

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11667

研究課題名(和文)薬物担持担体と幹細胞を用いた広域顎口腔組織欠損再生

研究課題名(英文)Widespread stomatognathic tissue defect regeneration using drug-loaded carrier and stem cells

研究代表者

馬場 俊輔 (Baba, Shunsuke)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40275227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本プロジェクトの目的は、3次元多孔質体スキャホールドに対して、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を固定化するなどの表面修飾を施すことによって、広範囲骨欠損ならびに歯周組織を再生することである。bFGF固定化群では2週で、-TCPの吸収と周囲の新生骨、新生セメント質、シャーピー線維を伴った歯根膜構造を認めた。イヌ下顎骨二壁性骨欠損モデルにおいて、bFGF固定化 -リン酸三カルシウムは早期に歯周組織再生を促すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌や顎骨骨折等によって生じた広域顎口腔組織欠損は、患者に大きな身体的および、精神的負担を生じさせる。これまでこの治療に対しては、欠損補綴や顎補綴治療が広く用いられてきたものの、利用される補填物は恒久的な発音障害・審美障害・咀嚼障害を生じさせ、患者の生活の質を大きく損ねている。

開発した薬物徐放性材料と有用な幹細胞を用いた本研究の遂行により、広域顎口腔組織欠損の再生が可能となれば、インプラント治療の適応範囲が大幅に広がるだけでなく、患者のQOLを大きく改善することになる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to immobilize bFGF on porous -TCP using heparin and evaluated the effect of this bFGF carrier on periodontal regeneration in a canine model of 2-wall periodontal defect. The results showed that healing of the alveolar bone and periodontal attachment was strongly promoted by modified -TCP implantation. In addition, the modified -TCP scaffold consistently suppressed aberrant healing processes such as ankylosis and root resorption. One important factor to note is that we used a surgically created model of periodontal defect, which might show higher healing potential than a clinically encountered defect. Therefore, similar experiments need to be conducted in the clinical setting to verify the results of the present study.

研究分野：再生歯学

キーワード：薬物徐放性材料

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔癌や顎骨骨折等によって生じた広域顎口腔組織欠損は、患者に大きな身体的および、精神的負担を生じさせる。これまでこの治療に対しては、欠損補綴や顎補綴治療が広く用いられてきたものの、利用される補填物は恒久的な発音障害・審美障害・咀嚼障害を生じさせ、患者の生活の質を大きく損ねている。特に、咀嚼障害は寿命と直結する事が知られている。これらの背景から、再生医療を用いた顎骨再生法に期待が向けられ、自家骨移植や、骨髄間葉系幹細胞を用いた細胞治療等が広く試みられている。しかし、広域を満たす程の試料の調達は困難を極め、未だ大きな発展が見られていない。

ヘパリンは分子中に多数含まれる硫酸基が負に帯電しているため、成長因子を含め種々の生理活性物質と相互作用する。ヘパリンをあらかじめ $\alpha$ -リン酸三カルシウム (TCP) 多孔質体に化学的に結合させた薬物徐放担体 (特願 2013-094744) を作製し、マウス頭蓋冠骨欠損モデルに移植した。12 週後に屠殺し、病理組織学的に評価したところヘパリンを有しない群に比較して骨再生能が高くなっていることを明らかにした。 $\alpha$ -PHTCP 多孔質そのものが、組織再生を誘導することを見いだしたことから、内在性の増殖因子の捕捉・集積、あるいは活性化を介して機能を発現している可能性が示唆されている。加えて、ヘパリンと Basic fibroblast growth factor (bFGF) の親和性も明らかになっていることから、ヘパリンとの相乗効果により導入された bFGF の活性が大きく向上し、有用な幹細胞足場担体として発展させることが可能であると考えた。

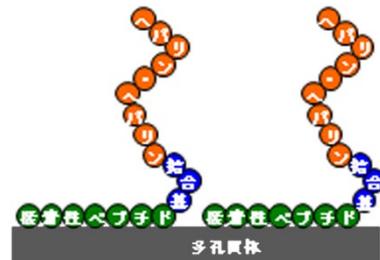


図 1. 薬物担持単体のメカニズム

### 2. 研究の目的

ヘパリン化した $\alpha$ -TCP多孔質体が骨再生用の新たなスキャホールドとして機能するものであり、安全性の高い機能性骨誘導剤となる。研究期間中に、bFGF 外部添加と内在性 FGF 利用の効果比較を小動物で進めるとともに、ラット頭蓋骨モデル、イヌ歯周疾患モデルにて広域顎口腔組織欠損修復治療の確立を進める。

