

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19592255
研究課題名 (和文) 間葉系幹細胞を用いた人工骨膜の <i>in vitro</i> 構築と臨床応用への展開
研究課題名 (英文) Development of the artificial periosteum using mesenchymal stem cell for clinical application
研究代表者
波多野 圭紀 (HATANO KIYOTOSHI)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：10326465

研究成果の概要：

インプラント治療の適応の拡大のため、再生医療が強く望まれている。そこで本研究では多血小板血漿 (PRP) ならびに骨髄から採取した自己幹細胞を骨芽細胞に分化させた細胞塊などによりインプラント埋入周囲の骨欠損に対する骨再生法の可能性について、ビーグル犬を用いて組織学的ならびに組織形態計測学的に検討し、骨窩における骨再生実験において PRP を併用することで骨再生を促進できる可能性があることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：歯科補綴

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：幹細胞、骨再生、歯学、再生医学

1. 研究開始当初の背景

オッセオインテグレートドインプラントを用いて顎口腔機能回復を行う場合、顎骨が不足していると臨床的に大きな問題となる。このような場合、近年多くの症例において Guided Bone Regeneration (以下、GBR と略す) 法で骨形成を行っている。しかしながら、GBR 法による骨再生は、極めて長い期間 (6-12 ヶ月) を要すること、得られる骨の量は限られたものであることなどの問題が山積みしており、現在の GBR 法には限界があるといえる。

そこで、顎骨の量的・質的拡大のために、

最近大きな注目を集めている骨髄幹細胞を用い、望む骨芽細胞に分化させ、それを血液から分離精製した多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma; PRP) と共に用いて人工骨膜を作る新しい再生医療を考えた。すなわち、再生医療のテクノロジーを用いて、埋入されたインプラント周囲の広範囲の骨欠損を修復できるか否かについて細胞学的ならびに形態学的に明らかにし、インプラントの適用を飛躍的に拡大する「間葉系幹細胞を用いた人工骨膜の *in vitro* 構築と臨床応用への展開」を目指した。そこで、前回の研究課題によって確立されたイヌ骨髄幹細胞の培養系

を用い、ビーグル犬の下顎無歯顎部に規格された骨欠損を形成、自己の骨髓から採取した自己幹細胞を補填し、「骨再生の促進」が可能か否かを検討することによってインプラント周囲骨欠損に対する検討を加え用骨再生法の確立を検討した。

2. 研究の目的

埋入されたインプラント周囲の広範囲な骨欠損を修復できるか否かについて細胞学的ならびに形態学的に明らかにし、インプラントの適応を飛躍的に拡大する間葉系幹細胞を用いた人工骨膜の *in vitro* 構築と臨床応用への展開を目的として本研究を計画した。

3. 研究の方法

① イヌ骨髓幹細胞を用いた人工骨膜

動物には雄性ビーグル成犬(体重約 10 kg)を用いた。

骨髓尖針にて動物の腸骨より骨髓液 2 ml を、小白歯部歯間乳頭部の歯槽骨および下顎小白歯の抜去時にその抜歯窩より骨髓液 1 ml を採取した。

それぞれの骨髓液の培養には基礎培地として、Fetal Bovine Serum (HyClone, UT, USA) 100 ml/L およびペニシリンを加えた Dulbecco's Modified Eagle's Medium (SIGMA) を用いた。

Heparin Sodium Salt 196.7 units/mg (Wako) 0.2 % を含んだ基礎培地を Millipore (MILLEX-GV) でろ過し、骨髓液と 1 : 1 とし Low Speed Centrifuge (TOMY) で遠心洗浄後、基礎培地と混ぜ Cell Culture Dish 100 mm × 20 mm (CORNING) 4 枚に 10 ml ずつ蒔き TE-HER 型 CO₂ インキュベーター(平沢製作所)内で、37 °C, 5 % CO₂, 95 % air, 存在下で培養を行った。48 時間毎に培地を交換し光学顕微鏡で Cell を確認した時点から Dulbecco's Phosphate Bufferd Saline (SIGMA) で洗浄後培地交換と 3 μg/ml b-FGF を基礎培地 1 ml に 1 μl 添加し、セミコンフルエントになるまで培養し、細胞を回収後 PLGA 膜(図 1~3)の上に播種し培養した。

