

平成21年 1月 31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592297

研究課題名（和文）

多分化骨髄細胞移植法によるヒト顎骨再生の効率化および組織生物学的評価法の確立

研究課題名（英文）Evaluation of Biological tissue engineering for craniomaxillofacial surgery.

研究代表者

植野 高章（UENO TAKAAKI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60252996

研究成果の概要：骨に生じる腫瘍や外傷などで喪失した骨欠損部の再生医療の基礎的、臨床的研究が活発に行われている。しかしながら実際の患者顎骨での再生骨の組織学的な骨質構造や骨形成関連蛋白の局在などの解明はほとんどなされておらず、いまだ臨床的な有効性は確立していない。この研究では、こうした再生骨の組織生物学的な骨質構造や骨形成関連蛋白発現などを三次元微細構造学的画像解析法、免疫組織染色法などを用いて形成骨を定量化に成功した。またヒト顎骨から再生された骨についても形成骨の骨質・発現蛋白の定量化に成功した。今後は、これらの結果をもとに精度の高い骨再生医療の開発・評価につなげることが可能となる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：骨再生、新規生物学的診断法

1. 研究開始当初の背景

骨に生じる腫瘍や外傷などで喪失した骨欠損部の再生医療の基礎的、臨床的研究が活発に行われている。しかしながら実際の患者顎骨での再生骨の組織学的な骨質構造や骨形成関連蛋白の局在などの解明はほとんどなされておらず、いまだ臨床的な有効性は確立していない、再生された骨を、組織生物学的に客観的評価を行う事は、再生医療の有効性の比較検討を行う上で不可欠であり、骨再生医療の効率化を計る上で喫緊の課題である。申請者らは、動物を用いた十分な骨再生医療

の基礎的研究を積み重ね多数の国際雑誌に報告してきた。また岡山大学倫理委員会・治験委員会の承認のもと平成17年度より口腔外科手術患者に実際に骨髄細胞を用いた顎骨再生医療を進めており、その有効性を報告してきた（第18回欧顎顔面外科学会2006年、第51回日本口腔外科学会総会2006年）。このように骨再生分野での骨形成は実現しつつあるもののそれぞれの手法についての客観的数値に基づく評価はいまだなされていない。骨再生医療の次世代の研究課題として、こうした生物学的組織診断法の考案が必要とされている。

2. 研究の目的

骨質構造、骨関連蛋白、血管形成過程を解明することは骨の再生後の機能維持に深く関わる重要な命題である。今回の課題でまずラットの頭蓋骨骨形成モデルを用いて、形成骨の評価法としての骨関連マーカーOPN（オステオポンチン）、Runx2、CD34、TRAPなどを用いる。また骨の定量法としてマイクロCTを用いた微細骨量構造解析法を用いて有効性を検証する。また実際のヒト再生顎骨の骨質を超微細X線学的、立体組織分子学的観察法を用いて再生骨の組織生物学的な骨質構造や骨形成関連蛋白発現などを定量化し、それをもとに骨再生医療の新規診断法を確立する事を目的とする。

3. 研究の方法

2007年は、我々が報告した (Ueno et al. Annals Plast Surg 54, 2005) 術式に基づきSDラット頭蓋骨骨欠損モデルを用いて再生骨材用いて行った。移植術式：7週齢SDラットにネブタール全身麻酔 (30mg/kg) 下にラット頭蓋骨に直径7mmトレフィンバーを用いて脳硬膜上にいたる全層骨欠損を作製した。続いて脛骨または顎骨から採取した骨髄： β -TCP (OSferion® G1 Olympus社) をGroup1=4:1, Group2=3:1, Group3=2:1, Group4=1:1の比率で混和し、4種類の移植材を作製移植し縫合閉鎖した。移植後15、30、120日目に薬殺し移植組織片を摘出する。摘出組織をマイクロCT (MCT-100CTB、日立メデイコ) で撮影しTB/TV (骨量率), Tb-S (骨梁間隙), Tb-Th (骨量幅) を計測し骨質評価を予備的に行った。固定液4%パラホルムアルデヒドにて4°Cで3日間浸漬固定後はOCTコンパウンド (Leica:ライカ社) で封埋した組織片をクライオスタットマイクロトーム (Leica CM 3050C、ライカ社) 20 μ mで非脱灰厚切切片を凍結切片作成法で作製した。

