向性コラーゲン繊維配列数での有意な差も認めなかった。

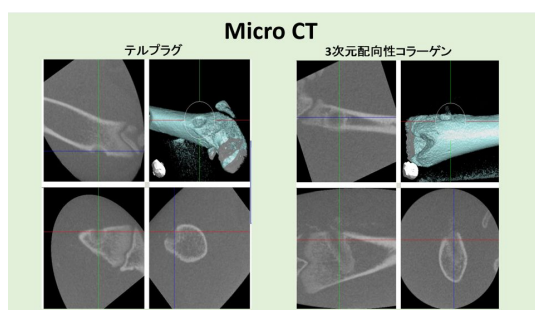
この結果から、細胞増殖数に配向性コラーゲンは影響を与えないと考えられる。しかし、培養中にテルプラグは形体を崩しディッシュ



コ底辺に広がっている。一方配向性コラーゲンは形体を保持していることから、配向性コラーゲン担体の上方では表面に培養液がなく担体内部に吸収した培養液のみとなっている。このような不利な条件下で細胞増殖に差がないことは、配向性コラーゲン担体が優れた細胞増殖能を持っているものと考えられる。

(4) 移植実験

マイクロCT撮影の結果、三次元配向性コラーゲン担体において、既存骨よりも垂直方向に類骨と思われる石灰化像を認めた。これらの結果から三次元配向性コラーゲンの骨増生担体としての可能性が示唆された。しかし、三次元配向性コラーゲン担体の強度はコラーゲン束の幅径やコラーゲン束間の距離および積層する際の接着強度により担体強度が大きく変化する。このため、埋入実験のように担体に外力が加わる条件下では、担体が破損することや、欠損部位からの脱離などを含め結果が安定しなかった。



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 8件)

- Ueno T, Ikeda T, Tsukimura N, Ishijima M, Minamikawa H, Sugita Y, Yamada M, Wakabayashi N, Ogawa T. Novel antioxidant capability of titanium induced by UV light treatment. *Biomaterials*.108:177-86. (2016) 査読有
- Hirota M, Ikeda T, Tabuchi M, Nakagawa K, Park W, Ishijima M, Tsukimura N, Hagiwara Y, Ogawa T. Bone Generation Profiling Around Photofunctionalized Titanium Mesh. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 31(1):73-86.(2016) 査読有
- Akita D, Kano K, Saito-Tamura Y, Mashimo T, Sato-Shionome M, Tsurumachi N, Yamanaka K, Kaneko T, Toriumi T, Arai Y, Tsukimura N, Matsumoto T, Ishigami T, Isokawa K, Honda M. Use of Rat Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells as a Cell Source for Periodontal Tissue Regeneration. *Front Physiol*. 23; 7-50. (2016) 査読有
- Tsurumachi N, Akita D, Kano K, Matsumoto T, Toriumi T, Kazama T, Oki Y, Tamura Y, Tonogi M, Isokawa K, Shimizu N, Honda M. Small Buccal Fat Pad Cells Have High Osteogenic Differentiation Potential. *Tissue Eng Part C Methods*. 22(3):250-259. (2016) 査読有
- Tabuchi M, Ikeda T, Hirota M, Nakagawa K, Park W, Miyazawa K, Goto S, Ogawa T. Effect of UV Photofunctionalization on Biologic and Anchoring Capability of Orthodontic Miniscrews. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 30(4):868-79.(2015) 査読有
- Tabuchi M, Ikeda T, Nakagawa K, Hirota M, Park W, Miyazawa K, Goto S, Ogawa T. Ultraviolet photofunctionalization increases removal torque values and horizontal stability of orthodontic miniscrews. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*.148(2):274-82.(2015) 査読有
- Toriumi T, Takayama N, Murakami M, Sato M, Yuguchi M, Yamazaki Y, Eto K, Otsu M, Nakauchi H, Shirakawa T, Isokawa K, Honda MJ. Characterization of mesenchymal progenitor cells in the crown and root pulp of primary teeth. *Biomed*

Res.36(1):31-45. (2015)査読有

8. Ishijima M, Hirota M, Park W, Honda MJ, Tsukimura N, Isokawa K, Ishigami T, Ogawa T. Osteogenic cell sheets reinforced with photofunctionalized micro-thin titanium. *J Biomater Appl.*29(10):1372-84. (2015)査読有

〔学会発表〕(計 4件)

1. T. Ikeda, T. Narita, Y. Isobe, M. Maruno, N. Gionhaku, M. Honda(2016) Vertical bone augmentation using 3D oriented collagen scaffold, the 45th Annual Meeting & Exhibition of the American Association for Dental Research (AADR), March 18, Los Angeles.(USA)
2. Ikeda T, Hagiwara Y, Narita T, Shioda Y, Kondo Y, Nishio K, Saito H, Gionhaku N, T. Ogawa T (2015) Effect of Photofunctionalization to Soft Tissue Adhesion, 93rd General Session & Exhibition of The IADR, March 18, Boston. (USA)
3. Nishio K., Ito R, Maruno M, Ikeda T, Asano M, Gionhaku N (2015) Elucidation of the Function of Bone Morphogenetic Protein-7 in the Oral Epithelium, 93rd General Session & Exhibition of The IADR, March 14, Boston. (USA)
4. Nakhaei K, Ishijima M, Ikeda T, Hirota M, Torii Y, Sekiya T, Ogawa T (2015) Enhanced Human Oral Epithelial Cell Adhesion on Photofunctionalized Titanium, 93rd General Session & Exhibition of The IADR, March 14, Boston. (USA)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

池田 貴之 (IKEDA, Takayuki)
日本大学・歯学部・専任講師
研究者番号：30366603

(2)研究分担者

祇園白 信仁 (GIONHAKU, Nobuhito)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号：90153262

本田 雅規 (HONDA, Masaki)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：70361623

成田 達哉 (NARITA, Tatsuya)
日本大学・歯学部・助教
研究者番号：50508629