

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20493

研究課題名(和文) Ar-PVDCと幼弱骨芽細胞を組み合わせた新規骨再生療法の開発

研究課題名(英文) New approach for bone regeneration using composite of osteoblast and Ar-PVDC film

研究代表者

小林 周一郎 (Kobayashi, Shuichiro)

愛知学院大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：80750190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はアルゴンイオンボンバードメント処理ポリ塩化ビニリデン(Ar-PVDC)フィルムと細胞を骨欠損部に移植することにより、欠損部の再生を促進させることである。まず、Ar-PVDC上での骨芽細胞分化をアルカリフォスファターゼにて評価したところ、分化の促進を認めた。次に骨欠損部に骨芽細胞とAr-PVDCを移植したが、Ar-PVDC単独の群との間に新生骨量の差を認めなかった。これは、もともとのAr-PVDCの持つ骨伝導能が高いためと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to promote bone defect healing using composite of osteoblast and Ar-modified Polyvinylidene chloride (Ar-PVDC) film. First, the alkaline phosphatase (ALP) activity on Ar-PVDC was assessed for differentiation. The ALP activity of osteoblast was enhanced on Ar-PVDC than that of PVDC. Next, composite of osteoblast and Ar-PVDC film was transplanted in bone defect of rat femur. However, there is no difference between Ar-PVDC and Ar-PVDC. This result suggest that the osteoconductivity of Ar-PVDC is high.

研究分野：歯周治療学

キーワード：再生歯学 組織工学

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病は国民の大多数が罹患する疾患であり、重症化した場合は多量の骨欠損を伴い、歯を喪失する大きな原因となる。このような多量の骨欠損は歯の喪失やその後の機能回復治療を困難にするだけでなく、審美性にも大きく影響し、患者の QOL を低下させる。そのため、重症化した歯周病患者における骨欠損部の再生治療の確立が期待されている。

骨採取のための外科的侵襲やその後の骨採取部位の疼痛があり採取骨量の限界がある。そこで近年では、組織の欠損に対し組織工学的手法(Tissue Engineering)を応用した再生治療の開発がされている。これまでの実験で、アルゴンイオンボンバードメント処理を施したポリ塩化ビニリデンフィルム(Ar-PVDC)が高い骨伝導能を有する足場材料となりうる事を報告した。

しかし、臨床応用を考える上で、より大きな骨欠損の再建を考える場合、細胞を併用する事が必要と考えられる。その際、再生する組織を骨に絞って考えた場合、分化誘導が必要な間葉系幹細胞などの幹細胞よりも、すでに分化している骨芽細胞の方がより効率がよいと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、アルゴンイオンボンバードメント処理が PVDC フィルム上の細胞の骨分化に与える影響を *in vitro* にて検討する。次に Ar-PVDC と骨芽細胞を組み合わせることで、骨再生の助長や治療期間の短縮が可能か検討する。さらに、ヒト歯槽骨より採取した骨芽細胞をヌードマウスに移植し、移植片と母床骨の関係や代謝を観察する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験試料

本研究では、実験資料として PVDC フィルム(旭化成株式会社、東京、日本)を使用した。滅菌後、成形し、再度滅菌し実験に供した。Arイオンボンバードメント処理にはマグネトロンスパッタリング装置を用いた。

#### (2) 骨分化能の検討

実験には KUSA 細胞株(継代数 5~9)を用いた。24 穴プレートに Ar-PVDC および未処理 PVDC を、滅菌綿棒を用いて貼り付けた後、細胞を  $1.0 \times 10^5/\text{ml}$  の濃度で  $400 \mu\text{l}$  播種した。培養には、15%FBS 添加 D-MEM (PVDC, Ar-PVDC) および分化誘導 15%FBS 添加 D-MEM (PVDC+, Ar-PVDC) を用いた。培養 14 日目に、アルカリフォスファターゼ (ALP) 計測キットを用いて反応後、吸光度計を用いて計測した。併せて、ALP 染色キットを用いて、染色し撮像した。

#### (3) 骨欠損部への移植

移植細胞は Sprague-Dawley (SD) ラット歯槽骨より採取したもの(継代数=3)を用いた。8 週齢 SD ラットの大腿骨に直径 2mm の骨欠損を

作製し、歯科用ストッピングを充填した。縫合後、2 週間飼育した。図 1 に作製した骨欠損を示す。

サブコンフルエントまで培養した細胞を、遠心分離によってスフェロイド状にし、同部に移植した。その後、欠損辺縁部に G-Bond+ を塗布し、Ar-PVDC を静置し、光照射した (Ar-PVDC+cell 群)。反対側も同様に骨欠損を作製し、細胞を移植せず Ar-PVDC のみを移植した。(Ar-PVDC 群)

移植後、実験用マイクロ CT を用いて、14 日後に CT 撮影した。



図 1: 作製した骨欠損

### 4. 研究成果

#### (1) 骨分化能の検討

図 2a に培養 14 日目における ALP 活性のグラフを示す。PVDC と比較し、分化誘導 Ar-PVDC 上の細胞では PVDC 上の細胞と比較し、有意な ALP 活性の上昇を認めた。一方、Ar-PVDC 上の細胞間では分化誘導による増加傾向はあったものの有意差は認められなかった。

