

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20507

研究課題名(和文)ゼラチンハイドロゲルと脂肪幹細胞 自己血漿を用いた3次元顎骨延長法による骨再生

研究課題名(英文) Bone regeneration by three-dimensional mandibular distraction osteogenesis using gelatin hydrogel, adipose stem cell and autologous plasma

研究代表者

樋口 佑輔 (HIGUCHI, Yusuke)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20635536

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)：顎骨延長モデルにおいて、生体安定性の材料を使用し、吸収性人工骨 -TCPに徐放性ゼラチンハイドロゲル・脂肪幹細胞を応用し、3次元的な骨延長を行い、さらに、骨形成・粘膜軟組織の再建治癒促進を図るために、自己血漿併用により、早期に成熟安定した骨形成および軟組織の再建が得られるか否かを評価解明し、臨床応用を目指すことを目的とした。他の担体の応用として、骨形成促進作用を有するRANKL結合ペプチドW9の併用実験を行い、W9が成長因子により誘導される骨形成作用を促進するか否かについても検討を行い、有用性を確認することができた。以上の成果を骨延長に応用できるかについても研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Three-dimensional mandibular distraction osteogenesis was performed using biostable material in the mandibular distraction model, applying sustained release gelatin hydrogel and fat stem cells to absorbable artificial bone -TCP. Furthermore, in order to promote bone formation and reconstruction healing of mucosal soft tissues, we aimed to clarify the clinical application by clarifying clarification by elucidating whether early maturation-stable bone formation and soft tissue reconstruction can be obtained by autologous plasma combined use. As an application of other carriers, a combined experiment of RANKL-binding peptide W9 having an osteogenesis promoting action was carried out to examine whether W9 promotes the osteogenic effect induced by growth factors, and confirms its usefulness. We also studied whether the above results could be applied to mandibular distraction.

研究分野：外科系歯学

キーワード：ゼラチンハイドロゲル 脂肪幹細胞 自己血漿 骨延長

### 1. 研究開始当初の背景

骨延長法は、手術侵襲も比較的少なく、骨そのものを延長して骨の形態を整える他に、その周囲の軟組織を含めた histogenesis といわれている。すなわち、組織伸展法(Tissue expansion)として、伸展余剰皮膚を作成し再建に用いる方法としても応用されており、組織の拘縮に対して、骨病変における再建においても応用可能であると言える。

口腔外科領域、特に顎変形症治療では、最終的な咬合状態を目標に骨延長を行う必要性があり、延長方向に角度をつけた3次元的な延長が必要となってくる。そのためには、あらかじめ骨片間の距離に間隙をつくる、すなわち、Initial gap を設定することが有効とされている。

しかし、欠点として、延長期間、保定期間が長い、骨形成量不足などの欠点があり患者側に負担をかけている。また、期間が長期化すると、延長装置周囲の感染や骨の感染を引き起こす可能性がある。

Tissue Engineering による組織の再生には、細胞、基質、調節因子の3つが重要な役割を果たすが、再生療法に用いられる細胞としての組織幹細胞として骨髄由来の間葉系幹細胞が期待されるが、一度に大量の骨髄採取をする場合は、負担が大きく、採取後の疼痛が避けられないという問題を持っている。一方、脂肪組織採取は低侵襲で採取後の疼痛も極めて少なく、ドナーサイトも非常に軽度の変形・欠損に抑えることが可能と言え、また、口腔外科領域では骨延長手術部位周囲である口腔内に頬脂肪体があり、その部位からの細胞採取は容易であり、術後の後遺症もないと考えられた。

そのため、骨髄からの幹細胞採取と比較して、より採取の容易な、脂肪組織から幹細胞を採取し、脂肪由来の間葉系幹細胞、細胞の足場としての吸収性人工骨 -TCP、調節因子として自己血漿(多血小板血漿 PRP/成長因子を含む血漿 PRGF/多血漿板フィブリン PRF)を必要量を必要な期間に骨延長中に効率的に投与させる目的でゼラチンハイドロゲルとともに顎骨延長による骨再生に応用し、軟組織の再建を含めた生体内のポテンシャルを十分に活用する方法を開発することを目標とする。

