

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861512

研究課題名(和文)徐放型多血小板血漿と骨伝導バイオマテリアル混合移植による新規頭蓋骨再生治療法開発

研究課題名(英文)Development of cranial bone regeneration method using combination of control-released platelet-rich plasma and osteoinductive materials

研究代表者

清水 梓 (SHIMIZU, Azusa)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00407272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：頭蓋骨欠損に対する骨補填材料として様々な材料が用いられてきた。しかし自家骨採取部の傷や人工骨の感染など課題は多い。そこで創傷治癒促進として最近注目されている多血小板血漿(PRP)を、生体親和性の高い人工骨であるβ-TCPと組み合わせて用いることで骨形成の期間が短縮されるのではないかと考えた。PRPからの成長因子放出を一定期間持続させることでさらに骨形成が促進されることがわかり、この複合体は安全で効果的な骨補填剤となりうる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cranioplasty for defects of the skull is generally performed with nonabsorbable materials or autologous bone. However, these materials are occasionally associated with complication such as infection and donor-site morbidities. Platelet-rich plasma(PRP) promotes wound healing and bone regeneration and its clinical use is rapidly spread. Therefore, we investigated whether a combination of PRP and β-TCP as biodegradable osteoinductive materials could be cut down for bone healing period. Our result also suggested that the slow and continuous release of growth factor from PRP can promote bone regeneration more powerfully, so this material can be safe and effective bone filler.

研究分野：頭蓋顎顔面外科

キーワード：多血小板血漿 PRP 徐放化 頭蓋骨再生 β-TCP

1. 研究開始当初の背景

先天奇形や外傷、あるいは開頭術後の頭蓋骨欠損に対する形成術では、骨新生のための足場として従来チタンやメチルメタクリル酸レジンまたは自家骨が用いられてきた。しかしこれらはしばしば異物反応、感染や自家骨採取部位の変形といった合併症を伴うことがあり、治癒が遅延するなど長期にわたる経過観察が必要である。βリン酸三カルシウム(以下β-TCP)は生体親和性が高く優れた骨伝導能を有するとされ、10年以上前から臨床応用されている。効果的な骨再生が進んでいくには生体内に埋入されたβ-TCPが速やかに分解吸収されることが必要であるが、完全な骨誘導には時間がかかるという欠点がある。我々はこれまでの先行研究の結果、骨誘導促進作用としての塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を徐放化させた徐放化bFGFと、骨新生の足場としてのβ-TCPとの複合体を頭蓋骨欠損モデルに使用した場合に骨新生が促進されることを画像的にも組織学的にも証明した(Shimizu A, Mizuno H, et al, J Tissue Eng Regen Med 2012)。

一方、PRPは血小板がもつ種々のサイトカイン(血小板由来成長因子:PDGF、形質転換成長因子-1:TGF-β、血管内皮成長因子:VEGF、上皮成長因子:EGF、ほか)を産生させ、自己由来のサイトカインを局所で放出させるとされ、再生医療の分野において注目されている方法である。bFGFをはじめとする成長因子を多く含むとされており、とりわけ強力な骨誘導物質である骨形成蛋白(Bone Morphogenetic Protein、BMP)と同じTGFスーパーファミリーに属するTGF-βを豊富に含むため、bFGF単独で用いるよりも一層の骨誘導が期待される。しかしながらPRPからの成長因子放出は一過性であり、数日で効果を失うことから、臨床応用を考えた場合に徐放化は必須である。PRPと徐放化ハイドロゲルとの複合体(以下、徐放化PRP)の骨新生に対する骨誘導促進作用は報告されているが(Hokugo A, Ozeki M, Tabata Y, et al, Tissue Eng 2005) 頭蓋骨欠損のような膜性骨化に対する効果について検証した論文は我々が渉猟し得た限り存在しなかった。よって頭蓋骨欠損への臨床応用を目指した新たな骨充填材料の開発は意義深いものと考えた。

2. 研究の目的

骨誘導促進物質としてPRPをゼラチンハイドロゲルと混和し、β-TCPとともに骨欠損部に移植することで、PRP/徐放化ハイドロゲルから放出される成長因子が持続的に局所に作用し、β-TCPへの骨芽細胞誘導能、破骨細胞誘導能および血管新生能が飛躍的に向上する、つまり骨新生の期間短縮につながると考え、ラット頭蓋骨を用いて検討を行った。また本研究では徐放化PRPとβ-TCPに

よる骨新生促進作用やサイトカインの効果および新生骨リモデリングへの影響を検証し、PRP作成方法やβ-TCPの形態について最も効果的な使用方法を確立すること、すなわち頭蓋顎顔面領域における将来のより一層安全で効果的な骨補填材量の開発を目指すことを目的とした。

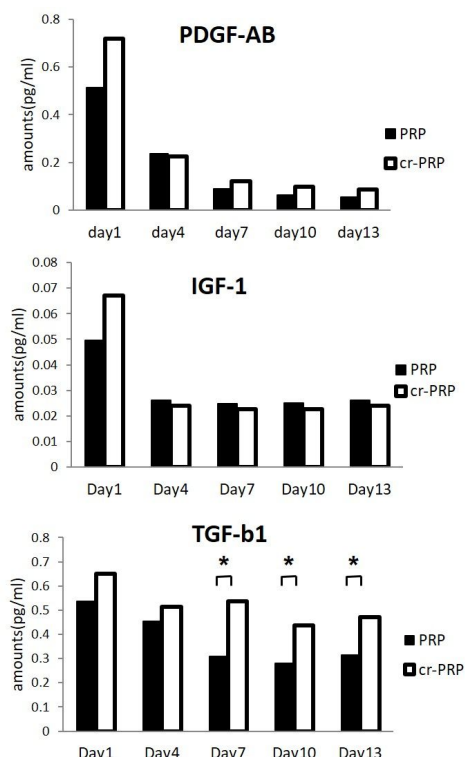
3. 研究の方法

Fisher ratの血液からDouble spin methodを用いて作成したPRPを使用した。PRP作成に当たっては、まず使用する抗凝固剤について検討を行った。PRPをDMEM培養液中で保存した場合の上清に析出される各成長因子量を経時的に解析し、またラット頭蓋骨欠損モデルでの骨新生状況と合わせた結果、EDTAを使用することとして、以降の実験を行った。作成したPRPにゼラチンハイドロゲルを混和させることで徐放化PRPを作成し、DMEM培養液の上清に析出される各成長因子量を経時的に解析した。

続いてラット頭蓋骨形成促進効果の検証として、PRPおよび徐放化PRPを顆粒状、ブロック状に加工したβ-TCPとの複合体とした。コントロール群を含めて5群としてラット頭蓋骨欠損部に埋入し、経時的に観察を行った。摘出した頭蓋骨をμCTを用いて形態学および定量的に評価するとともに、骨新生表面積率や骨代謝関連細胞を各種染色により定量的に評価した。各成長因子(PDGF-AB、VEGF、HGF、IGF-1、TGF-β1)の量を測定した。

