

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893158

研究課題名(和文) 軟骨・骨組織誘導性ハイブリッド生体材料の構築と新規関節軟骨再建法の開発

研究課題名(英文) Construction of cartilage-bone tissue inducing hybrid biomaterial and Development of new articular cartilage reconstruction method

研究代表者

高畠 清文 (TAKABATAKE, Kiyofumi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：70736537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨・軟骨組織をシームレスに連続した状態で誘導可能な軟骨・骨組織誘導性ハイブリッド生体材料の構築を目的にハニカムTCPを用いた実験を行った。形状の異なるハニカムTCPを用いて軟骨・骨組織を特異的に誘導した結果、直線的貫通孔の孔径75 μ mのハニカムTCPで軟骨形成を認め、孔径300 μ mのハニカムTCPでは骨形成を認めた。

以上のことから、ハニカムTCPの形状を変化させることにより軟骨・骨組織を特異的に誘導することができ、これらをシームレスに連続させることにより関節軟骨を再生できる新規関節軟骨再建法の開発に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to develop the new biomaterial that induce cartilage and bone tissue seamless at the same time. When we induced cartilage tissue or bone tissue specifically by using different shape honeycomb TCP, honeycomb TCP containing through-hole with 75 μ m induced cartilage tissue formation. And on the other hand, honeycomb TCP containing through-hole with 300 μ m induced bone tissue formation.

Therefore we can induce cartilage tissue or bone tissue selectively by changing honeycomb TCP shape, and this finding indicates that the development of new articular cartilage reconstruction method reproduced articular cartilage tissue was suggested when we continue these TCP seamless.

研究分野：口腔病理学

キーワード：ハニカムTCP 軟骨組織形成 骨組織形成 硬組織形成微小環境

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症等、関節軟骨の障害を伴う疾患は本国内で数百万人の患者がいるとされる。進行すると関節運動障害が生じ患者のQOLは著しく低下する。重度の本疾患に関しては大がかりな処置が必要であり患者の負担は極めて大きい。また高齢化社会に伴って患者は増加しつつあり、新規治療法の開発は急務である。

近年の再生医療研究の発達により、様々な組織の再生が可能となっている。軟骨再生研究に関しては、整形外科学領域、歯科領域で研究が盛んに行われている。関節軟骨損傷等の再生治療においては、骨髄から採取した細胞の移植や、軟骨組織や滑膜組織等から採取した細胞を生体材料と共に培養後移植するなど、臨床応用研究が進んでおりその進歩はめざましい。しかし現在の細胞を用いた関節軟骨再生治療は、細胞の生着率、手術時の操作性、回復率など、依然として克服しなければならない多数の課題を含んでいる。また現在の方法では広範囲の軟骨欠損、高度に変形が進んだ変形性関節症には、細胞移植等の適応は難しく治療の選択肢が限定されているのが実情である。

我々は硬組織細胞分化誘導時における細胞外微小環境の重要性に着目し、新規生体材料の開発を行ってきた。ハニカム TCP の焼成温度ならびに生成する TCP 結晶構造の違いが骨形成能に及ぼす影響について検討しており、非常に高い生体親和性を有するハニカム TCP を得ることに成功している。

2. 研究の目的

本研究では、ハニカム TCP の形状を変化させることで硬組織形成微小環境を再現し、軟骨組織および骨組織を特異的に誘導形成する。そしてさらに、ハニカム TCP をもちいて既存関節軟骨相当部に軟骨組織、骨相当部に骨組織を、同時に尚且つシームレスに組織が連続した状態で誘導可能な軟骨・骨組織誘導性ハイブリッド生体材料を構築し、広範囲に損傷した関節軟骨を再生できる新規関節軟骨組織再建法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1)新規性材料ハニカム TCP の作製について
孔径 75 μm 、300 μm 、500 μm 、1600 μm (各サンプル孔数 568 個、37 個、16 個、1 個、直径 3.0 mm、3.0 mm、4.0 mm、2.0 mm) の貫通孔を有する長さ 5mm の円柱状ハニカム TCP を加圧整形、1200 度温度で焼結形成した。(図 1)

