

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463136

研究課題名(和文)自己血液より精製したフィブロネクチンを用いた骨造成法の研究

研究課題名(英文)A study of bone formation using fibronectin made from autologous blood

## 研究代表者

真野 隆充(MANO, Takamitsu)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80325125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ELISA法によってラット血液の精製液中にフィブロネクチンの存在を確認した。12週齢ウイスター系雄性ラットの脛骨に骨欠損を形成し、その中にフィブロネクチンを満たし、その上から人工骨を填入した。H-E染色を行い光学顕微鏡で観察した。3週後および6週後、人工骨のみの群では周囲に骨新生が進んでいるがその量は少なかった。一方、フィブロネクチン群においては人工骨を取り囲むように骨新生が進み、その量はコントロールと比較して多かった。免疫組織化学染色では1週後まではフィブロネクチンが骨髓腔内に存在することが確認された。よって、自家骨を用いない新たな骨造成法が行える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A fibronectin made from the blood of the rat was investigated by ELISA method and a fibronectin was confirmed. Furthermore, in the liquid that was preserved after two weeks, a fibronectin was confirmed. The bone cavity was formed in the leg of 12-week-male Wistar rat. The artificial bone (Bio-oss) and a fibronectin were filled in the cavity. For the control group, only artificial bone was filled in the cavity. The specimen was stained with H-E and subjected to light microscopic examination. After 3 and 6 weeks, new bone formation was observed around the artificial bone in the control group, but the amount of the bone is a few. On the other hand, more new bone formation was observed in the fibronectin group compared with the control group. In conclusion, more rapid bone formation was identified using fibronectin made from autologous blood with artificial bone. It was suggested that we could carry out the new bone formation without autologous bone transplantation.

研究分野：口腔外科学

キーワード：フィブロネクチン 自己血液 骨造成

## 1. 研究開始当初の背景

インプラント治療における骨造成のための材料としては自家骨が gold standard と言われている。しかしながら、自家骨を採取するためには腸骨部やオトガイ部などの donor site に侵襲が加わることが最大の欠点である。近年、-TCP やハイドロキシアパタイトなどの様々な人工骨が開発され、これら単独で骨造成が行われてはいるが、大きな骨欠損部においては人工材料だけでは十分に確実な骨造成が行えないのが現状であり、自家骨と組み合わせて骨造成が行われている。

われわれはこれまでにアパタイトをコーティングしたチタンインプラントの研究を行ってきた。われわれが開発したプラストコーティング法によるアパタイトコーティングチタン (BC) は純チタン (Ti) やフレームスプレー法によるチタン (FS) と比較して動物実験において初期より優れた骨伝導性、生体親和性を有することを確認した。近年マイクロアレイやプロテオーム解析を用いた網羅的な遺伝子やタンパク質の発現の検索が行われ、より特異的で効率的な治療法や薬剤の開発が行われるようになっている。われわれが Ti 板上で骨芽細胞を培養し、マイクロアレイ解析を行ったところ、Ti と比較してアパタイトをコーティングした BC や FS において cyclin D1, E-cadherin, Fibronectin, ICAM などの mRNA 発現が増強されていることを確認し、報告した。なかでも細胞接着因子が骨芽細胞の初期の増殖・分化に重要な働きをする可能性があると考えた。

ところで、細胞間接着因子であるフィブロネクチンは創傷治癒過程で重要な役割を果たすことが知られている。山口大学医学部眼科学講座において患者自身の血液より1時間以内に高純度のフィブロネクチン点眼剤を調整するシステムを確立し、臨床において遅延性角膜上皮欠損や反復性角膜びらんの治療にこのフィブロネクチン点眼剤を使用し、その有効性を明らかにしている。そこでこの自己血液より精製したフィブロネクチンに着目し、これを人工骨と併用することでより有効な骨造成ができるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、実験動物を用いて、自己血液より精製したフィブロネクチンと人工骨を併用することでより有効な骨造成ができることを確認し、自家骨移植を用いない新規の骨造成法を開発し、臨床応用を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット血液からのフィブロネクチンの精製

