

令和元年6月6日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20309

研究課題名(和文) 骨内微小環境の再現を基盤とした新規頭蓋骨組織再建法の確立

研究課題名(英文) Establishment of new skull tissue reconstruction method based on reproduction of bone micro environment

研究代表者

渡邊 敏之(WATANABE, TOSHIYUKI)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：30379804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨組織再生能が乏しい頭蓋骨欠損に対し、申請者らの開発した骨内微小環境を再現可能な口径300 μ mの貫通孔を有する八ニカム TCP (TCP)を用いて、垂直貫通孔と水平貫通孔の2種類を頭蓋骨欠損に適応した。TCP垂直孔は多数の細胞侵入と、硬膜側から骨膜側に向かって骨組織の形成が認められた。TCP水平孔は硬膜近側に骨組織の形成を認めるのみであった。

硬膜と骨膜を貫通するTCP垂直孔構造は、硬膜側からの骨組織形成にかかわる幹細胞の遊走にとって重要であり、板間層を貫通する水平孔より効率的に骨組織形成に働くことが示唆された。八ニカム TCP垂直孔は、頭蓋骨再建に非常に優れた生体材料となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭蓋骨は骨組織再生能が乏しく、骨吸収や欠損を生じることがある。頭蓋骨再建では、生体親和性の高いセラミックスの有用性が明らかとなっており、ハイドロキシアパタイトや TCPなどの生体材料が開発されている。しかし、骨組織再生と強度を兼ね備えた頭蓋骨再建のための生体材料ではない。一方、申請者らは、細胞分化微小環境の重要性に注目し、新規生体材料の開発を行っており、顔面領域において、骨内微小環境を再現可能な、貫通孔を有する八ニカム TCPの開発に成功し、頬骨欠損部に対する本八ニカム TCPを用いた骨組織形成に成功した。

そこで、本八ニカム TCPを用いて、再生能と強度を兼ね備えた頭蓋骨再生法を開発している。

研究成果の概要(英文)：Honeycomb TCP (TCP) with a through hole of 300 μ m in diameter that can reproduce the bone micro environment developed by the applicants for a skull defect with poor ability to regenerate bone tissue, two types of vertical through holes and horizontal through holes TCP was implanted in the skull defect. The TCP vertical hole showed numerous cell invasion and formation of bone tissue from the dura side to the periosteum side. TCP horizontal holes only showed formation of bone tissue near the dura.

It was suggested that The TCP vertical pore structure that penetrates the dura and periosteum is important for the migration of stem cells involved in bone tissue formation from the dura mater side, and it works more efficiently for bone tissue formation than the horizontal pore TCP.

Honeycomb TCP vertical holes may be an excellent biomaterial for skull reconstruction.

研究分野：形成外科

キーワード：頭蓋骨 TCP 再生

1. 研究開始当初の背景

頭蓋骨は骨組織再生能が弱く、開頭術や頭蓋骨骨折による骨吸収や欠損を生じることがある。強度と生体親和性が要求される頭蓋骨再建において、近年、生体親和性の高いセラミックスの有用性が明らかとなっており、生体親和性の高いハイドロキシアパタイトや β TCP など、様々な生体材料が開発されている(①②)。しかし、これらの人工骨は、高气孔率を示す材料はあるが、盲端の気孔であり、貫通孔ではないため、血管の貫通性や骨組織置換の妨げとなっている。また、気孔率が高くなると、人工骨が弱くなるという欠点を有しており、現在までに細胞、血管侵入性、強度を兼ね備えた頭蓋骨再建にもちいることのできる生体材料の報告はない。一方、申請者らは、細胞分化微小環境の重要性に注目し、(株)パイロットコーポレーションとの共同研究において、新規生体材料の開発を行ってきた(③)。その結果、顔面領域において、骨内微小環境を再現可能な、貫通孔を有するハニカム β TCPの開発に成功しており、顔面領域において、頬骨欠損部に対する本ハニカム β TCPを用いた骨組織形成に成功している(④)。

そこで、申請者らの開発した骨内微小環境を再現可能なハニカム β TCP(特許取得)を用いて、頭蓋骨領域の強度に重要な骨組織再生において、この新規骨組織再建法を行う技術を開発している。