図 2a: ALP 活性の比較

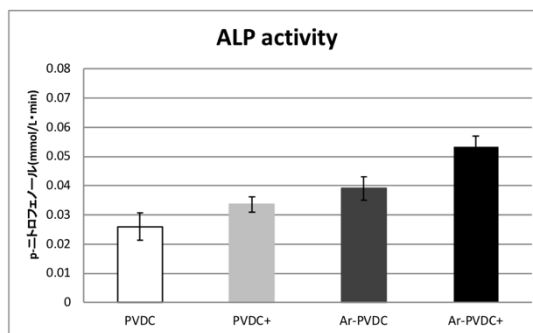


図 2b に培養 14 日目の ALP 染色した Ar-PVDC および PVDC 上の KUSA 細胞を示す。同様に ALP 活性の上昇を認めた。

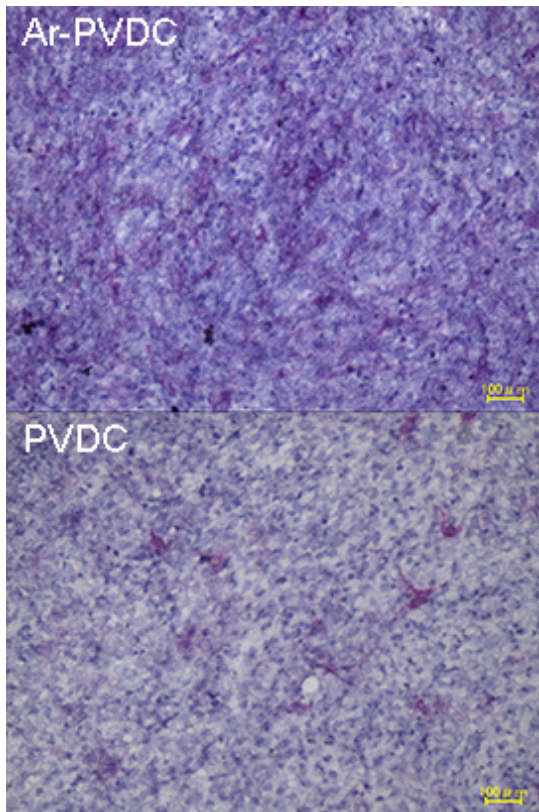


図 2b: ALP 染色

### (2)骨欠損部への移植

図 3 に移植 14 日後の Ar-PVDC+cell 群および Ar-PVDC 群のマイクロ CT 断面像の一例を示す。両群間の新生骨量には、大きな差は認められなかった。



図 3 上: Ar-PVDC + cell 群、下: Ar-PVDC 群

### (3)まとめ

本研究において、Ar-PVDC と細胞移植を併用し、骨欠損修復の期間短縮やより大きな骨欠損の再生が可能となることを目指した。まず *in vitro* において、PVDC 上の細胞と比較し、Ar-PVDC 上の細胞で ALP 活性の上昇から骨分化の促進が認められた。しかし、Ar-PVDC 上においては、分化誘導による ALP 活性に有意な差は認めなかった。一方でまた *in vivo* においては、Ar-PVDC+cell 群と Ar-PVDC 群との差は認められなかった。また、当初予定していたヒト由来骨芽細胞を骨欠損部に移植し、代謝状態を観察することを計画していたが、到達することが出来なかった。

これは、今回用いた骨欠損のサイズでは、Ar-PVDC のもともとの骨伝導能が高く、差が出なかったものと考えられる。

### 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 3 件)

① Adachi K, Miyajima S, Nakamura N, Miyabe M, Kobayashi Y, Nishikawa T, Suzuki Y, TKikuchi T, Kobayash S, Saiki T, Mizutani M, Ohno N, Noguchi T, Mitani A, Matubara T, Naruse K. Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase Activation in the Pathogenesis of Periodontitis in Diabetes. *Journal of clinical periodontology*: 2017, 44:971-980 査読あり

② Irie K, Tomofuji T, Ekuni D, Fukuhara D, Uchida Y, Kataoka K, Kobayashi S, Kikuchi T, Mitani A, Shimazaki Y, Morita M. Age-related changes of CD4+ T cell migration and cytokine expression in germ-free and SPF mice periodontium. *Archives of Biology*:2017, 87:72-78 査読あり

③ Tatsuhide Hayashi, Masaki Asakura, Mayu Kawase, Shuichiro Kobayashi, Akimichi Mieki, Junji Iwata, Yasuaki Uematsu, and Tatsushi Kawai Influence of Ca<sup>2+</sup> on Bone-Like Tissue Induction from Immature Muscular Tissue and Its Calcification/Ossification Potential. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*:2017, 7 1319-1325. 査読あり

[学会発表](計 2 件)

① 小林周一郎、林達秀、相野誠、西田英作、朝倉正紀、岡部栄治郎、河合達志、野口俊英、三谷章雄 アルゴンイオンボンバードメントを用いたポリ塩化ビニリデン(PVDC)フィルムの生体活性増強と GBR への応用 第 17 回日本

②小林周一郎、林達秀、朝倉正紀、岡部栄治郎、濱島聡一朗、河合達志、野口俊英、三谷章雄 アルゴン(Ar)イオンボンバードメントを用いたポリ塩化ビニリデン(PVDC)フィルムの生体活性増強とGBRへの応用 日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会 10周年記念大会 2015

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 周一郎 (Kobayashi Shuichiro)  
愛知学院大学・歯学部・非常勤講師  
研究者番号：80750190

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )