

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870043

研究課題名(和文) OCP/CollagenとMSCとの複合体による骨再生法の確立

研究課題名(英文) A study of bone regeneration by OCP/Collagen combined with MSC

研究代表者

川井 忠 (KAWAI, Tadashi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50547263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、リン酸オクタカルシウム・コラーゲン複合体(OCP/Collagen)と間葉系幹細胞(MSC)の複合体(OCP/Col・MSC)による骨再生を確認することを目的とした。イヌ下顎骨辺縁切除モデルの骨欠損を用いたが、OCP/Collagen単体でも十分な骨再生を認めるため、OCP/CollagenとOCP/Col・MSCの比較が困難と判断された。骨欠損モデルを下顎骨区域切除に変更し、その術式を確立した。イヌ下顎骨区域切除モデルを使用することにより、OCP/Collagen単体とOCP/Col・MSCとの骨再生能の評価が可能になると考えられ、次年度以降の新規研究として再度申請することとした。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to confirmed the bone regeneration by octacalcium phosphate (OCP) and collagen composite (OCP/Collagen) with mesenchymal stem cell (MSC) (OCP/Col・MSC). Canine mandibular bone defect was used for bone defect model, however it was difficult to compare the bone regeneration of OCP/Collagen and OCP/Col・MSC, because OCP/Collagen indicated enough bone regeneration in canine mandibular defect. We changed the bone defect model to mandibular segmental defect. It was thought that an evaluation of the bone regeneration ability with OCP/Collagen and OCP/Col・MSC was enabled in new model and we decided to apply as a new study after the next fiscal year again.

研究分野：骨再生

キーワード：骨再生 リン酸オクタカルシウム MSC

1. 研究開始当初の背景

(1) 唇顎口蓋裂患者の顎裂部や顎骨腫瘍切除後等の骨欠損、あるいは抜歯窩、嚢胞摘出後の嚢胞腔、歯周病等の病的骨吸収、萎縮歯槽堤といった顎口腔領域における様々な骨欠損・喪失の修復はすべての歯科領域における重要な課題のひとつである。自己修復の望めない大きな欠損に対しては、それらを放置することで様々な不都合が生じる。例えば、唇顎口蓋裂患者の顎裂部を処置しなければ鼻口腔瘻孔の残遺や顎裂部への歯の配列困難が起こる。また下顎骨連続離断後、未処置のままであれば顎堤の連続性の喪失による歯槽堤の欠如や顎の変位が生じ、双方ともに結果的に発音・咀嚼・審美障害が残る。現在ではこのような大きな骨欠損部に対して、患者自身の組織を用いた再建術を行い、欠損部の修復を行う試みがなされている。実際に、唇顎口蓋裂患者の顎裂部や腫瘍切除後等の顎骨再建等、またインプラント治療時の骨量不足に対する骨補填時に対しては、主として自家骨移植が用いられている。自家骨は優れた骨再生能を持つので骨補填材料としては最適であると思われる。しかし、自家骨移植には数多くの問題点がある。まず、移植する骨を採取するために、本来は外科的侵襲の無用な部位にメスを加えることになる。また、採取できる骨の量には限りがあり、広範な骨欠損を有する症例では、自家骨移植のみでは量的に対応をすることは不可能である。

(2) 上記の理由から、共同研究者らは自家骨に匹敵する骨補填材料の開発にあたり、OCP について研究を行ってきた。OCP は 1962 年に Brown らにより、生体アパタイトの前駆物質であると提案され、その後実際に生体内において OCP が検出され、OCP が生体物質であることがわかった。共同研究者らは 1991 年に合成 OCP の作製に成功し、ラットやマウスの骨欠損部への OCP 埋入実験を行った (Suzuki et al. Tohoku J Exp Med 1991;164:37-50)。その結果、OCP は生体内吸収性であることがわかり、骨再生を促進することも認められた (Suzuki et al. Biomaterials 27: 2671-81, 2006)。また OCP の骨再生能は、従来使用されている HA や