12 週齢ウイスター系雄性ラットの腹腔内にソムノペンチルを投与し全身麻酔をかけ開胸し、直接心臓を穿刺し血液を採取した。遠心分離を行い、血漿を抽出した。10ml カラ

ムに樹脂と樹脂保存液を混和しながら、気泡が入らないように積層した。ゴム栓を装着し、クランプを閉じ、カラムとペリスターポンプを接続し、クエン酸添加リン酸緩衝液 (C-PBS) を約 10 分間流し平衡化した。カラムに抽出した血漿を注入し、C-PBS で約 10 分間カラム内を洗浄した。その後、L-アルギニン溶出液 (L-ARG) をカラムに流し、出てきた液をマイクロチューブに採取した。最後にゲル濾過用スピンカラムを用いて溶液中の L-ARG を取り除き、フィブロネクチンを精製した。

### (2) 精製物の確認

精製した液体をサンドイッチ法 ELISA プロトコルに従い抗原・抗体反応をさせ、吸光度を測定することによりフィブロネクチンの確認を行った。

### (3) ラット脛骨を用いた骨造成の検討

実験動物として 12 週齢ウイスター系雄性ラットを用いた。ソムノペンチルでラットに全身麻酔をかけ、ポピドンヨード液でラットの下肢を消毒し、下肢部の切開、剥離を行い、脛骨を露出した。フィッシャーバーを用いて脛骨に 2×8 mm の骨欠損を形成し、人工骨のみを填入したものをコントロールとした。人工骨として Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG, Switzerland) を使用した。反対側には精製したフィブロネクチンをピペットを用いて形成した骨欠損に注入し、その上から人工骨を填入した。切開部は 4-0 バイクリルを用いて閉創した。3 日、1 週間後、3 週間後、6 週間後に脛骨を摘出し、ホルマリンで固定後、ギ酸を用いて 2 週間脱灰し標本を作製した。5µm の切片を作製し、H-E 染色を行い、光学顕微鏡で観察を行った。

### (4) フィブロネクチンの検出

上述で作製した切片 (3 日、1 週間後、3 週間後、6 週間後) を用いて、フィブロネクチンが経時的にどのように変化するか、またいつごろ消失するかを免疫組織化学染色 (ABC 法) により検討した。

なお、この研究は山口大学動物管理使用委員会の審査を受け「山口大学動物に関する規定」、「動物の愛護及び保管に関する法律」および「研究機関における動物実験等の実施に関する基本指針」の規制に基づいて行われた。

## 4. 研究成果

### (1) ELISA 法によるフィブロネクチンの確認

吸光度を測定すると精製した直後のものでは 0.727、4 週凍結保存したものでは 0.706 であった。これをスタンダード曲線で濃度に変換すると精製した直後のものでは 1700pg/ml、4 週凍結保存したものでは 1500pg/ml であった。

### (2) 組織学的検討 (H-E 染色)

3 日後

3 日後においては、コントロール群、フィブロネクチン群ともに人工骨周囲に骨新生

はみられず，形成した腔にはまだ血球が充満しており，両者に差はみられなかった（写真1A, B）.

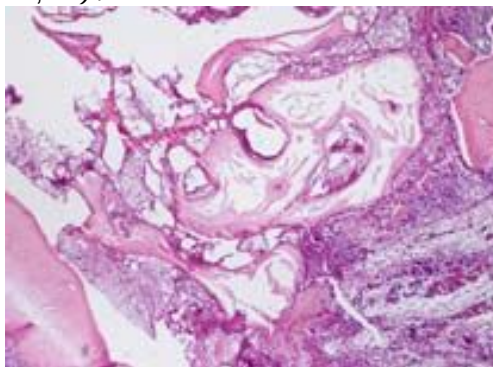


写真 1A コントロール

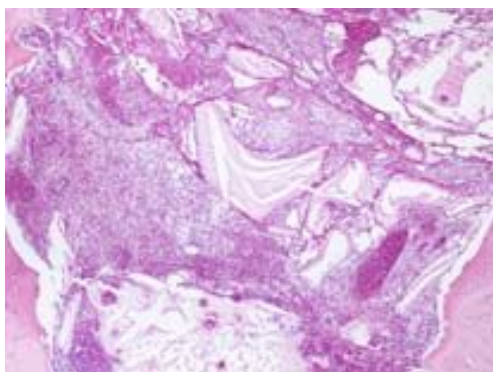


写真 1B フィブロネクチン

#### 1 週後

両者とも形成した腔に血球が残存しているが，3 日後と比較して血球はかなり減少していた．また，両者ともに人工骨周囲に一部において骨新生がみられる部位が観察された（写真 2A, B）.