1) トルイジンブルー染色、

2) Von Kossa染色

3) 骨形成関連マーカーRunx2、
オステオポンチン (OPN) 抗体

を二次抗体にDAB発色法を用いて顕微鏡観察を行なった。それぞれのグループ切片を画像解析処理を行い、新生骨量:TCP:軟組織比率などを定量し比較検討し、マイクロCT解析 (Scam X mate-A080, Comscan techno. Japan)、組織学的解析を統合して骨形成能の移植法による検討を行い、2008年の臨床応用化の基礎的データを蓄積した。

2008年にはこれらの結果をもとに実際のヒト再生顎骨から採取した骨組織サンプルを μ CTを用いた三次元微細骨梁構造解析、OPN、CD34、TRAP染色等で骨形成能の定量評価

を行なった。

4. 研究成果

平成19年度はラットの頭蓋骨欠損モデルを用いて骨髄/人工骨からの骨再生を研究した。摘出された組織切片を図の如く染色を行ない、それぞれの骨形成過程のマーカーの評価を行なった。

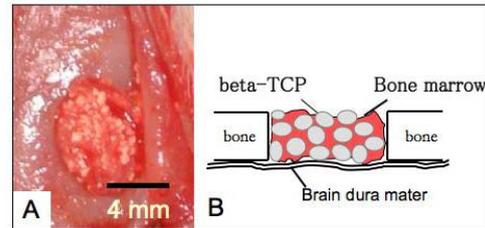


図1

図1の如く、ラットの頭蓋骨に直径4mmの脳硬膜に達する骨欠損を作製し、移植材を充填した。

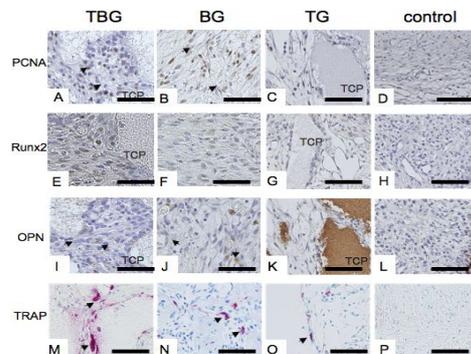


図2

摘出組織をPCNA、Runx2、OPN、TRAPで染色した結果、図2の如く骨形成過程においては細胞増殖マーカー、骨芽細胞分化マーカー、破骨細胞マーカーが明瞭に観察された。一方、骨非形成群ではこれらの細胞増殖・分化マーカーは観察されなかった。また移植後の骨形成は骨形成関連マーカーが多く発現された群の形成骨量が最も多かった。