TCP よりも優れていることも確認された (Kamakura et al. J.Biomed Mat Res B 59: 29-34, 2002)。しかし、まだ自家骨移植の骨再生能に匹敵するほどの特徴は示されなかった。OCP の骨再生能を向上させるために、OCP にブタ皮質由来アテロコラーゲンを混合させ、OCP/Col を作製した。OCP/Collagen をラットやマウスの骨欠損部に埋入したところ、OCP 単体の埋入時よりもさらに骨再生能が向上されていた (Kamakura et al. J Biomed Mat Res B 79:210-217, 2006)。OCP/Collagen のさらなる骨再生能向上を目指し、ラット骨髄由来 MSC を播種させた OCP/Col・MSC を作製し、ラット頭蓋骨臨界骨欠損部に埋入したところ、OCP/Collagen と比

較し、早期における骨再生能の向上が確認された (Kawai et al., Eur Cell Mater 22: 124-136, 2011)。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトでの大きな骨欠損部における骨再生に対する、OCP/Col・MSC の応用を目指し、中型動物イヌでの下顎骨辺縁切除による大きな骨欠損部を作成し、その骨欠損部における OCP/Col・MSC による骨再生能を検討し、臨床応用に向けた手法の確立を目的とした。イヌから採取した MSC の増殖、分化誘導を行い、その増殖能、分化能を確認し、MSC を OCP/Collagen に播種するまでに要する MSC 培養期間を明らかにし、また播種した OCP/Col・MSC をイヌ骨欠損部に埋入し、その骨再生能を確認するとともに、OCP/Col・MSC による骨再生が十分に発揮されるまでの期間や、OCP/Collagen による骨再生との比較を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 本研究を始めるにあたり、東北大学動物実験委員会の承認を得る。イヌはビーグル犬、オス (生後 18 ヶ月) を用いる。イヌ MSC の培養条件の確立を目的とした骨髄穿刺吸引は、現在共同研究者である、東北大学大学院歯学研究科・顎顔面・口腔外科学分野・松井桂子助教の、イヌを用いた研究の際に採取させていただくこととする。東北大学動物実験施設にて、イヌに塩酸ケタミン 20 mg/kg、硫酸アトロピン 0.5 mg を筋注した後、生理食塩水にて静脈確保し、ペントバルビタール 0.5ml/kg で静脈麻酔を行う。イヌの最上前腸骨稜から骨髄穿刺を行うために同部の剃毛、消毒後、皮膚および骨膜を切開剥離し、露出した腸骨に骨髄吸引用の穿刺を行う。シリンジで約 5ml 吸引し、凝固防止のためのヘパリンとともに、15ml 試験管に吸引した骨髄を入れ保存する。骨髄穿刺部位の創は閉鎖し、縫合する。その後共同研究者である東北大学大学院歯学研究科・顎口腔機能創建学分野・鈴木治教授の研究室にて MSC の培養を行う。イヌ MSC の分化誘導の方法については、申請者が共同研究者である東北大学大学院歯学研究科・顎口腔機能創建学分野・鈴木治教授、穴田貴久準教授と独自に確立した、培養期間の短縮を可能にした、ラット MSC の分化誘導方法を参考に行う (Kawai et al., Eur Cell Mater 22: 124-136, 2011)。イヌ骨髄を遠心し、血球、細胞等の沈殿物を分化誘導培地 (DMEM containing 10% FBS, 10⁻⁷ Dexamethason, 10mM beta-glycerophosphate, 50 μg/ml Ascorbate 2-phosphate, 2mM L-glutamine and antibiotics) に混合させ、培養する。1~3 日目まで培養液を交換することにより浮遊する血球等を除去し、その後 MSC の継代を行う。3 日目より Basic-Fibroblast Growth Factor (FGF) を培養液に添加し、48well のプレートに MSC を

3×10³個ずつ播種し、培養する。その後の MSC 増殖能を Cell Counting kit を用いて確認し、骨芽細胞様細胞への分化度は ALP 活性の測定、アリザリンレッド染色にて確認する。その結果から、イヌ MSC の分化に必要な日数等の条件を明確にする。OCP は、湿式合成法で作製する。粒子径 300~500 μm に整粒された OCP、10.5mg をブタ皮質由来アテロコラーゲンに混合し、直径 9 mm、厚さ 1 mm のディスク状に成型後に熱架橋処理を行って OCP/Collagen を作製する。OCP/Collagen 作製は東北大学大学院歯学研究科・顎口腔機能創建学分野・鈴木治教授の研究室にて行い、材料の供給には研究遂行上支障が無い。