### 3. 研究の方法

#### (1) ラット動物実験モデルの確立と移植試験

$\alpha$ -TCP 顆粒サイズの規格化のために、マウス頭蓋冠臨界骨欠損モデルを使用し、2 種類の $\alpha$ -TCP 顆粒の顆粒径の違いが骨形成能に及ぼす影響を検討した。実験材料として用いた 2 種類の $\alpha$ -TCP 顆粒は、200  $\mu\text{m}$  以下、500-600  $\mu\text{m}$  (以下 $\alpha$ -TCP200,  $\alpha$ -TCP600 と表記) に整粒し用いた。骨形成能評価において、4 週までは両顆粒間で大きな違いが認められなかったため $\alpha$ -TCP600 をラットモデルで使用した。ラット頭蓋冠の中心に直径 9mm、深さ 1mm のクリティカルサイズの骨欠損を形成する。以下の 3 群について実験を行う。群分けとしては、(a) 薬物徐放性骨再生材料群 (b) 骨再生材料群 (c) 移植しない群とする。実験期間は 2、4、8 週とする。

#### (2) イヌ歯周疾患モデルを用いた歯周組織再生

イヌ歯周疾患モデルで 3 ヶ月での歯周組織再生 (前臨床試験) を目的として、上下顎とも健全な永久歯列を有するビーグル犬 9 頭に実施した。実験動物に全身麻酔を施し、第 1 大白歯と第 3 小白歯は抜歯する。下顎第 2 前臼歯遠心と第 4 前臼歯近心に頬舌幅 3.5 mm、近遠心幅 3.5 mm、深さ 5 mm の 2 壁性骨欠損を作製後、骨欠損部および露出歯根面の十分な搔把を行い、同骨欠損底部を印記する目的でラウンドバーを用いて根面にノッチを付与した。群分けとしては、(a) bFGF/薬物徐放性骨再生材料群 (b) 薬物徐放性骨再生材料群 (c) フラップ手術群とした。実験期間は 2、4、12 週とした。

#### (3) *in vitro* 評価

bFGF 固定化がヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の分化に与える影響を調べた。hMSC を bFGF/薬物徐放性骨再生材料群および $\alpha$ -TCP 多孔質体のみ群とともに骨分化誘導培地中で一定期間培養する。細胞増殖能の評価として蛍光色素でアクチン染色を行った。骨芽細胞分化の評価として、それぞれの群から RNA を抽出し、逆転写を行い、cDNA を作製する。リアルタイム PCR 法を用いて I 型コラーゲン、オステオカルシン、RUNX2 の発現を評価し、両群の骨芽細胞分化マーカー発現の定量比較を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) ラット動物実験モデルの確立と移植試験

ヘパリン化処理による「内在性成長因子の補足効果に基づく骨形成促進効果」の有無を評価するため、下記の実験を行った。具体的には、外因性の成長因子を添加しないヘパリン化 $\alpha$ -TCP の骨形成能を、SD ラット雄 8 週齢頭蓋冠臨界骨欠損モデルを用いて評価した。試料としては、 $\alpha$ -TCP とペプチド-ヘパリンによって修飾した $\alpha$ -TCP (ヘパリン化 $\alpha$ -TCP) を埋入し、埋入 4 週間後に初期骨形成能を評価した。骨形成能は、 $\mu\text{CT}$  による骨形態計測と、ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色を用いた組織学的評価から見積もった。 $\mu\text{CT}$  画像を計測した結果、ヘパリン化 $\alpha$

-TCP は、ヘパリン化処理がなされていない  $\alpha$ -TCP に比べ、不透過像の増加が認められた(図 A)。また、H-E 染色の画像解析から、それらの不透過像は、新生骨 (NB) であることが確認された(図 B)。更に、ヘパリンを染色可能なアルシアンブルー染色を用いて、ヘパリンの残存度合いを確認した。その結果、埋入 4 週の時点では、骨に被覆されていない部位 (CT) では、ヘパリンを指し示す青色の染色が確認出来なかった(図 C)。新生骨は、青色で染色された顆粒表面から優位に形成されている事が確認された(図 C: 矢印)。

