

令和元年5月31日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20530

研究課題名(和文) OCP/CollagenとMSCの複合体による顎骨再建法の確立

研究課題名(英文) Establishment of mandibular reconstruction method using combination of OCP/Collagen and MSC

研究代表者

川井 忠 (KAWAI, TADASHI)

岩手医科大学・歯学部・講師

研究者番号：50547263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸オクタカルシウム・コラーゲン複合体(OCP/Collagen)の骨再生能を向上させることにより、下顎骨区域切除による骨欠損部の修復を試みた研究である。イヌ腸骨からの未分化幹細胞(MSC)の採取を行い、骨芽細胞様細胞に分化させてOCP/Collagenに組み合わせ、実験に使用する予定であった。MSCの採取、分化誘導までの手技が本実験で確立された。しかし、OCP/Collagenとの組み合わせによる骨再生能評価は行えず、代わりに骨形成促進作用を有するテリパラチドを播種したところ、下顎骨区域切除による骨欠損部の骨再生が良好に行われることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔外科領域での手術により、広範囲の骨欠損が生じることがある。広範囲な骨欠損に対しては生体材料のみでの骨再生は困難であり、腓骨や腸骨など2次的な部位から骨を採取して再建術を行うことが通法となっている。今回の研究にて材料単体での広範囲な骨欠損部の修復が可能であることが示唆された。臨床の場で使用できるようになれば、自家骨採取が省略できることになるため、手術時間の短縮、入院期間の短縮など大きな効果が得られることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：This is a study that attempts to repair the bone defect by mandibular segmental resection by improving the bone regeneration ability of octacalcium phosphate and collagen composite (OCP/Collagen). Mesenchymal stem cells (MSCs) were collected from canine ilium, differentiated into osteoblast-like cells, combined with OCP/Collagen, and used for experiments. Procedures for collecting MSCs and inducing differentiation were established in this experiment. However, evaluation of bone regeneration ability by combination with OCP/Collagen was not performed, and instead, it was confirmed that teriparatide having bone formation promoting activity was added and bone regeneration at bone defect part by mandibular segmental resection was performed well.

研究分野：骨再生

キーワード：骨再生 生体材料 リン酸カルシウム コラーゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

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。

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/Col 埋入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/Col 埋入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/Col 埋入と比較し、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して OCP/Col・MSC の応用を目指し、中型動物イヌでの下顎骨区域切除モデルを作成し、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。

### 3. 研究の方法

平成 28 年度では、OCP/Col 埋入実験を行い、ビーグル犬 (18 か月、オス) 6 頭での下顎骨区域切除による骨欠損部での骨再生能を評価する。ビーグル犬を使用した研究は、約 10 年前より共同研究者である、東北大学大学院医工学研究科の鎌倉慎治教授、東北大学大学院歯学研究科松井桂子助教とともに行ってきており、実験体制は整っている。手術時には、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。下顎骨区域切除術は、口腔内からの感染を防ぐ目的で口腔外から行うこととし、そのため、下顎骨区域切除術を行う部位の歯牙については事前に抜歯を行い、歯肉粘膜が治癒した状態を確認した約 3 か月後に区域切除を施行する。

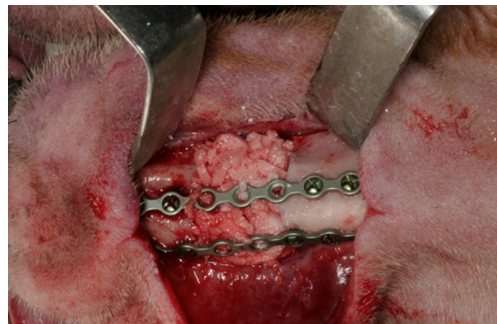


図 1 . イヌ下顎骨に幅 15mm の自己修復な骨欠損を作成し、OCP/Col を埋入。

抜歯 3 か月後に静脈麻酔を施行し、口腔外の下顎下縁から皮膚、筋組織、骨膜を剥離し、下顎骨を明示させる。区域切除を施行する前に、チタンプレート、スクリューを下顎骨の形態に合わせて位置決めをし、その後に近遠心幅 15mm の自己修復不可能な骨欠損を作成する

