

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463077

研究課題名(和文) PRF + ナノアパタイトと脂肪幹細胞による顎骨再生療法の基礎研究

研究課題名(英文) The study of jaw bone regeneration therapy with the complex of PRF, SHAp, and ASCs

研究代表者

吉澤 泰昌 (YOSHIZAWA, YASUMASA)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：90433812

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)： ハイドロキシナノアパタイト (SHAp) 及びPlate-Rich Fibrin(PRF)の混合物中でヒト脂肪組織から抽出した脂肪幹細胞 (ASCs) を3次元培養し、骨関連遺伝子やタンパク質の発現に関する分子生物学的解析を網羅的に検討した。

マウス頭頂骨骨欠損部にSHAp + PRF + 脂肪幹細胞の複合体を移植し、in vivoにおける骨組織再生の検討をした。

研究成果の概要(英文)： We have successfully purified ASCs from human fat tissue, and three-dimensionally cultured ASCs into mixture of SHAp and PRF. After that, we comprehensively investigated the expression of bone-related genes and proteins with molecular biological analysis.

We have transplanted the complex of SHAp, PRF and ASCs. After that, we histologically investigated the bone regeneration in vivo.

研究分野：口腔外科

キーワード：ハイドロキシナノアパタイト 脂肪幹細胞 PRF スキャフォールド 再生医学

1. 研究開始当初の背景

歯科口腔外科領域の様々な疾患により生じる顎骨欠損に対しては、古くから様々な再建、再生の試みがなされてきた。一般的に骨再生には細胞増殖因子、足場材料、細胞を巧みに組み合わせることが必須条件であることは知られており、骨形成に関わる成長因子の選択、多分化能幹細胞の確保、そしてその細胞の侵入、播種可能な空孔構造を有する適切な足場材料の使用が成功の鍵になると言われている。

しかしながら、研究レベルで有用と思われた各種成長因子や担体が実際の臨床現場では芳しい結果を得ていないのも事実である。その理由としては、実際の骨再生には単一の成長因子の量的多寡によるといった単純な問題ではないこと、有望な担体と思われた新規材料の成長因子の徐放性の問題や為害性(異物性、非操作性など)、多分化能幹細胞の希少性などによる確保の困難性といった様々な問題がある。今回、我々はより安全で確実に骨再生を行うために必要である幹細胞、成長因子、足場材料がないだろうか考えた。そこで、これらの3要素について幹細胞として脂肪幹細胞(ASCs)、成長因子を含む担体として Plate-Rich Fibrin(PRF)、細胞接着の足場としてハイドロキシアパタイトのナノ顆粒(SHAp)に着目した。

まず、ASCs であるが近年、多分化能幹細胞の一つである ASCs が骨細胞を始めとして様々な細胞への分化能を有していることが判明し、その臨床応用に注目が集まっている。美容形成領域では、liposuction といった形で比較的簡便に(低侵襲)、採取された組織はつい最近まで廃棄されていたが、これらの報告によって脂肪幹細胞の採取性の簡便さと量的確保の有利さによって、これまでになく脂肪組織を再生医療へ有効利用できると考えられている。

また、成長因子を含む担体である PRF は従来使用されてきた Plate-Rich Plasma(PRP)とは異なり、採血後に抗凝固剤や異種トロンピンを全く使用せず、1回の遠心分離により抽出される。抽出されたものは血小板と白血球のサイトカインを含みながら、これらを徐々に放出することにより、効率的な幹細胞捕獲効果を発揮するフィブリンネットワーク構造を備えている。PRFのフィブリン基質構

造は新生血管生成を増加させるだけでなく、幹細胞に対して網のように作用し、損傷組織で幹細胞捕獲効果を極大化させる生体治癒物質としても作用する。したがって、PRFの使用により自己血だけで本格的な再生医療を可能にすることが期待されると考えられている。

さらに、細胞接着の足場として期待される SHAp は医療用のカテーテルに應用されている。カテーテルに SHAp を複合化させることにより、SHAp の持つ生体親和性が発揮されカテーテルと皮膚および皮下組織の隙間が閉鎖され、細菌侵入の経路を遮断する。これにより、感染のリスクを減少させ、合併症の発症を防ぐ事が出来る。したがって、SHAp は優れた生体適合性と細胞接着性を有していると考えられる。また、SHAp はハイドロキシアパタイトのナノサイズ粒子であることから、従来の骨補填剤と比較すると骨形成後の破骨細胞による早期吸収が期待され、その分解産物が生体に悪影響を及ぼさず、理想的なスキャポールドになりえることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これら3つのコンビネーションが実際臨床で用いられている骨補填材や成長因子を含む移植材よりも骨形成に対する有用性を証明する事である。