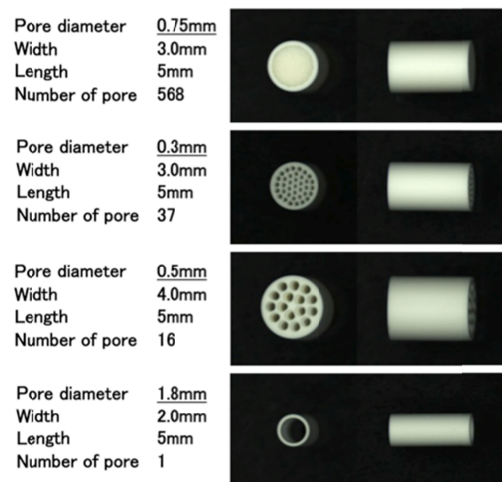


図1 ハニカムTCPの形状

一般的に骨誘導能を有する BMP-2 を各ハニカム TCP に充填し、BMP-2 が各孔径ハニカム TCP に最終的に充填量 1 μg 、500ng、250ng、

125ng となるよう Matrigel® (BD Bioscience 社) と混和し濃度を調整した。コントロールとして Matrigel® 単独をハニカム TCP 孔内に充填したものを作製した。

(2) ハニカム TCP による生体反応について

ハニカム TCP の孔径 (4 種) と BMP-2 濃度 (コントロールを含む 5 条件) によってグループ化し各群間で軟骨・骨組織誘導能について比較検討を行った。各サンプルを 4 週齢 Wistar 系ラットの大腿部筋中に埋入、3 週間後に摘出し 4%パラフォルムアルデヒドで固定、定法にてパラフィン切片を作製、HE 染色、トルイジンブルー染色を施し組織学的観察を行った。尚、本研究において使用した全ての動物は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科の実験動物ガイドラインに従い飼育、使用した。本研究は岡山大学動物実験委員会の審査、承認を受けて行った。

HE 染色標本は Nikon Elipse 80i microscope (Teknootik AB, Huddinge, Sweden), equipped with an Easy Image 2000 system (Teknootik AB) using 103 to 403 lenses を用いて撮影した。HE 染色標本の 100 倍視野で中央、両端、中央と両端の中央、計 5 視野において撮影された画像を Image J1.47v [developed by Wayne Rasband, the National Institute of Health (NHS)] を用いて解析した。各視野において、ハニカム TCP 孔内に形成された骨面積とハニカム TCP 孔内腔の全面積を計測し、骨面積がハニカム TCP 孔内腔に占める割合を算出して 5 視野の平均値を求めた。求められた平均値を各群で比較し、孔径

と BMP-2 濃度別で骨形成および軟骨形成の割合を比較した。

4. 研究成果

(1) ハニカム TCP が硬組織形成率に及ぼす影響について

各 BMP 量における骨及び軟骨形成の割合を示した。BMP を添加しない場合は孔径に関わらず、異所性の骨形成、軟骨形成はともに認められなかった。BMP 量 125ng で全ての TCP 試料で骨組織の形成が認められたが、骨形成の割合は高いとは言えなかった。しかし BMP 量が増加するにつれて骨形成率が上昇し、BMP 量 1000ng では孔径 1600 μm の TCP を除いて全てのサンプルで骨形成を認めた。孔径 1600 μm のハニカム TCP では BMP 濃度にかかわらず他の孔径に比べて骨形成が少ない傾向があった。軟骨形成に関しては 75 μm の TCP 試料を除いて軟骨形成を認めた試料は非常に少なかった。軟骨形成を認めた試料であっても、軟骨組織は試料の極一部に観察されるのみであり、TCP 内腔を軟骨組織が主体となって置換することはなかった。軟骨形成は孔径 1600 μm のハニカム TCP ではいずれの BMP 量でも観察されなかった。(図 2)