② 自己幹細胞および PRP を用いた骨欠損修復モデル

雄性ビーグル成犬 5 頭(体重 9.7-13.1 kg, 年齢 1.2-1.3 歳)を用意し、その下顎左右小白歯および第一大臼歯を抜去した後、3 カ月の治癒期間を待ち、無歯顎部を準備した。

埋入手術に先立って、動物の腸骨より骨髓尖針にて骨髓液 2 ml 採取し、自己幹細胞(MSC)の培養を行った。すなわち、基礎培地として、Fetal Bovine Serum (HyClone, UT, USA) 100 ml/L およびペニシリンを加えた Dulbecco's Modified Eagle's Medium (SIGMA) を用いた。

Heparin Sodium Salt 196.7 units/mg (Wako) 0.2 % を含んだ基礎培地を Millipore (MILLEX-GV) でろ過し、骨髓液と 1 : 1 とし Low Speed Centrifuge (TOMY) で遠心洗浄後、基礎培地と混ぜ Cell Culture Dish 100 mm × 20 mm (CORNING) 4 枚に 10 ml ずつ蒔き TE-HER 型 CO₂ インキュベーター(平沢製作所)内で、37 °C, 5 % CO₂, 95 % air, 存在下で培養を行った。

48 時間毎に培地を交換し光学顕微鏡で Cell を確認した時点から Dulbecco's Phosphate Bufferd Saline (SIGMA) で洗浄後培地交換と共に 3 μg/ml b-FGF を基礎培地 1 ml に 1 μl 添加し、セミコンフルエントになるまで培養した。トリプシン EDTA 処理した後コールターカウンター Z1 (COULTER) で細胞数をカウントし遠心洗浄した。

さらに、埋入手術直前に動物の静脈血を採集後、血球層自動分離システム(SmartPRP®, Harvest Technologies Corp.)を用いて PRP を分離した。

左右の同無歯顎部に円柱状の骨窩(直径 3.75 mm, 深さ 7 mm)を 3 カ所ずつ形成、同時に先に述べた方法に従って各動物の静脈血を採取して PRP および PPP を分離した。各骨窩に①血餅(何も填入せず、対照群)、②凝固させた PRP、③凝固させた PPP、④PRP+MSC 2 × 10⁵、⑤PRP+MSC 2 × 10⁶、⑥PRP + 2 × 10⁷ をそれぞれランダムに満たした後、粘膜骨膜弁にて完全に被覆した。以上の外科的処置はいずれも、硫酸アトロピン(硫酸アトロピン注射液、田辺製薬株式会社)0.05 mg/kg、硫酸クロルプロマジン(コントミン®, 吉富製薬株式会社)1.0 mg/kg の筋肉内注射およびペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®, 大日本製薬株式会社)25mg/kg の静脈内注射による全身麻酔とエピネフリン含有 2 % リドカイン(キシロカイン®, 藤沢薬品工業株式会社)による局所麻酔を併用して行った。

食餌は術後から観察期間終了まで、イヌ用固形飼料を温水に浸漬して作製した軟性飼料を与えた。感染防止のため、術後 1 週間ハセフェム系抗生物質(ケフロジン®, 塩野義製薬株式会社)250 mg/kg を筋注した。

術後 2 週で動物にペントバルビタールナトリウムおよび血液凝固阻止剤(ノボ・ヘパリン注 1000, 日本ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社)5000 単位を静注、総頸動脈に 10 % 中性ホルマリンを注入して灌流固定した。その後、下顎骨を摘出して同固定液中に 48 時間浸漬した。得られた顎骨ブロックを EDTA により脱灰し、通法に従いパラフィン包埋後、骨窩中央部から近遠心方向に約 5 mm 厚の頬舌的切片を作製した。これらにヘマトキシリン-エオジン(HE)染色ならびにマッソントリクローム染色を施し、いずれも光顕的に観察