2.研究の目的

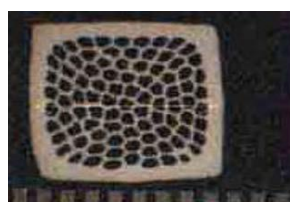
これまで申請者らは、焼結温度が1200度、孔径 $300\mu\text{m}$ の孔を有するハニカム β TCPが、非常に高い骨誘導能を有する事を確認している。また、微小環境を再現可能な本ハニカム β TCPは、形状変化により細胞分化をコントロールし、軟骨細胞や骨芽細胞の分化誘導を可能とする事を確認している。そして、同ハニカム β TCPをラット頬骨部全層欠損部に適応したところ、 β TCPと頬骨断端骨との良好な骨癒合像を得ることに成功している。このことから、顔面骨領域での本ハニカム β TCPの高い骨形成能は立証済みであり、頭蓋骨領域の新規骨組織再建法を高い確率で確立可能であるとの発想に至った。そこで本研究では、骨組織再生能の乏しい頭蓋骨欠損部に、適度な強度を有する本ハニカム β TCPを用いて、頭蓋骨組織置換に適した形状の検討と、新規頭蓋骨再建法の実現に向け基礎的研究を行うことを目的にしている。

3.研究の方法

1) マトリゲルもしくはI型コラーゲン、及びBMP-2含有ハニカム β TCPの作製

孔径 $300\mu\text{m}$ (300TCP)の貫通孔を有する長方体ハニカム β TCPを加圧整形、1200度温度で焼結形成したものをを用いた。垂直貫通孔を有する300TCPは、縦横 $4\times 4\text{mm}$ 、幅 1mm の縦方向に貫通孔がある長方体であり、水平貫通孔を有する300TCPは、縦横 $4\times 4\text{mm}$ 、幅 2mm で横方向に貫通孔がある長方体を作製した(Fig1)。300TCP(ハニカム β TCP)の作製は以前の報告と同様の方法で行った(④)。BMP-2充填量 1000ng となるよう濃度を調整しマトリゲルもしくはI型コラーゲンと混和後、300TCP(垂直貫通孔と水平貫通孔)と遠心分離器にかけ(4°C 、 $10,000\text{rpm}$ 、 5min)、孔内に充填した。マトリゲルもしくはI型コラーゲンのみ(BMP-2添加

なし) 孔内に充填したのもも作製した。



Width	3.95mm
Pore diameter	0.33mm
Length	1mm
Number of pore	91

Fig 1 ハニカム β TCP

2) ラット頭蓋骨完全欠損における骨組織再生

全身麻酔下に、ウイスター系 8 週齢雄性ラットの頭蓋骨に、ダイヤモンドバーを用いて切削、硬膜と骨膜を温存して 5 × 5 mm の頭蓋骨組織欠損部を左右 2 つ作成した。コントロールはそのまま閉創した群、マトリゲルもしくは I 型コラーゲン (BMP-2 非添加) とハニカム β TCP 群、マトリゲルもしくは I 型コラーゲンと BMP-2 添加のハニカム β TCP 群の 3 群に分け、左右の頭蓋骨欠損に 4 × 4 mm のハニカム β TCP 垂直貫通孔と、4 × 4 mm のハニカム β TCP 水平貫通孔をそれぞれ埋入した (Fig2)。移植後 4 週でマイクロ CT による画像評価と、標本作製によるコントロール群との比較、及び頭蓋骨再生の評価を行った。

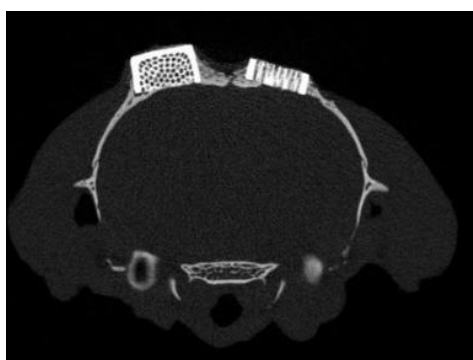


Fig2 ハニカム β TCP 水平貫通孔 (左)、垂直貫通孔 (右)