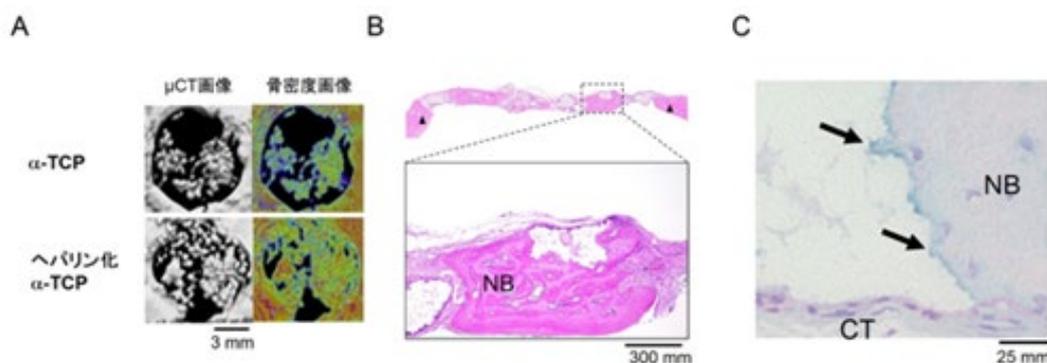


図2 ラット頭蓋骨欠損モデルを用いた骨再生

### (2) イヌ歯周疾患モデルを用いた歯周組織再生

ビーグル犬の下顎骨に二壁性骨欠損を形成し、実験群は  $\alpha$ -TCP/ヘパリン/bFGF、対照群は  $\alpha$ -TCP を填入した。術後 2、4、8 週に安楽死させ、マイクロ CT で骨のパラメーター解析を行った。HE 染色、アザン染色、免疫染色による組織学的評価を行った。実験群は対照群に比べて、術後 2、4 週で骨塩量が有意に高かった ( $p < 0.05$ )。実験群では 2 週で  $\alpha$ -TCP の吸収と周囲の新生骨、新生セメント質、シャーピー線維を伴った歯根膜構造を認めた。イヌ下顎骨二壁性骨欠損モデルにおいて、bFGF 固定化  $\alpha$ -リン酸三カルシウムは早期に歯周組織再生を促すことが示唆された。

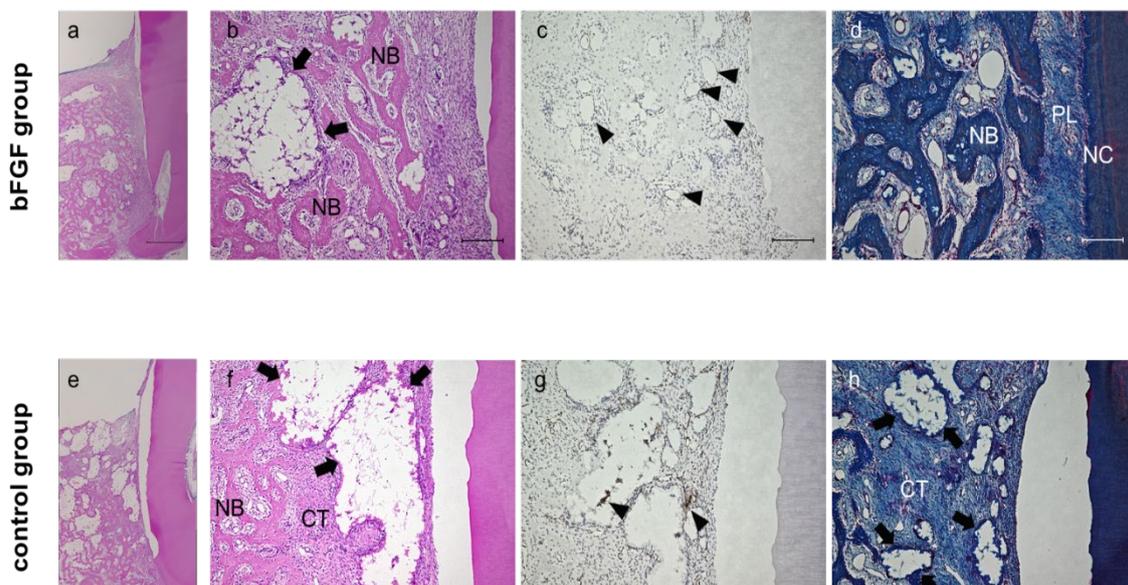


図3. 移植 2 週後の HE 染色、アザン染色、免疫染色による組織学的評価 (上) 実験群 (下) 対照群。矢印; 残存  $\alpha$ -TCP、三角; 血管、NB; 新生骨、CT; 結合組織、NC; 新生セメント質、PL; 歯根膜細胞