(Jin-Young H. et al., Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2005)。下顎骨の位置を復元するため、あらかじめ位置決めしていたチタンプレートとスクリューを用いて、骨欠損を維持する。骨欠損部を十分補填するように、OCP/Collagenを埋入し、骨膜、皮下組織、皮膚を縫合する。

OCP/Collagen埋入6か月後に、大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。標本はX線撮影による評価、マイクロCT撮影による新生骨の確認、組織学的評価を行い、骨再生の有無の確認、新生骨の評価を行う。X線撮影に関しては、手術直後、その後1か月毎に施行し、継時的な治癒過程を確認する。マイクロCTでは、新生骨の形態を確認するとともに、Bone VolumeおよびBMD (Bone Mineral Density;骨密度)計測を行い、統計学的に解析を加える。組織学的評価に関しては、前頭断した新生骨部の標本をメタクリル樹脂包埋し、自動精密切断機、研磨機で非脱灰標本を作製し、さらに薄く調整し、ピラヌエバボン染色を行い、新生骨の評価(関心領域における骨形成量、残存埋入物の有無等の解析)を行う。

平成29年度では、イヌ下顎骨区域切除による骨欠損部にOCP/Col・MSCを埋入し、その骨再生能をOCP/Collagen単体と比較して評価する。MSC採取のため、骨髄採取を下顎骨区域切除術施行予定のイヌより行う。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, 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<sup>-7</sup> 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、骨芽細胞様細胞への分化を認める約10日目に、MSC20×10<sup>3</sup>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。

OCP/Collagen単体の時と同様に、ビーグル犬6頭に対してOCP/Col・MSCの埋入を行い、埋入後6か月にて標本を摘出する。標本についてもX線撮影による評価、マイクロCT撮影による新生骨の確認、ピラヌエバボン染色による組織学的評価を行い、骨再生の有無の確認、新生骨の評価を行う。

平成29年度、30年度の動物実験は共同研究者である鎌倉慎治教授、松井桂子助教、またOCPの研究で歯学博士を取得している江副祐史医員とともに進行。摘出標本のX線撮影、マイクロCT撮影は鎌倉慎治教授、江副祐史医員が行い、組織学的評価のために切片作製は申請者が行う。OCP/Collagen単体埋入6頭の結果と、OCP/Col・MSC埋入6頭の結果を比較検討し、OCP/Col・MSC実験群での、OCP/Collagen単体実験群に対しての優位性が認められるかを確認する。統計学的評価を申請者が行い、その他の得られた結果をまとめ、国内外の学会にて発表を行い、また論文として発表を行う。MSCによる骨再生能向上が認められない場合には、BMP等の成長因子を組み合わせることを検討し、骨再生に最適な条件を模索する。

#### 4. 研究成果

平成28年度では、OCP/Collagenのみでの骨再生能を確認した。6頭のビーグル犬を使用し、下顎骨区域切除モデルとして幅15mmの骨欠損を設定した。塩酸ケタミン20mg/kg、硫酸アトロピン0.5mgを筋注した後、生理食塩水で静脈確保し、ペントバルビタール0.5mg/kgで静脈麻酔を行った後、手術を行った。下顎骨区域切除術は、口腔内からの感染を防ぐ目的で口腔外から行うこととし、そのため、下顎骨区域切除術を行う部位の歯牙については事前に抜歯を行い、歯肉粘膜が治癒した状態を確認した約3か月後に区域切除を施行した。区域切除によって形成された骨欠損部はチタンプレート2枚とスクリューにて固定し、その骨欠損部が十分補填されるようにOCP/Collagenを埋入し、閉鎖縫合した。OCP/Collagen埋入6か月後に、大量ペントバルビタールにて安楽死させて標本を摘出し、マイクロCTの撮影、軟X線写真撮影、非脱灰標本を用いてピラヌエバボン染色を行い、組織学的に確認した。その結果、6頭中3頭では骨欠損部に新生骨が確認され、両側骨断端が連続していた。しかし、残り3頭では骨欠損が残存し、両側の骨断端は連続しなかった。



図2.(a)6頭中3頭は、OCP/Collagenのみで両側母床骨が硬組織で連続されていた。(b)残



り3頭では骨欠損は残存していた。

平成29年度では、OCP/Collagenと組み合わせるMSCの採取、培養方法の確認を行った。イヌ腸骨より骨髓を穿刺吸引し、骨髓を約5cc採取した。その骨髓を遠心し、血球、細胞等の沈殿物を分化誘導培地に混合させ培養し、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の継代培養を行った。3日目よりFGFを培養液に添加し、約14日間培養した。アリザリンレッド染色にて一部石灰物が確認され、MSCが分化されていることを確認した。OCP/Collagenディスク(径9mm、厚さ1.5mm)には約20万個のMSCを播種する予定であり、イヌ区域切除部位にはOCP/Collagenディスクを約20枚使用する予定である。必要な細胞数は400万個であるが、培養した細胞数はそれ以上であることを確認できた。

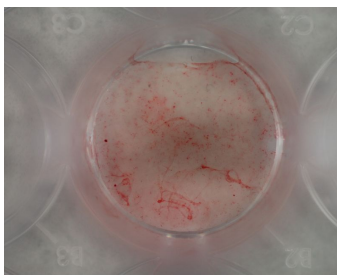


図3 . イヌMSCを分化誘導培地で培養し、14日目でのアリザリンレッド染色写真。石灰化部位が赤く染められており、MSCが骨芽細胞様細胞に分化誘導されたことを示している。

H30年度はイヌ骨髓から採取したMSCを分化誘導させ、OCP/Collagenに播種してイヌ下顎骨区域切除モデルに使用する予定であった。しかし、共同研究者らと細胞での骨再生能向上を目指す方針に加えて、成長因子を添加しても骨再生能向上を目指す実験も検討することとなった。実際にOCP/Collagenに副甲状腺ホルモン製剤であるテリパラチドを播種し、ラット頭蓋骨骨欠損部に埋入した実験結果から、その骨再生能向上効果が確認された。その後、本実験でのイヌ下顎骨区域切除モデルに使用することとした。実験に用いたイヌは5頭であり、径9mm、厚さ1.5mmのOCP/Collagenディスク30枚にテリパラチド56.5mg/mlを播種し、骨欠損部に埋入した。埋入後は1か月毎のX線写真撮影を行い、経時的に埋入した材料のX線不透過性が向上することが確認され、6か月後には5例全例で良好な骨形成が行われていることが確認された。その後、MSCを播種したOCP/Collagenの埋入実験も予定されたが、材料準備の行程の複雑さなどの理由から、本年度での実験は日程が足らず、延期となった。これらの結果から、未分化幹細胞を分化誘導させてOCP/Collagenに播種することによってより最適な骨再生材料を作製する計画から、成長因子添加での骨再生能向上を先に目指すこととなった。細胞を使用する骨再生能評価は今後に行う予定し、また今回のテリパラチドに比べて有効であるのかを評価することが課題として残った。

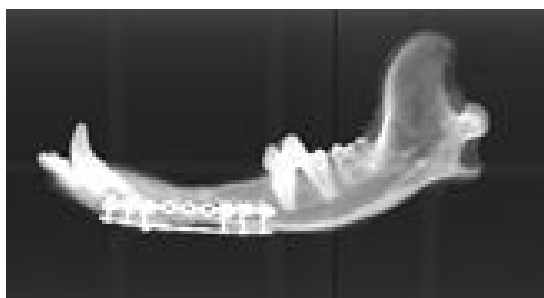


図4 . テリパラチドを添加したOCP/Collagenでは4頭中4頭で骨欠損部の硬組織の再生が確認された。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

2019年11月2日~4日 (千葉市、幕張メッセ)

第63回日本口腔外科学会総会・学術大会

松井 桂子、鎌倉 慎治、川井 忠、江副 祐史、柳沢 俊樹、高橋 哲、骨形成促進薬併用によるリン酸オクタカルシウム・コラーゲン複合体の骨再生能増強効果

2019年3月21日~23日 (神戸市、神戸国際会議場 神戸国際展示場)

第18回日本再生医療学会総会

松井 桂子、鎌倉 慎治、川井 忠、江副 祐史、柳沢 俊樹、安田 彩人、高橋 哲、テリ  
パラチドを局所併用した各種骨再生材料によるイヌ下顎骨離断部の骨再生

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。