4. 研究成果

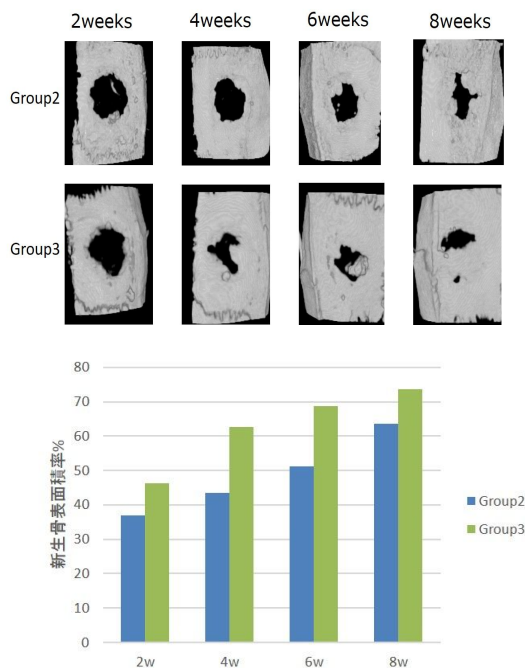
(1) 各PRPからの成長因子放出量の評価



徐放化に使用したゼラチンは2週間で加水分解されるため、2週間後までの成長因子放出量を計測したところ、とくに骨誘導に有効とされる TGF- β 1 において徐放化 PRP からの放出が Day7、10、13 において有意に高値であった。ほかの成長因子である PDGF-AB 及び IGF-1 においても徐放化 PRP のほうがおおむね高値であったが、有意差は得られなかった (n=4)。

(2) μ CT による骨新生率の形態学的評価および定量的評価

頭蓋骨欠損モデル作成後2週ごとに摘出した頭蓋骨検体の μ CT 撮影を行ったところ、グループ 2 の PRP のみに比べ、グループ 3 の徐放化 PRP 群の方がより早期に、より豊富な量の骨欠損断端からの骨新生を認めた。画像処理ソフトを用いた定量評価でも同様の結果であった。グループ 1 のコントロールでは 8 週目でも μ CT において明らかな骨新生は認めず、 β -TCP を使用したグループ 4、5 においては埋入物と新生骨の区別が μ CT では同定不可能であった。

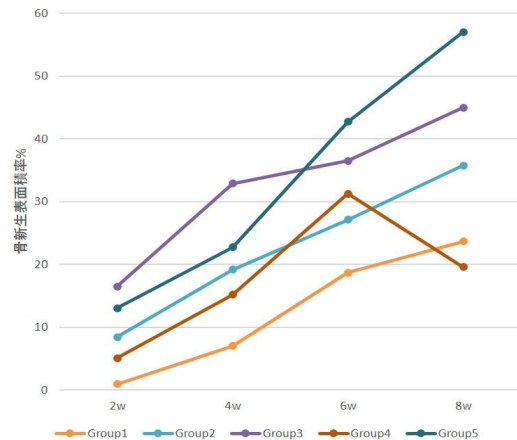


(3) 組織学的評価

新生骨定量評価

μ CT ののち検体を 3mm スライスに薄切して各種染色をおこなった。HE 染色標本から画像処理ソフト KS400 を用いて、骨欠損部面積に対する新生骨表面積率を算出した。その結果、新生骨表面積率はグループ 5 の徐放化 PRP+ β -TCP 顆粒を埋入物とした場合に最も高値であった。グループ 4 の PRP+ β -TCP ブロックを埋入物とした群では、6 週目以降に定量評価での数値が低かった。これは β -TCP ブロックがラット頭蓋骨よりも厚く、垂直方向にも骨新生がおよんだため骨欠損部中央に向かう水平方向の骨新生が影響を

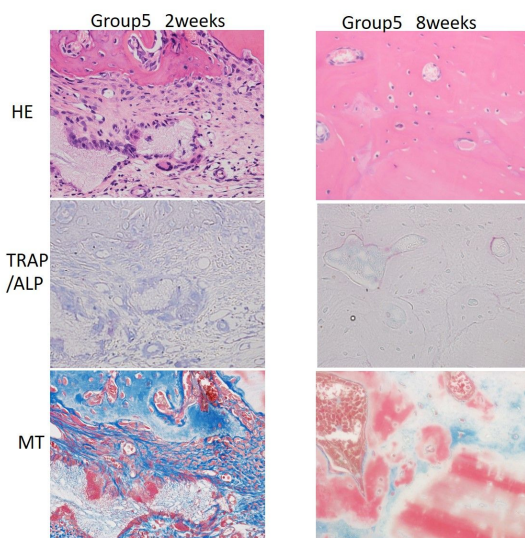
受けたものと思われた。すべての時点においてグループ 2、3 よりもグループ 4、5 のほうが骨新生率は高値であり、骨新生の足場としての β -TCP の重要性が再確認された。