イヌ歯周疾患モデルでの bFGF を搭載しないヘパリン化  $\alpha$ -TCP 多孔質体の解析では、ビーグル犬の下顎骨に二壁性骨欠損を形成し、実験群は  $\alpha$ -TCP、対照群は  $\beta$ -TCP を填入した。術後 8 週に安楽死させ、HE 染色による組織学的評価を行った。実験群では周囲の新生骨、新生セメント質の形成が認められた。しかし、 $\alpha$ -TCP は残存し、シャーピー線維を伴った歯根膜はわずかに認められたただけであった。これは、bFGF を搭載したヘパリン化  $\alpha$ -TCP 多孔質体に比較して歯周組

織再生は劣るという結果になった。一方で、対照群は、 $\beta$ -TCP の残存は認められたものの大部分が吸収し、ハバース構造を含む新生骨が認められた。また、新生セメント質とシャーピー線維を含む歯根膜の形成も認められた。このことは、イヌ下顎骨二壁性骨欠損モデルにおいて、bFGF を搭載しないヘパリン化  $\beta$ -TCP 多孔質体は歯周組織再生を促すことが示唆された。成長因子を用いないことで、生物学的危険性が低くなり、実用化へ向けた可能性が高まった。

### (3) in vitro 評価

骨芽細胞分化の評価とアルカリフォスファターゼ、オステオカルシンの定量を行ったところ間葉系幹細胞の2週間の培養後、bFGF/薬物徐放性骨再生材料群でコントロール群と比較して有意に高い値を示した。また、リアルタイム PCR 法を用いて I 型コラーゲン、オステオカルシン、RUNX2 の発現を評価し、両群の骨芽細胞分化マーカー発現の定量比較を行なった。3日間の培養後、RUNX2 の発現が FGF/薬物徐放性骨再生材料群でコントロール群と比較して有意に高い値を示した。歯根膜細胞についてはセメント質分化マーカーとしてペリオスチン等の発現について両群を定量比較したところ、3, 7, 14 日後のいずれも bFGF/薬物徐放性骨再生材料群でコントロール群と比較して有意に高い値を示した。

間葉系幹細胞の骨芽細胞発現マーカーならびに歯根膜細胞のセメント質分化マーカーの発現が bFGF/薬物徐放性骨再生材料群でコントロール群と比較して高い発現を示した。このことは、bFGF/薬物徐放性骨再生材料群で bFGF がヘパリンと複合体を形成することによって生理活性の高い構造が保持されていたことから、骨芽細胞分化や歯根膜細胞分化を促進したと考えられる。

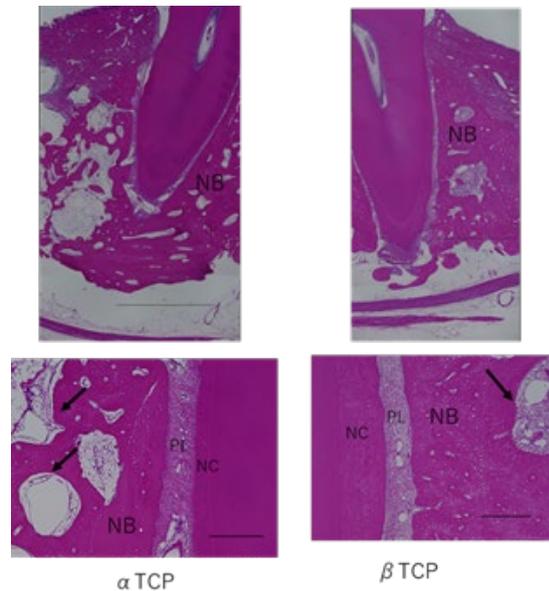


図 4. 移植 8 週後の HE 染色による組織学的評価 (左) 実験群 (右) 対照群。矢印; 残存  $\alpha$ -TCP、NB; 新生骨、NC; 新生セメント質、PL; 歯根膜細胞