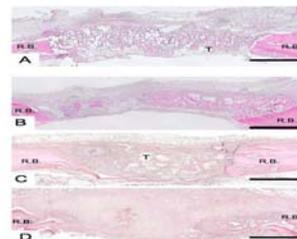


図3

以上の結果より、骨形成マーカーPCNA、Runx2、OPN、TRAPは移植後の早期の骨形成マーカーとなりうる可能性が示唆された。

これらの結果からヒト再生顎骨におけるこ

これらの骨形成関連マーカーの発現を観察した。また骨の形成量を三次元マイクロCTで定量評価した。

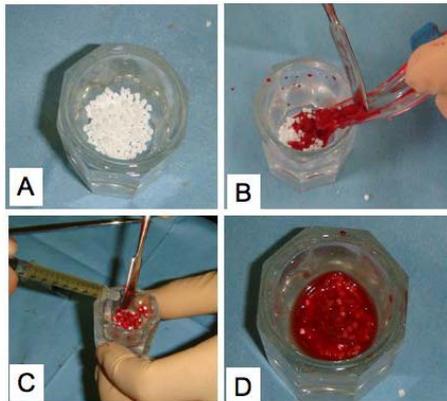


図4

図4は、実際の移植材の作製を示す。人工骨に自家骨を複合し移植材を作製する。

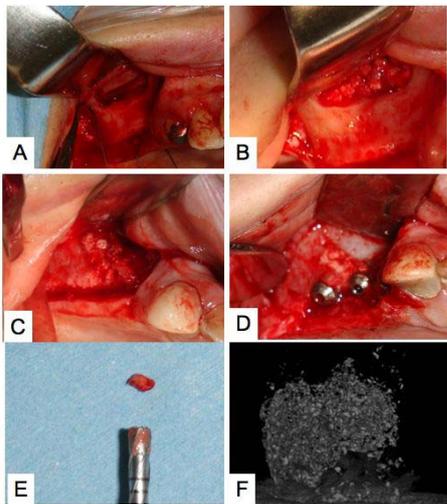


図5

図に実際の移植手術写真を示す。

インプラント手術前のサイナスリフト症例の写真。骨の萎縮した部位に図4で作製した移植材を骨欠損部に移植する(図5A, B)。6ヶ月後には移植された部位は人工骨が観察されるが骨欠損はほぼ閉鎖されている(図5C)。移植後12ヶ月目には移植部は平坦な骨組織となった(図5D)。骨増量部を専用のドリルで採取し(図5E)、三次元画像解析にて石灰化構造を認めた(図5F)。採取された組織から組織切片を作製し観察したところ、人工骨と取り囲むように新生骨が形成される様子が観察された(図6)。

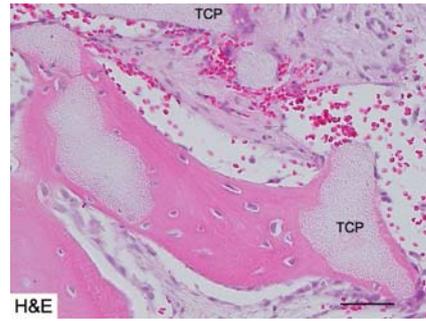


図6

また、これらの組織は免疫染色にて Runx2、OPN を発現する様子が観察された(図7)。

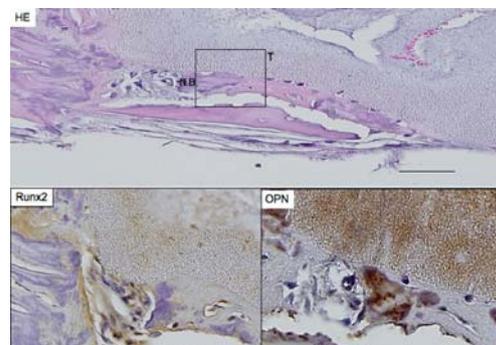


図7

また骨形成が不十分な人工骨周囲には TRAP 陽性細胞が観察された(図8)。

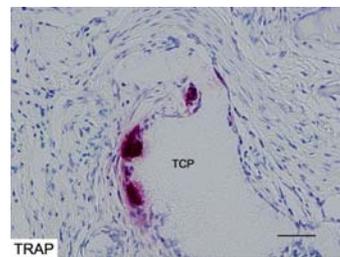


図8

また形成骨組織における骨組織・軟組織・人工骨の比率を測定した結果。いずれの組織においても骨形成が観察された(図9)。

摘出組織の骨、軟組織、β-TCPの比率

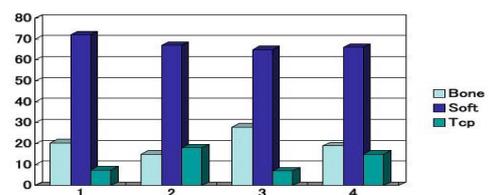


図9

これらの結果から骨形成マーカーとして Runx2、OPN、TRAP 陽性細胞の発現はその後形成される骨組織の形成量を診断するマーカーとなりうる可能性が示唆された。そしてこれらを組み合わせる事により、様々な骨再生材料の有効性を判断する生物学的診断法の確立のためにさらなる研究が必要と思われる。

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 17 件)