具体的には、ヌードマウスの頭頂骨に骨欠損を作製し PRP 内に ASCs および SHAp を混入後、骨欠損部に移植し、実際の臨床で用いられている骨補填剤や成長因子を含む担体と同様の方法で移植した場合の骨形成性能および骨のリモデリングの状態を組織学的に比較検討し、どのような条件下で利用すれば骨代謝が活発でより生体骨と近似した骨形成を営ませることが出来るかということをも明らかにすることである。また、in vitro においてもこれらの混合物を3次元培養し回収した細胞において骨関連遺伝子やタンパク質の発現が促進しているかを分子生物学的に解析していき、骨芽細胞分化を促進させるための条件を明らかにしていく。

3. 研究の方法

下顎枝矢状咬合改善術を施行した患者から頬脂肪体を採取し、ASCs

を分離する。

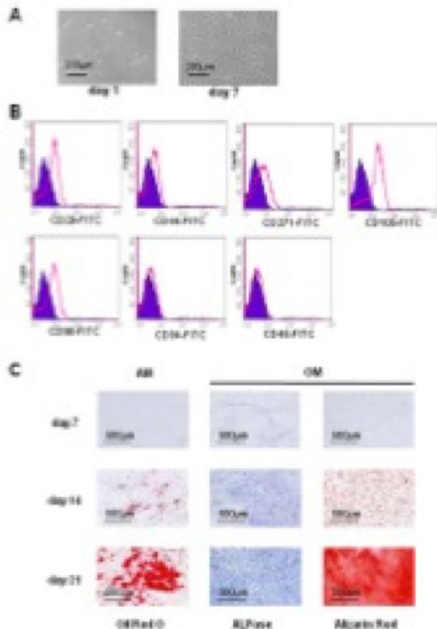
採取した ASCs の年代別に骨芽細胞への分化能を解析する。

PRF に 20%、40%、60%、80% の割合で SHAp を混合し、その中で ASCs を 3 次元培養し、回収した細胞において骨関連遺伝子やタンパク質の発現が促進しているかを分子生物学的に解析する。

マウス頭頂骨に骨欠損を作製し、(1) SHAp+PRF+脂肪幹細胞を骨欠損部に移植する。さらには、ハイドロキシアパタイト、-TCP、Bio-Oss コラーゲンも同様に移植し、これらの骨形成能および骨のリモデリング状態を組織学的に比較し解析する。また、形成された組織の形態計測を行うために μ CT による解析も行う。

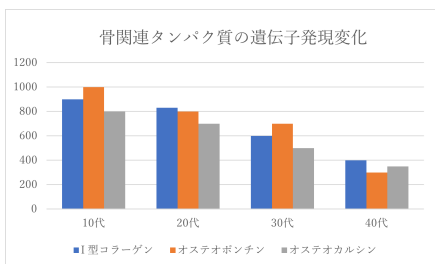
4. 研究成果

・採取した ASCs の多分化能



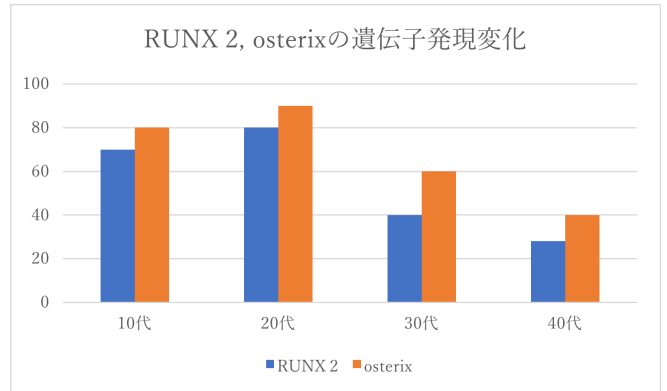
採取された ASCs が多分化能を有する間葉系幹細胞であることが証明された。

・骨芽細胞分化誘導時の骨関連タンパク質遺伝子発現変化



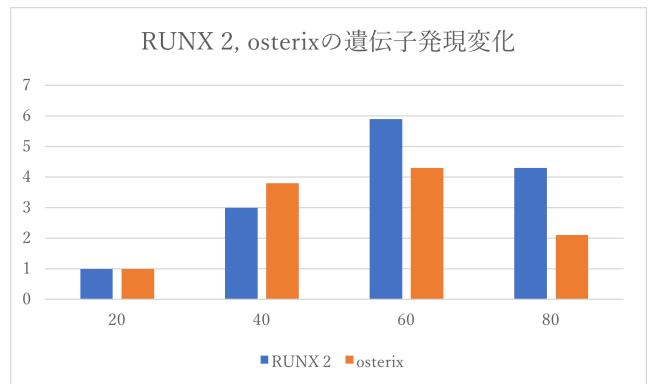
I 型コラーゲン、オステオポンチン及びオステオカルシン蛋白の発現は 10 代、20 代の患者から採取した ASCs で発現が上昇している。