骨代謝関連細胞動態評価

薄切検体の HE 染色、TRAP/ALP 染色、マッソン・トリクローム (MT) 染色を行った。

2 週目において、HE 染色では不規則な形態である線維性骨 (woven bone) を認め、内部にも不規則な血管走行を伴っていた。新生骨の辺縁には骨芽細胞の規則的な配列を認めた。 β -TCP 周囲には破骨細胞と思われる多核巨細胞の増殖を認めた。TRAP/ALP 染色でも同様の所見であり、新生骨形成時から通常の骨形成と同様の骨リモデリングを開始していることが示唆された。MT 染色標本では好塩基性の新生骨と、周囲には膠原繊維が充満しており、徐放化 PRP から放出された各成長因子による活発な細胞増殖が起こっていると思われた。



8 週目においては、HE 染色では血管を中心に同心円状に骨化が進み、既存骨と同様の膜性骨 (membranous bone) が形成されていた。 β -TCP はすでに形態をとどめず新生骨に置き換わっており、旺盛な骨形成が行われ

ていることが示唆された。TRAP/ALP 染色では破骨細胞様の多核巨細胞を多数認め、骨リモデリングが継続して行われていると思われた。MT 染色標本においては新生骨も既存骨と同様に赤く染色され、層状に骨化していることが判明した。

以上の傾向は各グループで同様に観察されたが、とくにグループ 5 において早期に観察されたことから、新生骨の定量評価を裏付ける結果となった。

上記の結果より、徐放化 PRP と β -TCP とを複合体として用いた場合に、膜性骨化においても骨形成を促進させることが判明した。臨床応用においては β -TCP の形態について議論の余地が残るが、この複合体は頭蓋顎顔面領域における安全で効果的な骨補填剤となりうる可能性が示唆された。

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 2 件)

Shimizu A, Komuro Y, Shimoji K, Miyajima M, Arai H: Quantitative Analysis of Change in Intracranial Volume after Posterior Cranial Vault Distraction J Craniofacial surg 27: 1135-1138, 2016(査読あり)

Komuro Y, Shimizu A, Shimoji K, Miyajima M, Arai H: Posterior cranial vault distraction osteogenesis with barrel stave osteotomy in the treatment of craniosynostosis. Neurol Med Chir (Tokyo) 55(8): 617-623, 2015 (査読あり)

〔学会発表〕(計 12 件)

Shimizu A, Akiyama O, Shimoji K, Miyajima M, Arai H and Komuro Y
Quantitative analysis of change in intracranial volume after posterior cranial vault distraction
The 16th Congress of International Society of Craniofacial Surgery (Chiba, Maihama, 2015)

Shimizu A, Tajima S, Tanaka R, Komuro Y, Mizuno H
Effects of Platelet-Rich Plasma for cranial regeneration in a murine model -EDTA vs ACD-A
10thAsiaPacificCraniofacialAssociationConference (Adelaide, Australia, 2014)

清水 梓、小室裕造、田島聖土、上田晃子、水野博司 骨誘導促進材料を用いた骨新生

促進効果と臨床応用に向けて
第 25 回日本形成外科学会基礎学術集会
(2016 年 9 月 15 16 日 大阪府大阪市)

清水梓、田島聖土、水野博司
多血小板血漿 (PRP) 調整方法の違いによるラット頭蓋骨新生への影響 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会(2014 年 10 月 9-10 日、長野県松本市)

清水梓、新行内芳明、水野博司
徐放化 PRP と β -TCP との複合体を用いたラット頭蓋骨新生促進効果 第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会(2014 年 10 月 7-8 日 岩手県盛岡市)

〔図書〕(計 0 件)なし

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 梓 (AZUSA, Shimizu)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 00407272