### 2. 研究の目的

ウサギ顎骨延長モデルにおいて、生体安定性の材料を使用し、吸収性人工骨 -TCP に徐放性ゼラチンハイドロゲル・脂肪幹細胞を応用し、3次元的な骨延長を行い、さらに、骨形成・粘膜軟組織の再建治癒促進を図るために、自己血漿 (PRP/PRGF/PRF) 併用により、早期に成熟安定した骨形成および軟組織の再建が得られるか否かを評価・解明し、臨床応用を目指すことを目的とした。

また、他の担体の応用として、骨形成促進作用を有する RANKL 結合ペプチド W9 の併用

実験を行い、骨延長法への応用展開を検討した。

### 3. 研究の方法

成長因子に担体としてゼラチンハイドロゲルを併用し、半減期の延長により作用増強が認められることの確認に加え、自己血漿の調整および脂肪幹細胞の誘導培養実験を中心に行い、ALP 染色及び von Kossa 染色等を行い石灰化面積を定量的に評価した。

W9 の併用研究においては、in vitro および in vivo 実験を行い、成長因子単剤と比較して W9 を併用した時の作用増強の有無をみるために、まず、in vitro 実験として、増殖実験と分化実験を行った。増殖に及ぼす成長因子と W9 の併用効果を評価するために、間葉系細胞株を用いた。また、分化に及ぼす作用をみるために初代骨芽細胞を用いて実験を行った。In vitro 実験においては、W9 を併用することで、成長因子単剤と比べて初期増殖および初期骨芽細胞分化を促進させたが、後期骨芽細胞分化を促進させることはなかったという結果が得られた。

また、上記の結果を受けて、in vivo 実験を行った。骨欠損を作製し、W9 と成長因子を含むゼラチンハイドロゲルを欠損部に適用し、形成骨を放射線学的および組織学的に分析した。

以上の成果を骨延長に応用すべく、ウサギ顎骨延長モデルにおいて Initial gap を 3mm とし、1mm/日 10 日間の延長期間とし、各種材料を応用した。延長終了後骨標識としてカルセインを皮下投与した。保定後屠殺し、下顎骨を摘出した。その後、軟 X 線、 $\mu$ CT にて下顎骨延長部の不透過性を比較検討した。また、pQCT において、下顎骨延長中央部の皮質骨骨密度、硬組織面積、皮質骨面積、全骨骨塩量、皮質骨骨塩量を比較検討した。さらに同部の非脱灰薄切標本を作製し、カルセインにて標識された面積の計測、von Kossa 染色にて染色された面積、TRAP 染色を施し染色された 2 核以上の破骨細胞数を比較検討した。

### 4. 研究成果

RANKL 結合ペプチドは骨吸収抑制作用だけでなく、骨芽細胞分化促進作用を示すことが明らかになっているが、ペプチド単独使用による異所性骨石灰化能は弱いといわれている。W9 が成長因子により誘導される骨形成作用を促進するか否かについても検討を開始し、成長因子/W9 群は、他の群と比較して有意な骨形成がなされたという結果が得られた。したがって、成長因子/W9 の併用療法を行うことで成長因子単剤療法よりも骨形成量が増加し、顎顔面領域の術後骨欠損における骨増生が期待できる可能性が示唆され有用性を確認することができ、研究発表を行

うことができた。

以上の成果を骨延長に応用できるかについても研究を推進し、各種材料における生体にとっての有害性の有無についても検討をすすめ、細胞機能解析を加味した研究を行いたいと考えていたが、下顎骨延長におけるゼラチンハイドロゲルによる各種材料の最適な徐放期間や骨形成に働くメカニズムの評価を解明するまでには至らず、さらなる分析が必要であると考えられた。