- ① Shirasu N, Ueno T, Hirata A, Matsumura T, Yamada T. Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate. Acta Histochemica (in press) 査読有
- ② Yamada T, Ueno T, Mishima K, Sugahara T. Osteomyelitis of the mandible secondary to infantile osteopetrosis: a case report. Oral Surg, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology. (in press) 査読有
- ③ 森谷徳文、山田朋弘、松村達志、植野高章、三島克章、太田晃子、平田泰久
歯性感染症から生じた頸部非クロストリジウム性蜂窩織炎の1例 岡山歯誌 査読有 27, 133-137, 2008
- ④ 山田朋弘、三島克章、井村英人、植野高章
側頸嚢胞の2例、岡山歯誌 査読有 27, 121-125, 2008
- ⑤ 白数信明、植野高章、太田晃子、加納みわ
経口ビスフォスフォネート製剤服用患者の抜歯後に発症した下顎骨壊死の1例
岡山歯誌 査読有 27 127-131 2008
- ⑥ 森谷徳文、山田朋弘、植野高章、菅原利夫
口唇に生じた多形腺腫の2例 日口外誌
査読有 688-692, 54 (12) 2008
- ⑦ 植野高章「歯科インプラント治療のための安全で確実な骨造成術」
第 53 回日本口腔外科総会ミニレクチャーテ

キストブック 査読無 1-9 2008

- ⑧ Yamachika E, Ueno T, Mizukawa N, Sugahara T. Immobilized recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances the phosphorylation of receptor-activated Smad. Journal of Biomedical Material Research: 査読有 88 599-607 2008
- ⑨ 植野高章、平田あずみ、脇本真理、太田晃子、加納みわ、菅原利夫 超高気孔率 HA のラット頭蓋骨骨欠損部での組織学的、X 線学的観察 日本顎顔面インプラント学会雑誌 査読有 6 205-211 2008
- ⑩ 植野高章、平田あずみ、脇本真理、加納みわ、森谷徳文、松村達志、水川展吉、菅原利夫 当科における歯科インプラント前処置としての骨増量術を行った症例の病診連携の検討 日本顎顔面インプラント学会雑誌 6 査読有 219-222 2008
- ⑪ 森谷徳文、山田朋弘、植野高章、松村達志、池田篤司、三島克章：下唇に生じた小唾液腺唾石症の1例、日本口腔診断学会雑誌, 21 査読有 91-94, 2008.
- ⑫ 植野高章、緒方憲一郎、太田晃子、菅原利夫 病診連携により萎縮上顎骨の顎骨増量後に即時荷重インプラント治療を行った1症例 岡山歯誌 査読有 26, 125-128, 2008
- ⑬ Ueno T, Honda K, Hirata A, Kagawa T, Kanou M, Shirasu N, Sugahara T: A histological comparison of bone induced from grafted periosteum with bone induced from grafted bone marrow in the rat calvarial defect model Acta Histochemica 110 査読有 217-223 2008
- ⑭ Sawaki M, Ueno T, Kagawa T, Kanou M, Sakata Y, Honda K, Sugahara T: A case of dental implant treatment for a patient with the bilateral cleft and Palate. Acta Medica Okayama 査読有 62 59-62 2007

⑮Ueno T, Sakata Y, Hirata A, Kagawa T, Kanou M, Sugahara T: Evaluation of Osteogenic Potential of Cultured Periosteum-Derived cell, Journal of Hard Tissue Biology 16 査読有 50-53, 2007

⑯Ueno T, Sakata Y, Kagawa T, Kanou M, Sugahara T: The evaluation of bone formation of the whole tissue periosteum transplantation in combination with beta-TCP. Annals of Plastic Surgery. 査読有 59.707-712. 2007

⑰Sawaki M, Ueno T, Kagawa T, Kanou M, Sugahara T: Clinical investigation of dental implant reconstruction for grafted alveolar cleft patients. Journal of Hard Tissue Biology 査読有 16 87-90 2007

[学会発表] (計 17 件)

①Wakimoto M, Ueno T, Kanou M, Hirata A, Shirasu N, Sawaki M, Aghaloo T, Moy PK, The histological and micro-structural evaluations of MasterGraft® bone substitute. The 24rd Academy of Osseointegration, San Diego, 2008.

②Ueno T, Hirata A, Kanou M, Aghaloo T, Moy P. Early clinical results of rh-BMP-2 for sinus augmentation:microCT, histology, and implant survival. 24rd Academy of Osseointegration, San Diego, 2008.