4. 研究成果

1) 組織学的検討

マトリゲル充填 (BMP-2 非添加) 水平貫通孔ハニカム β TCP では、硬膜側にのみ旺盛な新生骨組織の形成を認めた (Fig3 a,b)。マトリゲル充填 (BMP-2 非添加) 垂直貫通孔ハニカム β TCP では、すべての貫通孔に硬膜側から骨膜側に向かって骨組織形成を認めた (Fig3 c,d)。この結果から、硬膜側から骨膜側に向かって骨組織形成が生じていると考えられ、マトリゲル充填ハニカム β TCP 垂直貫通孔において、水平貫通孔に比べてより効率的に骨組織再生が期待できると考えられた。

マトリゲル充填 (BMP-2 添加) 垂直貫通孔ハニカム β TCP では、非添加群と比較して孔内全

体に旺盛な骨組織形成と、骨組織に囲まれた領域に骨髄組織様組織と血管腔の形成を認めた (Fig3 e,f)。一方、マトリゲル充填 (BMP-2 添加) 水平貫通孔ハニカム β TCP では、骨組織形成は孔内壁に添加するように硬膜側から骨膜側まで認めるも、垂直貫通孔と比較して粗な組織で形成されており、また明らかな骨髄組織様組織は認めなかった (Fig3 g,h)。

I型コラーゲンでも同様の埋入による組織学的検討を行ったが、マトリゲル充填群とI型コラーゲン充填群で骨組織新生に明らかな差は認めなかった。

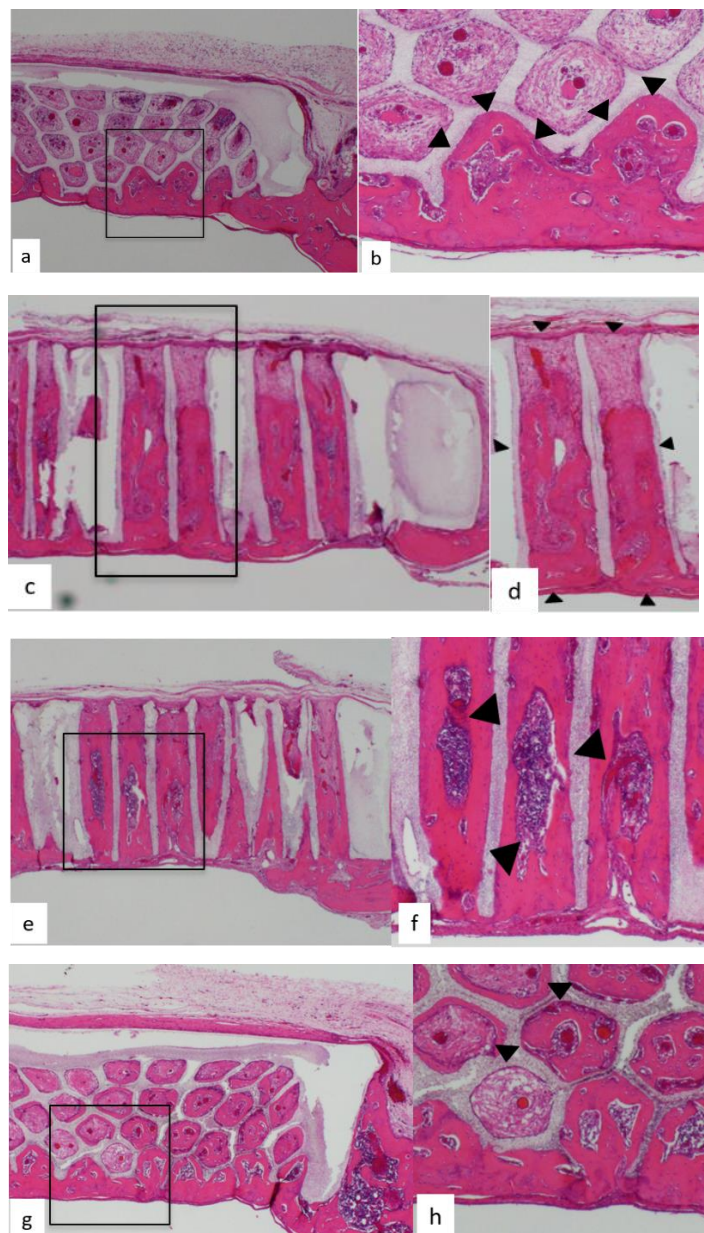


Fig3 a),b) マトリゲル充填 (BMP-2 非添加) 水平貫通孔ハニカム β TCP
c),d) マトリゲル充填 (BMP-2 非添加) 垂直貫通孔ハニカム β TCP
e),f) マトリゲル充填 (BMP-2 添加) 垂直貫通孔ハニカム β TCP

g),h) マトリゲル充填 (BMP-2 添加) 水平貫通孔ハニカム β TCP

2) 頭蓋骨欠損部における骨新生の画像評価

ハニカム β TCP 水平貫通孔と垂直貫通孔を、頭蓋骨欠損モデル左右それぞれに移植したところ、マイクロ CT では、4 週目のコントロール群で、頭蓋骨欠損のまま骨形成は認められなかった(Fig4 a)。

埋入 4 週目の TCP+BMP 群では、頭蓋骨周囲と癒合しているが、ハニカム β TCP の吸収、骨組織への置換は認めなかった。(Fig4 b,c)。

以上のことから、頭蓋骨欠損部におけるマトリゲルもしくは I 型コラーゲン添加ハニカム β TCP は強い頭蓋骨組織形成能を有し、硬膜側から骨膜側に向かう骨組織形成により骨組織再生が生じていると考えられた。硬膜から骨膜に貫通孔を有する垂直孔ハニカム β TCP は、頭蓋骨板間層に貫通孔を有している水平孔ハニカム β TCP より、効率的に骨組織再生が期待できる。

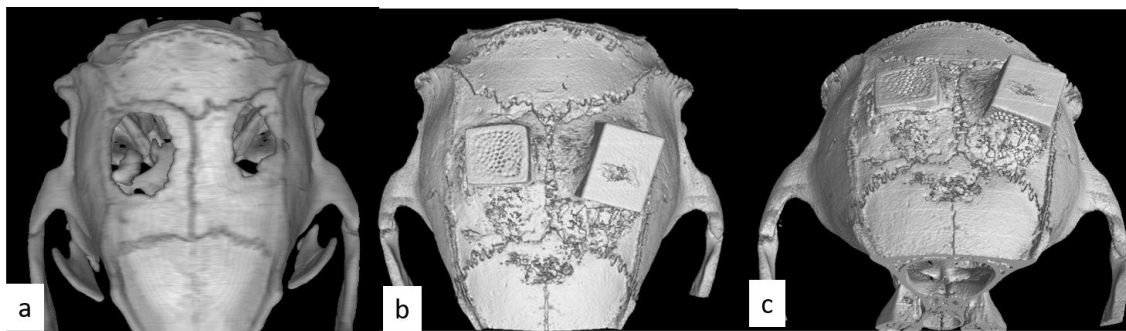


Fig 4 マイクロ CT 画像

a) 4 週目のコントロール群

b), c) 埋入 4 週目。ハニカム β TCP (BMP 添加) 水平貫通孔と垂直貫通孔。周囲頭蓋骨と癒合しているが、TCP の吸収骨組織への置換は認めない。

〈引用文献〉

- ① Yoshikawa, H., Myoui, A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *Journal of the Japanese Society for Artificial Organs* 2005;8:131-136
- ② Kaltreider, S. A. Prevention and management of complications associated with the hydroxyapatite implant. *Ophthalmic plastic and reconstructive surgery* 1996;12:18-31
- ③ Takabatake, K. Yamachika, E., Tsujigiwa, H. et al. Effect of geometry and microstructure of honeycomb TCP scaffolds on bone regeneration. *Journal of biomedical materials research part A* 2013.

5. 主な発表論文等

〈雑誌論文〉

Watanabe S, Takabatake K, Tsujigiwa H, Watanabe T, Tokuyama E, Ito S, Nagatsuka H,

Kimata Y. Efficacy of Honeycomb TCP-induced Microenvironment on Bone Tissue Regeneration in Craniofacial Area. Int J Med Sci.1;13(6):466-476.2016.査読有り

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：頭蓋骨接合材料

発明者：辻極 秀次、渡邊 敏之、高畠 清文

権利者：学校法人加計学園

種類：特許

番号：特許願 2016-228643

出願年月日：2016年11月25日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究分担者氏名：辻極 秀次

ローマ字氏名：(TSUIJGIWA Hidetugu)