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Zhao Jianxin, Honda Yoshitomo, Tanaka Tomonari, Hashimoto Yoshiya, Matsumoto Naoyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Releasing Behavior of Lipopolysaccharide from Gelatin Modulates Inflammation, Cellular Senescence, and Bone Formation in Critical-Sized Bone Defects in Rat Calvaria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 95 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.3390/ma13010095">https://doi.org/10.3390/ma13010095</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Zhao Jianxin, Honda Yoshitomo, Tanaka Tomonari, Hashimoto Yoshiya, Matsumoto Naoyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Releasing Behavior of Lipopolysaccharide from Gelatin Modulates Inflammation, Cellular Senescence, and Bone Formation in Critical-Sized Bone Defects in Rat Calvaria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.3390/ma13010095">https://doi.org/10.3390/ma13010095</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matuda Yoshifumi, Okamura Tomoharu, Tabata Hazime, Yasui Kenichiro, Tatsumura Masayasu, Kobayashi Nobuhiro, Nishikawa Tetsunari, Hashimoto Yoshiya	4. 巻 28
2. 論文標題 Periodontal Regeneration Using Cultured Coral Scaffolds in Class II Furcation Defects in Dogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 329 ~ 334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.2485/jhtb.28.329">https://doi.org/10.2485/jhtb.28.329</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 IMURA Kazuki, HASHIMOTO Yoshiya, OKADA Masahiro, YOSHIKAWA Kazushi, YAMAMOTO Kazuyo	4. 巻 38
2. 論文標題 Application of hydroxyapatite nanoparticle-assembled powder using basic fibroblast growth factor as a pulp-capping agent	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 713 ~ 720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2018-198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sasayama Satoshi、Hara Tomoya、Tanaka Tomonari、Honda Yoshitomo、Baba Shunsuke	4. 巻 19
2. 論文標題 Osteogenesis of Multipotent Progenitor Cells using the Epigallocatechin Gallate-Modified Gelatin Sponge Scaffold in the Rat Congenital Cleft-Jaw Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19123803	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuse Kazuya、Hashimoto Yoshiya、Kakinoki Sachiro、Yamaoka Tetsuji、Morita Shosuke	4. 巻 51
2. 論文標題 Periodontal regeneration induced by porous alpha-tricalcium phosphate with immobilized basic fibroblast growth factor in a canine model of 2-wall periodontal defects	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 48 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-017-0172-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nobuhiro Kobayashi、Yoshiya Hashimoto、Akihisa Otaka、Tetsuji Yamaoka、Shosuke Morita	4. 巻 9
2. 論文標題 Porous Alpha-Tricalcium Phosphate with Immobilized Basic Fibroblast Growth Factor Enhances Bone Regeneration in a Canine	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 853-864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma9100853	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 笹山 智史、原 朋也、田中 知成、橋本 典也、本田 義知、馬場 俊輔
2. 発表標題 唇顎口蓋裂治療に向けた多能性前駆細胞播種担体の開発と評価
3. 学会等名 第47回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 南野 智紀, 平井 瑞樹, 尹 徳栄, 小正 聡, 橋本 典也, 本津 茂樹
2. 発表標題 歯周病治療のためのリン酸カルシウム/ 歯髄幹細胞複合シートの作製と評価
3. 学会等名 第72回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松瀬 和也, 橋本 典也, 柿木 佐知朗, 山岡 哲二, 森田 章介
2. 発表標題 イヌ下顎骨二壁性骨欠損モデルにおける塩基性線維芽細胞増殖因子を固定化した $\beta$ -リン酸三カルシウムの歯周組織再生
3. 学会等名 第15回日本再生歯科医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武田 吉裕, 本田 義知, 柿木 佐知朗, 山岡 哲二, 馬場 俊輔
2. 発表標題 ヘパリンによる表面修飾は $\beta$ 型リン酸三カルシウム多孔質顆粒の初期骨形成能を増強する
3. 学会等名 第39回バイオマテリアル学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nobuhiro Kobayashi , Yoshiya Hashimoto, Akihisa Otaka, Tetsuji Yamaoka, Shosuke Morita
2. 発表標題 Porous Alpha-Tricalcium Phosphate with Immobilized Basic Fibroblast Growth Factor Enhances Bone Regeneration in a Canine Mandibular Bone Defect Model
3. 学会等名 International Dental Materials Congress 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 薮島由二（分担執筆：本田義知、橋本典也、山岡哲二）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 315
3. 書名 無機 / 有機材料の表面処理・改質による生体適合性付与	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分担者	橋本 典也  (Hashimoto Yoshiya)  (20228430)	大阪歯科大学・歯学部・教授   (34408)	
研究 分担者	本田 義知  (Honda Yoshitomo)  (90547259)	大阪歯科大学・歯学部・准教授   (34408)	