した。

組織形態計測は、マッソントリクローム染色した標本をスキャナー(ES8000, エプソン販売株式会社)にてパーソナルコンピュータ(Power Macintosh G3, Apple Computer Inc.)に取り込み、画像解析ソフト(NIH Image, National Institutes of Health)を用いて、骨窩の面積に占める再生骨組織の割合を骨面積率として算出することにより行った。これらの値は一元配置分散分析およびFisherの多重比較検定を用い有意水準5%にて統計学的に解析した。

4. 研究成果

全ての動物には観察期間を通じて体重の減少はなく、全身的に良好な状態が維持されていた。また、口腔内においても粘膜の裂開などはなく、良好な治癒を辿っていた。

顕微鏡観察において、血餅群では骨窩の大部分は線維性結合組織で満たされ、再生骨は骨窩の頰側および舌側壁から骨窩の中央部に向かってわずかに認められるのみであった。再生骨組織の大部分は未熟な骨組織であり、その周囲には骨芽細胞様細胞が配列していた(図4-a)。一方、PRP群では骨窩の大部分は再生骨組織で満たされており、血餅群と比較して明らかに再生した骨組織の占める面積は多かった。みられた骨梁は一部層板構造を呈しており、辺縁には骨芽細胞様細胞が配列し、骨形成が進行している様子が窺えた(図4-b)。一方、PPP群では、血餅群とほぼ同様の組織像がみられ、骨窩における再生骨の占める割合はPRP群と比較して明らかに少なかった(図4-c)。また血餅群と同様再生骨組織の大部分は未熟な骨組織だった。PRPに自己幹細胞を加えた3群の組織像を(図4-d, e, f)に示した。骨窩の2分の1から3分の2程度は再生骨組織で満たされており、血餅群やPPP群と比較して再生した骨組織の占める面積は多かった。みられた骨梁は一部層板構造を呈しており、辺縁には骨芽細胞様細胞が配列し、骨形成が進行している様子が窺えた。

組織形態計測の結果は図5に示した。骨面積率は血餅群, PRP群, PPP群でそれぞれ16.1 ± 7.4%, 28.2 ± 8.6%, 20.1 ± 5.6%であり, PRP群は血餅群と比較して有意に高かった(P < 0.05)。一方, PRP群とPPP群を比較するとPRP群の値が大きい傾向を示したものの統計学的には有意ではなかった。

PLGA膜 (12mm × 22mm)

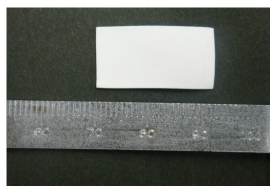


図1

PLGA膜を培養液中に浸漬

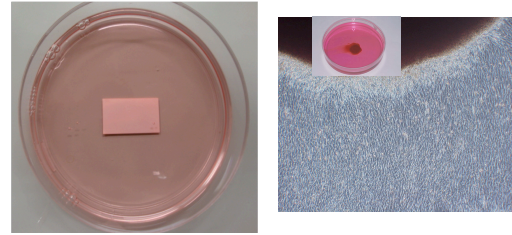


図2

図3

Blood

PRP

PPP

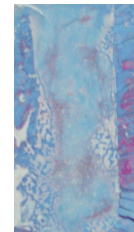
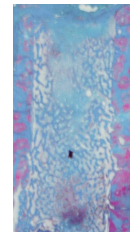
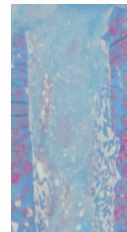


図4a

図4b

図4c

PRP+
2x10⁵cell

PRP+
2x10⁶cell

PRP+
2x10⁷cell

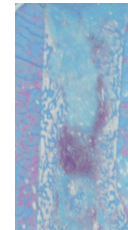
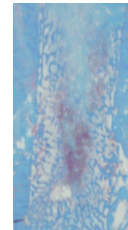