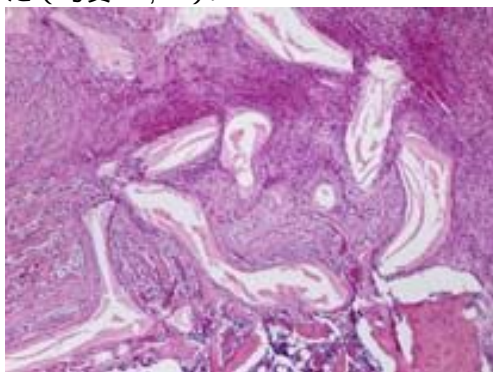


写真 2A コントロール

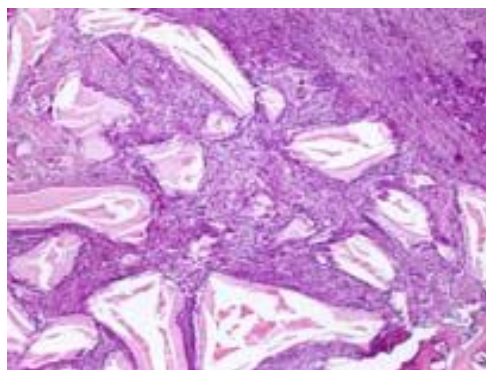


写真 2B フィブロネクチン

#### 3 週後

コントロール群においては人工骨周囲に骨新生が進んでいるがその量は少なかった．一方，フィブロネクチン群においては人工骨を取り囲むように骨新生が進み，その厚さや量はコントロール群と比較して多かった（写真 3A, B）.

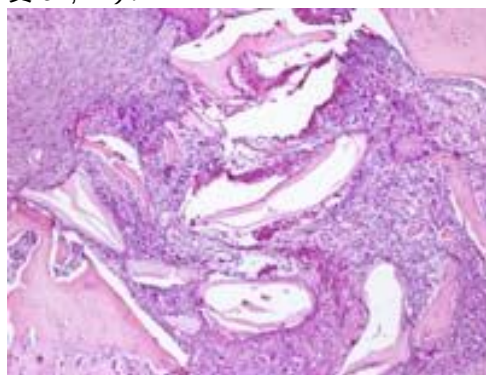


写真 3A コントロール

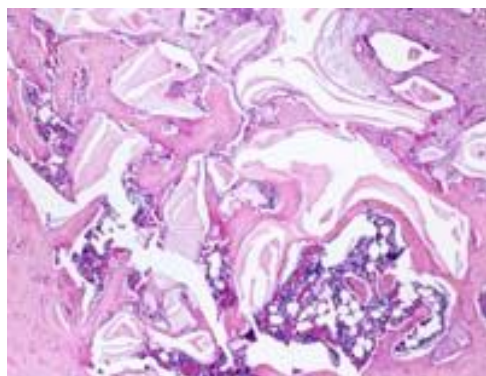


写真 3B フィブロネクチン

#### 6 週後

コントロール群においては皮質骨を削除した部位に骨新生がみられるが，一部連続性がみられず不完全な部位が観察された．一方，フィブロネクチン群においては皮質骨が形成され既存骨と連続した骨形成が観察された．また，両者ともに人工骨は吸収されず残存していた（写真 4A, B）.