(2) イヌ MSC の分化条件が確立した後、ビーグル犬、オス(生後 18 ヶ月)より骨髄採取を行い、分化させた MSC、20×10³個を含む培養液を細胞非接着性 24 穴プレートにいれ、その培養液中に OCP/Collagen を入れ、6 時間、200rpm で振盪させて播種する。1 日の培養後に骨欠損部への埋入を行う。MSC を採取した同イヌに、塩酸ケタミン 20 mg/kg、硫酸アトロピン 0.5 mg を筋注した後、生理食塩水にて静脈確保し、ペントバルビタール 0.5 ml/kg で静脈麻酔を行う。下顎骨辺縁切除モデルの作成は、共同研究者に確立された方法で行う(Miura et al., J Oral Maxillofac Surg 41: 1161-1169 2012)。イヌの第二、三小臼歯を抜去し、歯肉を切開剥離後、下顎骨を明示する。抜歯窩を含めて下顎骨を切削し、半径 10mm の半円状に骨欠損を作成する。骨欠損部に OCP/Col・MSC を埋入し、チタンメッシュにて表面を覆い、スクリューで固定する。その後、歯肉骨膜弁を復位縫合する。MSC の効果を確認するために、コントロールには OCP/Collagen の埋入を行う。OCP/Col・MSC の埋入後、1 か月、3 か月に過剰量のペントバルビタールにて安楽死させ、標本を摘出する。(3) 標本の軟 X 線写真の撮影、μCT の撮影を行い、新生骨の形態、骨量、骨質の評価を行う。その後組織学的評価を行うため、標本の脱水処理を行い、メチルメタクリレートを用いて樹脂包埋を行う。包埋した試料を、カッティングマシンを用いて、前頭断で薄切する。切片の厚さが 200~300 μm になるように研磨し、その後ピラヌエバ骨染色を行う。切片の画像を取得し、作成した骨欠損部における新生骨の割合、または新生骨内に認められる残存 OCP の割合を評価する。コントロールの OCP/Collagen と比較し、MSC 添加による OCP/Collagen の骨再生能向上の有無を評価する。

4. 研究成果

(1) 平成 25 年度は、OCP/Collagen に播種するための MSC の培養、また MSC の分化について検討を行った。現在共同研究者である、東北大学大学院歯学研究科・顎顔面・口腔外科学分野・松井桂子助教の、イヌを用いた研究の際に腸骨穿刺を行い、骨髄液 5cc を採取

した。凝固防止のためのヘパリンとともに、15ml 試験管に吸引した骨髄を入れ、共同研究者である東北大学大学院歯学研究科・顎口腔機能創建学分野・鈴木治教授の研究室にて細胞の培養を行った。イヌ骨髄を遠心し、血球、細胞等の沈殿物を分化誘導培地に混合させ、培養した。1~3 日目まで培養液を交換することにより浮遊する血球等を除去し、その後 MSC の継代を行った。3 日目より Basic-Fibroblast Growth Factor (FGF) を培養液に添加し、プレート上における石灰化物の有無を確認した。その結果、MSC 採取後 10 日目において、プレート上に石灰化物を確認した。この結果から、OCP/Collagen に播種する MSC は、分化に約 10 日間の日数が必要であることが確認された。

(2) 平成 26 年度は、これまでにわれわれの報告してきた手法により、イヌの下顎骨辺縁切除モデルを作成し、OCP/Collagen の埋入を行った。OCP/Collagen による骨再生能は良好であった。しかし、本研究では OCP/Collagen に MSC を播種し、更なる骨再生能の向上を目指しているが、この実験モデルでは OCP/Collagen 単体のみでも良好な骨再生能を示すことから、MSC による効果を明確にするためには他の更なる大きな骨欠損モデルでの OCP/Collagen 埋入と、OCP/Collagen と MSC の複合体との比較を行うことが必要であると考えられた。OCP/Collagen 単体のみでは骨再生が困難である骨欠損モデルとして、イヌ下顎骨区域切除の骨欠損を検討した。口腔内から切開を行い、抜歯とともに下顎骨体部に約 15mm の区域切除を行い、骨欠損はチタンプレート 2 本とスクリューを用いて固定した。骨欠損部には OCP/Collagen を埋入し、その後の経過を評価した。しかし、口腔内からの感染により、OCP/Collagen 埋入部には感染が多く認められ、骨再生を認めなかった。口腔内からの感染を防ぐため、あらかじめイヌの下顎歯列数本を抜去し、抜歯窩の治癒を認める約 3 か月後に、イヌの口腔外から切開を行い、下顎骨体部に約 15mm 幅での区域切除による骨欠損を作成し、チタンプレート、スクリューで固定した。その骨欠損部に OCP/Collagen を埋入した(図 1)。