③太田晃子、植野高章、白数信明、脇本真理 BMPを用いたヒト顎顔面骨欠損の11例の再建症例と今後の展開 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻主催ミニ・シンポジウム2008年12月16日 岡山

④植野高章 CAD/CAMシステムを応用したカスタムメイド人工下顎骨の開発への海外企業とのコラボレーション

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻主催ミニ・シンポジウム

2008年12月16日 岡山

⑤脇本真理、植野高章、松村達志、山田朋弘 Socket Preservation (抜歯窩充填型) 新規人工骨の有効性のUCLA校と岡山大学の共同研究紹介 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻主催ミニ・シンポジウム2008年12月16日 岡山

⑥太田晃子、植野高章、白数信明、脇本真理、加納みわ、松村達志、山田朋弘、森谷徳文 上顎洞根治術後の上顎骨にインプラント治療を行なった1症例 第12回日本顎顔面インプラント学会 2008年12月6,7日 東京

⑦椋代達典、植野高章、澤木康一 上下顎無歯顎患者に行なった即時負荷症例の検討 第12回日本顎顔面インプラント学会学術大会 東京 2008年12月6,7日

⑧白数信明、植野高章、太田晃子、白数明義 頭部X線規格写真(セファロ)を用いて咬合設計を行ない、上顎欠損部に即時負荷を行なった1症例、第12回日本顎顔面インプラント学会学術大会 東京 2008年12月6,7日

⑨脇本真理 植野高章 加納みわ 森谷徳文 山近英樹 三島克章 松村達志: 当科におけるインプラント埋入前処置としての骨增量術の臨床的検討、第12回日本顎顔面インプラント学会学術大会 東京 2008年12月6,7日

⑩加納みわ、植野高章、緒方憲一郎 病診連携下に腸骨移植とインプラント治療を行なった3例、第12回日本顎顔面インプラント学会学術大会 東京 2008年12月6,7日

⑪植野高章、白数信明、澤木聖子、太田晃子、松村達志、山田朋弘 β -TCP (OSferion®) を用いた增量骨の組織学的・免疫・酵素組織学的観察 第12回日本顎顔面インプラント学会学術大会 東京 2008年12月6,7日

⑫植野高章, 白数信明, 太田晃子, 脇本真理,
顎顔面骨再建症例と歯科インプラントの
コンビネーション 第2回 岡山大学病院認定
口腔インプラント講習会 2008年12月3日

⑬植野高章 若手臨床医のためのミニレク
チャー講演 最新の骨造成術のコツ 教育講
演 第53回日本口腔外科学会総会(徳島)
2008年10月20,21日

⑭白数信明, 植野高章, 澤木聖子, 太田晃子,
加納みわ, 山近英樹 経口ビスフォスフォネ
ート製剤服用患者の抜歯後に発症した下顎
骨壊死の一例。
第53回日本口腔外科学会総会(徳島) 2008
年10月20,21日

⑮脇本真理, 太田晃子, 植野高章, 加納みわ,
本多浩三, 松村達志, 山田朋 当科における
萎縮顎骨へのインプラント前処置としての
骨増量術の臨床検討 第53回日本口腔外科学
会総会(徳島) 2008年10月20,21日

⑯山近英樹, 松原正和, 金田祥弘, 白数信明,
太田晃子, 水川展吉, 植野高章 固定化
rhBMP-2による骨形成に関する研究 第53回
日本口腔外科学会総会(徳島) 2008年10月
20,21日

⑰植野高章 ~~rat-experimental-study.~~

~~=The preliminary study=~~

歯科インプラント治療のための組織生物学
的顎骨診断法の開発と応用。

第7回国際バイオフィォーラム(大学・国立研
究所による研究成果発表)

2008年7月2,3,4日 東京 招待講演 DDS,
PhD

Localization of Runx2 and Osteopontin in

[産業財産権]

○出願状況(計 1件)

名称:顎顔面インプラント治療のための骨質

検査方法

発明者:植野高章

権利者:岡山大学

種類:特許

番号:2008-166676

出願年月日:2008年6月

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

植野 高章(UENO TAKAAKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号:60252996

(2)研究分担者

平田 あずみ(HIRATA AZUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号:40263587

(3)連携研究者

なし