そのため、臨床応用に展開するにはさらなる時間を要すると思われた。

#### 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 2 件)

Marukawa E, Tamai M, Takahashi, Y, Hatakeyama I, Sato M, Higuchi Y, Kakidachi H, Taniguchi H, Sakamoto T, Honda J, Omura K, Harada H.: Comparison of magnesium alloys and poly-L-lactide screws as degradable implants in a canine fracture model. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. Page1282-1289 2015.(査読あり)

Toru Takemoto, Yuji Kabasawa, Yusuke Higuchi, Yasuhiko Tabata, Kazuhiro Aoki, Yukihiko Tamura, Hiroyuki Harada: Combination of the RANKL-binding peptide W9 and bFGF induces bone regeneration in the rat calvarial defect model. Dent Oral Craniofac Res. Page 1-7 2017.(査読あり)

##### [学会発表](計 11 件)

榊沢勇司, 神野成治, 高原楠旻, 樋口佑輔, 佐藤百合子, 松本佳奈子, 武元徹, 木村敦, 佐藤昌, 原田浩之: 顎矯正手術後の神経障害に対する鍼治療の臨床的検討. 第 25 回日本顎変形症学会 2015 年 6 月

樋口佑輔, 榊沢勇司, 高原楠旻, 佐藤百合子, 松本佳奈子, 武元徹, 原田浩之: Le Fort I 型骨切り術に伴う鼻口唇形態変化の検討. 第 60 回日本口腔外科学会総会学術大会 2015 年 10 月

榊沢勇司, 高原楠旻, 樋口佑輔, 佐藤百合子, 松本佳奈子, 武元徹, 木村敦, 佐藤昌, 原田浩之: 顎矯正手術後の神経障害に対する鍼治療の臨床的効果. 第 60 回日本口腔外科学会総会学術大会 2015 年 10 月

榊沢勇司, 佐藤百合子, 高原楠旻, 樋口佑輔, 武元徹, 原田浩之: Le Fort I 型骨切り術によるカント修正の精度と術後安定性の検討. 第 26 回日本顎変形症学会 2016 年 6 月

高原楠旻, 樋口佑輔, 武元徹, 榊沢勇司, 原田浩之: 下顎枝矢状分割術による後方移動後の後戻りについて. 日本顎変形症学会 2016 年 6 月

樋口佑輔, 榊沢勇司, 佐藤百合子, 高原楠旻, 武元徹, 原田浩之: CT を用いた顎変形症患者における下顎頭形態の分析. 第 26 回日本顎変形症学会 2016 年 6 月

榊沢勇司, 佐藤百合子, 高原楠旻, 樋口佑輔, 木村敦, 武元徹, 原田浩之: 可撤性義歯によって上顎骨の位置決めを行ない、顎矯正手術を施行した 1 例. 第 61 回公益社団法人日本口腔外科学会総会学術大会 2016 年 11 月

武元徹, 榊沢勇司, 樋口佑輔, 田畑泰彦, 青木和広, 田村幸彦, 原田浩之: ラット頭蓋骨欠損部に局所適用した RANKL 結合ペプチド W9 と bFGF による骨形成促進作用の評価. 第 33 回日本 DDS 学会学術集会. 2017 年 3 月

武元徹, 榊沢勇司, 樋口佑輔, 田畑泰彦, 青木和広, 田村幸彦, 原田浩之: ラット頭蓋骨欠損部に局所適用した RANKL 結合ペプチド W9 と bFGF による骨形成促進作用の評価. 第 16 回日本再生医療学会総会. 2017 年 7 月

高原楠旻, 榊沢勇司, 樋口佑輔, 上條真吾, 土田優美, 鈴木哲也, 原田浩之: 顎変形症患者での光学印象の経験 - 印象精度と今後の課題 - 第 27 回日本顎変形症学会 2017 年 6 月

樋口佑輔, 角倉可奈子, 大迫利光, 津島文彦, 原田浩之: 口腔限局性粘液症の 3 例. 第 62 回日本口腔外科学会総会学術大会 2017 年 10 月

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

樋口 佑輔 (HIGUCHI, Yusuke)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員  
研究者番号: 20635536