図 1 . 下顎骨に幅 15 mm の骨欠損を作成し、同部への OCP/Collagen を埋入

(3)平成 27 年度では、下顎骨区域切除モデルが確立され、OCP/Collagen の埋入実験を行った。OCP/Collagen のみの埋入実験として 6 頭行った。OCP/Collagen 埋入後は 1 か月毎に X 線撮影を行い、硬組織の新生の有無を確認し、6 か月目で標本を摘出した(図 2)。区



図 2 . 摘出標本

域切除を行った近遠心の母床骨間に骨架橋があるかを確認したところ、6 頭施行した中で骨架橋を示したのは 3 頭であり(図 3) 他 3 頭では骨架橋は認められなかった(図 4)。



図 3 . 下顎骨区域切除部への OCP/Collagen 埋入による骨再生が認められた標本



図 4 . 骨再生が認められなかった標本

骨架橋を認めた標本からは、新生骨部では組織学的にも良好な骨組織を認めた(図 5)。この結果と比較し、今後 OCP/Collagen と MSC の複合体を埋入し、骨架橋を認める標本数や、継時的な X 線評価においての差の有無を検討し、骨再生能の向上について検討することを予定し、次年度以降の新規の実験として申請することとした。

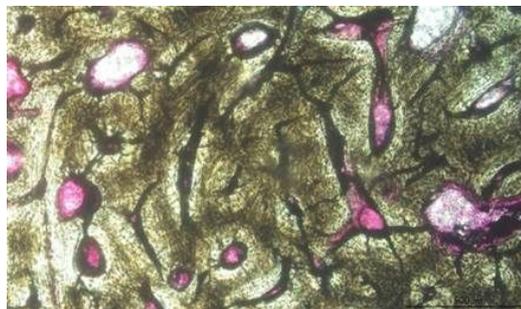


図 5 . OCP/Collagen による新生骨

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 4 件)

Tadashi Kawai, Keiko Matsui, Yushi Ezoe, Yuji Tanuma, Hidenori Tanaka, Fumihiko Kajii, Atsushi Iwai, Tetsu Takahashi, Osamu Suzuki, Shinji Kamakura, Reconstruction of a dog mandibular resection defect by octacalcium phosphate collagen composite. 27th European Conference on Biomaterials, 2015 年 8 月 30 日~9 月 3 日, ICE - Conference venue (Kraków, POLAND)

川井 忠、松井 桂子、江副 祐史、高橋 哲、鈴木 治、鎌倉 慎治、イヌ下顎骨区域切除骨欠損モデルにおける OCP/Collagen の骨再生能の検討、第 60 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会、2015 年 10 月 16 日~18 日、名古屋国際会議場(名古屋市)

Tadashi Kawai, Keiko Matsui, Yushi Ezoe, Yuji Tanuma, Hidenori Tanaka, Fumihiko Kajii, Atsushi Iwai, Tetsu Takahashi, Osamu Suzuki, Shinji Kamakura, Reconstruction of a dog mandibular segmental defect by octacalcium phosphate collagen composite. The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science, 2016 年 1 月 18 日~19 日, 民陵会館(仙台市)

川井 忠、松井 桂子、江副 祐史、高橋 哲、鈴木 治、鎌倉 慎治
OCP/Collagen を用いたイヌ下顎骨区域切除部における骨再生、第 15 回日本再生医療学会総会、2016 年 3 月 17 日~19 日、大阪国際会議場(大阪市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川井 忠 (KAWAI, Tadashi)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号: 5 0 5 4 7 2 6 3