しかし 75 μm の TCP においては他の試料と異なり、BMP 量が高い試料において高率に軟骨形成を認めるだけでなく、BMP 量の低い試料においても高率に認められた。BMP が低濃度の 125ng では孔腔内を充填するように軟骨組織の形成が主体として認められ、孔内には血管の侵入はほとんど観察できなかった。トルイジンブルーによる染色では軟骨基質に赤

紫色の軟骨基質特異的な染色像が認められた。
(図3)

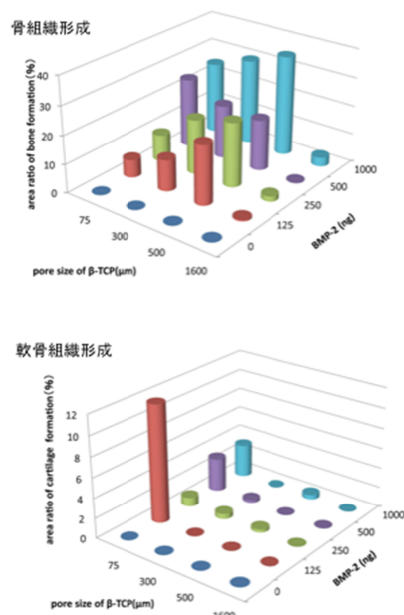


図2 ハニカムTCP形状による骨・軟骨組織誘導

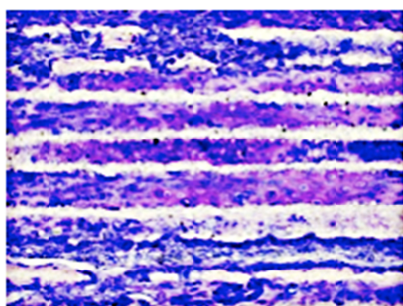


図3 孔径75μmにおける軟骨組織形成
(トルイジンブルー染色)

(2)ハニカム TCP における生体反応について

ハニカム TCP 孔径 75 μm BMP 量 1000ng では孔内には線維芽細胞用の細胞とともに腔内を充填するように骨組織の形成が認められた、血管の侵入性は乏しく炎症性細胞の浸潤はほとんど認められなかった。また一部の孔内腔には内腔を充填するように軟骨組織の形成も認められ、部分的に軟骨組織が石灰化を示す所見も観察された。骨組織形成様式は BMP

量に関わらず同様であったが、BMP 量が低い試料では少量の骨組織と共に軟骨組織の形成が顕著に認められた。

ハニカム TCP 孔径 300 μm BMP 量 1000ng では、骨形成様式は孔径 75 μm の場合と異なり、TCP 内壁に添加するように骨組織の形成が認められた。また新生骨形成は TCP 内壁を被うだけでなく、孔腔内に海綿骨状の骨梁としても少数観察された。骨形成は TCP 中央部分にまで認められ、骨基質周辺には多数の多角形の骨芽細胞が一行に配列しており骨形成活性が高いことが考えられた。また骨組織に囲まれた内腔を貫通するように多数の血管腔形成が認められ、血管腔は TCP 中央部分にまで観察された。血管腔豊富な内腔の一部では多数の血球系細胞の認められる骨髓組織様の組織も観察された。骨組織形成様式は BMP 量に関わらず同様であった。また破骨細胞の出現も認められ TCP が吸収し骨組織に置換する像も散見された。

ハニカム TCP 孔径 500 μm BMP 濃度 1000ng では、孔径 300 μm の TCP とほぼ同様の骨形成様式を示した。しかしながら骨組織に囲まれた領域に明らかな骨髓組織様組織の形成は認められなかった。(図4)

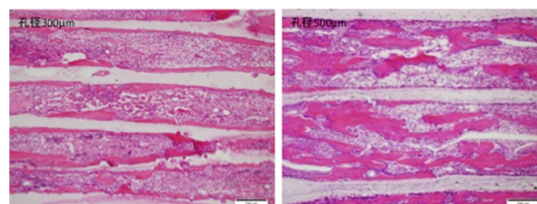


図4

ハニカム TCP 孔径 1600 μm では他の孔径の骨形成様式のどれとも異なっていた。BMP 濃度 1000ng では、孔内腔中央部に孤立性、球状

の骨組織形成を認めたが、その占有堆積は非常に小さかった。形成骨組織周囲には血管と線維芽細胞が認められるが、細胞数に乏しく他の孔径の試料組織と比較すると粗な組織から形成されていた。

(3)ハニカム TCP 内径および BMP 量と硬組織形成に関する解析

ハニカム TCP 孔腔内に形成された軟骨組織および骨組織の面積を各々計測し、孔腔内に占める軟骨組織および骨組織の割合と BMP 濃度の関係を解析した。

骨組織形成に関する解析では BMP を添加していないハニカム TCP では骨組織形成は認められなかった。

BMP を添加した試料では、TCP 孔径に関わらず BMP 量が増加するに従って骨形成量の増加する傾向が認められた。TCP 孔径が骨形成量に及ぼす影響については BMP 濃度に関係なく孔径 75 μm から 500 μm までは孔径が大きくなるに従って骨形成量が増加する傾向が認められた。しかし TCP 孔径 1600 μm では骨形成量の著しい減少が認められ BMP 濃度が上昇しても骨形成量の増加に及ぼす影響は軽微であった。

軟骨組織形成に関する解析では BMP を添加していないハニカム TCP では軟骨組織形成は認められなかった。BMP を添加した試料では、孔径が 75 μm と最も小さく、BMP 濃度が最も低い場合にのみ著しい軟骨組織形成が認められ、BMP 濃度が上昇するに従って軟骨組織面積の減少が観察された。その他の孔径 300 μm と 500 μm の TCP では BMP 量にかかわらず少量

の軟骨組織の形成を認めるのみで、BMP 量との関連性は認められなかった。孔径が 1600 μm では BMP 濃度にかかわらず軟骨組織は殆ど認められなかった。

5 . 主な発表論文

[雑誌論文] (計 1 件)

Shimo T, Matsumoto K, Takabatake K, Aoyama E, Takebe Y, Ibaragi S, Okui T, Kurio N, Takada H, Obata K, Pang P, Iwamoto M, Nagatsuka H, Sasaki A. The Role of Sonic Hedgehog Signaling in Osteoclastogenesis and Jaw Bone Destruction. PLoS One. 11(3).2016:e0151731.doi:10.1371/journal.pone.0151731.

[学会発表] (計 5 件)

高畠清文、辻極秀次、于 湍、伊藤 聡、松田寛之、河合穂高、信長ひかり、中野敬介、長塚 仁 . ハニカム -TCP を用いた骨・軟骨組織形成制御 . 第 36 回岡山歯学会総会学術大会 2015 年 9 月 27 日 岡山

于 湍、高畠清文、辻極秀次、伊藤 聡、松田寛之、信長ひかり、中野敬介、長塚 仁 . ハニカム -TCP の孔径による硬組織再生制御 . 第 24 回硬組織再生生物学会学術大会総会 2015 年 8 月 23 日 大阪

高畠清文、辻極秀次、于 湍、武部祐一郎、伊藤 聡、藤井昌江、松田寛之、河合穂高、長塚 仁 . ハニカム -TCP を用いた幾何学構造による骨・軟骨組織再生

制御．第 69 回 NPO 法人日本口腔科学会学
術集会 2015 年 5 月 14 日 大阪

高嶋清文、辻極秀次、武部祐一郎、藤井
昌江、河合穂高、于 湊、長塚 仁．八
二カム -TCP を用いた細胞外微小環境再
現による硬組織再生．第 56 回歯科基礎医
学会学術大会総会 2014 年 9 月 26 日 福
岡

高嶋清文、辻極秀次、山近英樹、武部祐
一郎、高木 慎、飯田征二、長塚 仁．

硬組織形成過程における細胞外微小環境
としての八二カム TCP．第 68 回 NPO 法人
日本口腔科学会学術集会 2014 年 5 月 8
日 東京

6．研究組織

(1) 研究代表者

高嶋 清文 (TAKABATAKE Kiyofumi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70736537