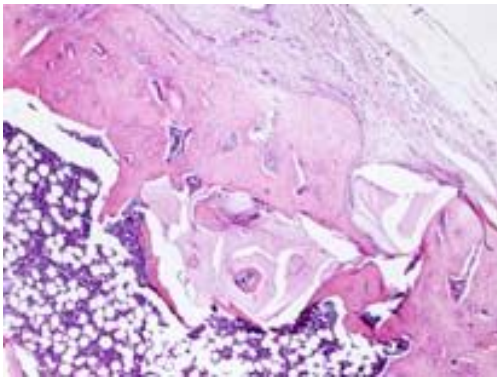


写真 4A コントロール

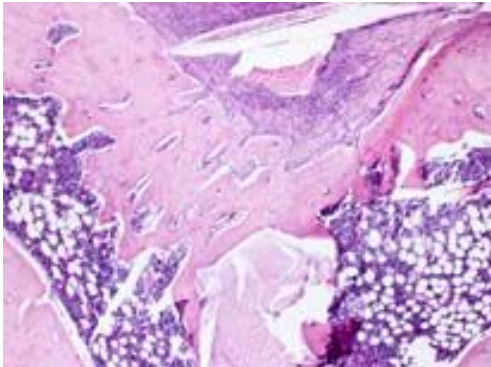


写真 4B フィブロネクチン

### (3)免疫組織化学染色(フィブロネクチン)

3日後

コントロール群において、血液中にフィブロネクチンが含まれているため、骨髓腔内のまばらに免疫染色で要請の部分がみられた。一方、フィブロネクチン群では骨髓腔内に広く陽性所見を認め、コントロール群と比較しても広がった(写真 5A, B)。

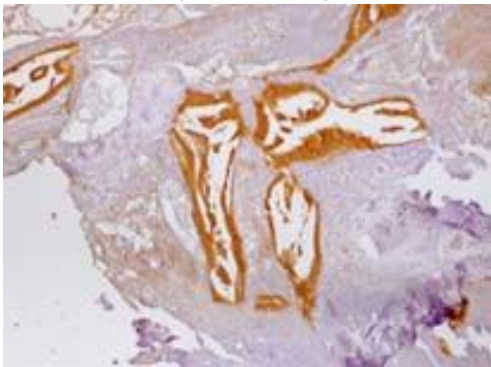


写真 5A コントロール

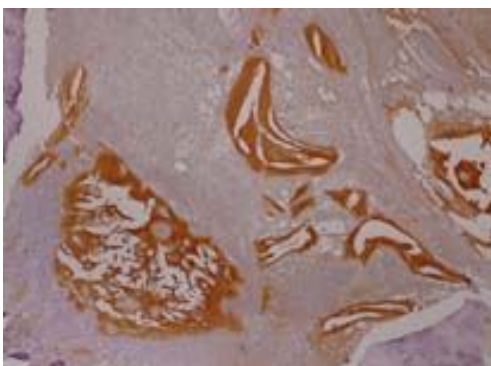


写真 5B フィブロネクチン

1週後

コントロール群、フィブロネクチン群いずれにおいても、骨髓腔内の染色された部分は少なくなっていたが、フィブロネクチン群のほうが陽性の部分は広がった(写真 6A, B)。

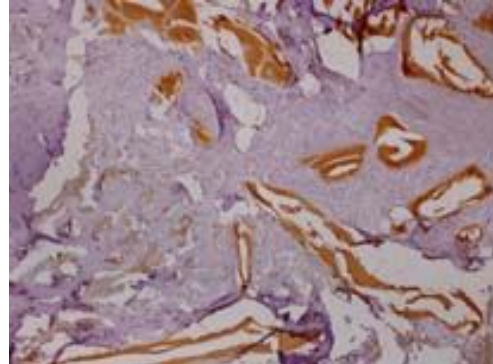


写真 6A コントロール

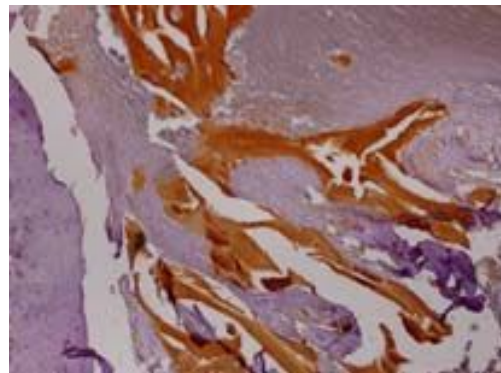


写真 6B フィブロネクチン

6週後

コントロール群、フィブロネクチン群ともに骨髓腔には新たに骨髓が新生されており、細胞成分に陽性所見を認めた。これは注入したフィブロネクチンではなく、新たに血流が再開され、血液中のフィブロネクチンが陽性になったものと考えられた(写真 7A, B)。