た。

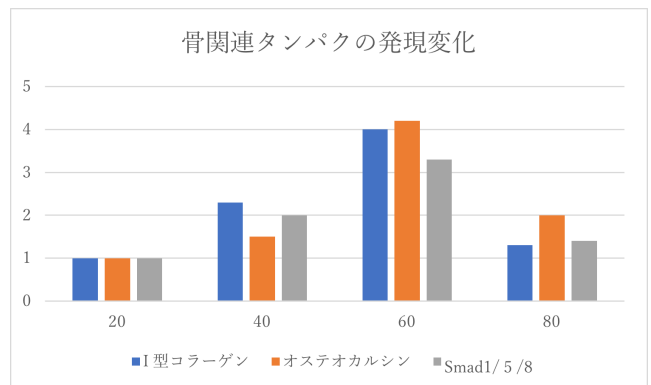


RUNX 2 及び osterix の遺伝子発現は 10 代、20 代の患者でその発現が上昇していた。

・PRF+SHAp+ASCs の混合物の 3 次元培養時の骨関連タンパク及び遺伝子発現変化

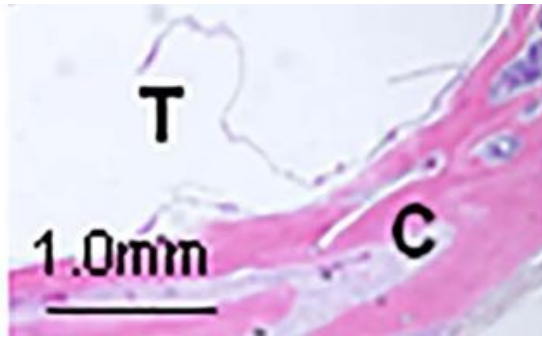


SHAp 60% で培養した ASCs において、有意に RUNX 2 及び osterix の発現が上昇していた。

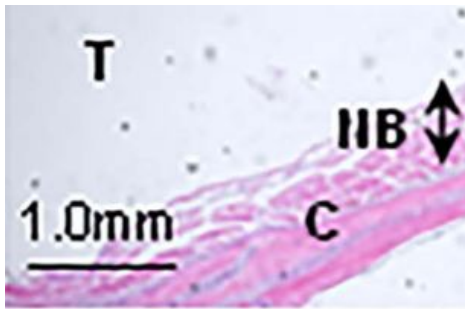


I 型コラーゲン、オステオカルシン及び Smad1/5/8 タンパクの発現が SHAp 60% でその発現が上昇していた。

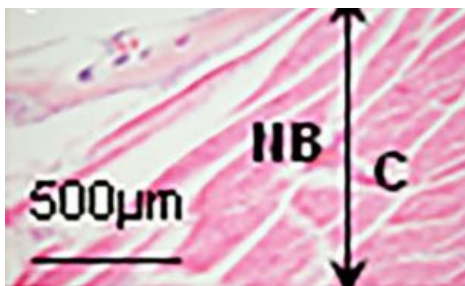
・マウス骨欠損モデルへの SHAp+PRF+ASCs の移植により形成された組織の H-E 染色



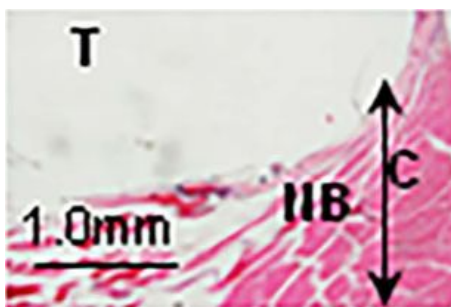
20%



40%



60%



80%

SHAp 60%において、新生骨の形成が最も多く認められた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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
 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉澤 泰昌 (YOSHIZAWA, YASUMASA)
 高知大学・教育研究部医療学系臨床医療部
 門・助教
 研究者番号：90433812

(2) 研究分担者

1. 近藤 誠二 (KONDO, SEIJI)
 昭和大学・歯学部・准教授
 研究者番号：10432634

2. 椋代義樹 (MUKUDAI, YOSHIKI)
 昭和大学・歯学部・助教
 研究者番号：50325099