図4d

図4e

図4f

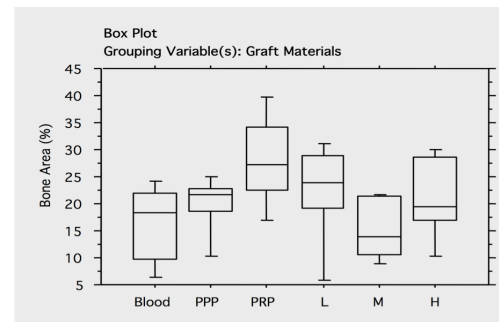


図5

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)

[学会発表] (計 10件)

- ① Toshinaga, A., Masaki, C., Hosokawa, R., Nishihara, T.: Inflammatory mediators induced by mechanical stress in gingival epithelial cell, 86th General Session & Exhibition of the IADR, 2008. 6. 28, Toronto
- ② 伊東佑記、細川隆司、自見英治郎: 進行

性骨化性線維異形成症 (FOP) における ALK2 変異 (R206H) は BMP シグナルを増強する、平成 20 年度日本補綴歯科学会九州・中国・四国支部合同学術大会、大分、2008 年 8 月 30, 31 日、大分

- ③ 丸山俊正、細川隆司、自見英治郎：Thymosin β 4 は NF- κ B シグナルを抑制することにより抗炎症作用を示す、平成 20 年度日本補綴歯科学会九州・中国・四国支部合同学術大会、大分、2008 年 8 月 30, 31 日、大分
- ④ 白石龍太郎、正木千尋、壽永旭博、中野宏俊、古味伸一、寺田征彦、中本哲自、細川隆司：マウス由来歯肉上皮細胞に及ぼす低出力パルス超音波の影響について、第 38 回 日本口腔インプラント学会 学術大会、2008 年 9 月 12, 13, 14 日、東京
- ⑤ 伊東佑記、丸山俊正、正木千尋、中本哲自、細川隆司、胸腺ペプチド (TB4) による抗炎症作用の分子機構の解明、第 38 回 日本口腔インプラント学会 学術大会、2008 年 9 月 12, 13, 14、東京
- ⑥ 丸山俊正、伊東佑記、正木千尋、中本哲自、細川隆司、進行性骨化性線維症 (FOP) の発症を司る BMP 情報伝達機構の解明、第 38 回 日本口腔インプラント学会 学術大会、2008 年 9 月 12, 13, 14、東京
- ⑦ 壽永旭博、細川隆司、西原達次、メカニカルストレスを負荷した歯肉上皮細胞における炎症反応について、第 50 回 歯科基礎医学会 学術大会ならびに総会、2008 年 9 月 23, 24, 25 日、東京
- ⑧ 白石龍太郎、正木千尋、壽永旭博、中本哲自、細川隆司：マウス由来歯肉上皮細胞に及ぼす低出力パルス超音波の影響、第 21 回 日本歯科医学会総会、2008 年 11 月 14, 15, 16 日、横浜
- ⑨ 村嶋勇飛、正木千尋、中本哲自、細川隆司：口腔粘膜サンプルを用いた遺伝子多形解析、第 21 回 日本歯科医学会総会、2008 年 11 月 14, 15, 16 日、横浜
- ⑩ 赤崎洋介、足立和貴、金尾将人、前田崇雄、正木千尋、中本哲自、松尾拓、細川隆司、 β -Thymosins が抜歯窩治癒過程に及ぼす効果、第 26 回 日本口腔インプラント学会九州支部学術大会、2009 年 2 月 21, 22 日、沖縄

6. 研究組織

(1) 研究代表者

波多野圭紀 (HATANO KIYOTOSHI)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10326465

(2) 研究分担者

細川隆司 (HOSOKAWA RYUJI)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60211546

正木千尋 (MASAKI CHIHIRO)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60397940