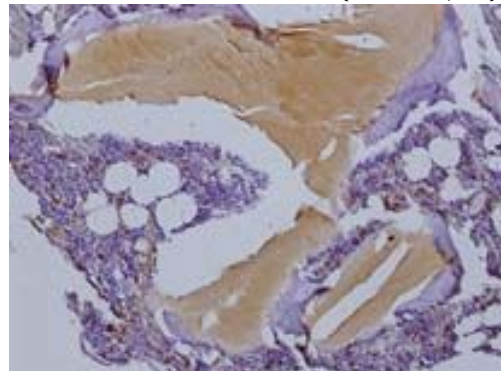


写真 7A コントロール

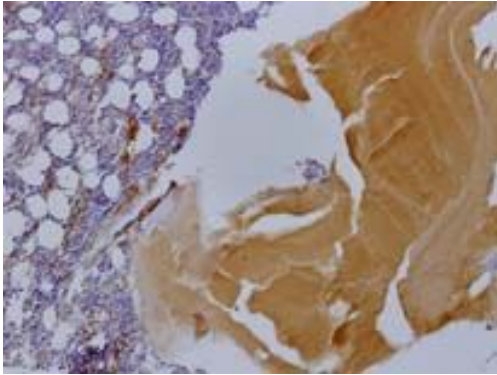


写真 7B フィブロネクチン

ELISA 法によりラット血液より精製したフィブロネクチン含有することが確認された。さらに4週間凍結保存しておいたものからも同様にフィブロネクチンを検出することができた。よって、ある程度の期間の保存が可能であることがわかった。

チタン表面へフィブロネクチンなどの細胞接着蛋白をコーティングすると、細胞の初期接着を促進し、骨芽細胞の分化を促進するといわれている。本研究において、自己血液より精製したフィブロネクチンは人工骨と併用することでより早い骨造成がおこることが動物実験において組織学的に確認された。人工骨にフィブロネクチンを塗布することで、人工骨への骨芽細胞の接着が促進され、初期における骨形成が促進されたことが推測された。この結果より、フィブロネクチンを用いることで自家骨を用いない新たな骨造成法が行える可能性が示唆された。

免疫組織化学染色により生体内に埋入されたフィブロネクチンはどのような挙動をとるのか、いつ頃まで体内に残留するかを検討した。その結果、注入したフィブロネクチンは埋入1週間においても確認されたが、6週間においては骨髄組織の再生に伴い消失していた。したがって、数週の期間はフィブロネクチンの効果が発揮できるものと思われる。

今回の研究で、フィブロネクチンにはあまり粘性がなく骨造成を行う部位の形態によってはそこにとどまらせることが困難な可能性も考えられた。よって、今後このフィブロネクチンに粘性や接着性を持たせればさらに効果的な骨造成が行える可能性が考えられた。

#### <引用文献>

Mano T, Umeda H, et al.: Comparison of apatite-coated titanium prepared by blast coating and flame spray method -Evaluation using simulated body fluid and initial histological study-. Dental Materials Journal 30: 463-469, 2011.  
梅田浩嗣, 真野隆充, 他, : プラストコーティングチタンの骨芽細胞増殖・分化における細胞接着因子の発現 .日本口腔科学会

雑誌 62: 157, 2012

Nishida T, et al: Fibronectin eyedrops for traumatic recurrent corneal lesion. Lancet 2: 521-522, 1983.

安東俊夫, 他: フィブロネクチンコートチタン上の骨芽細胞の Syndecan-4 遺伝子の発現 .日口腔インプラント誌 22:471-477, 2009 .

#### 5 . 主な発表論文等

〔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)  
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

真野 隆充 (MANO, Takamitsu)  
山口大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 8 0 3 2 5 1 2 5

##### (2)研究分担者

梅田 浩嗣 (UMEDA, Hirotugu)  
山口大学・医学部附属病院・診療助教  
研究者番号: 9 0 6 1 0 6 1 8

##### (3)連携研究者

なし