

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11895

研究課題名(和文) Time-lag release materialを用いた新しい骨再生法の確立

研究課題名(英文) The establishment of developed bone regeneration using time-lag release material

研究代表者

清水 良央 (Shimizu, Yoshinaka)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：30302152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Time-lag releaseを可能にする薬剤担持構造を有する材料として新しいハイドロキシアパタイトの炎症、線維性被包からみた生体安全性を確認し、生体内分解挙動および材料自体の骨伝導性があることを形態計測学的に確認した。またこの材料に骨髄幹細胞由来抽出蛋白溶液を含浸させて骨形成効果を確認した。ハイドロキシアパタイトは線維状ハイドロキシアパタイトを凝集させた構造であり、薬剤の担持性に優れ、新生骨の特に初期の形成を促すことが確認された。この材料の多層化により、時間差での薬剤作用により複数の組織への作用による効率的再生が可能になると思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、生体のかなりの再生治療における応用が期待できる。多くの組織は、実質細胞だけでなく、間質細胞つまり血管を含む組織構築によって成り立っており、再生過程においても環境形成が先行することが考慮されなければならない。本研究の成果は、このような時間経過とともに変化する再生組織の構築を考慮して時間差で作用する生体材料であり、用途状構造であることから賦形性に優れ様々な欠損域に適応できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, the biocompatibility of new hydroxyapatite as a material having a drug-carrying structure that enables time-lag release, was examined in the viewpoint of fibrous encapsulation and inflammation. And in vivo decomposition behavior and osteoconductive of the material was clarified by histopathological and histomorphometric examinations. This hydroxyapatite was immersed with a bone marrow stem cell-derived extracted protein solution and applied bone defect to confirm the bone formation effect. This hydroxyapatite composed of ultralong hydroxyapatite nanowire has excellent drug-carrying property, and promotes the new bone formation in early time. The hydroxyapatite containing bone marrow stem cell-derived extracted protein solution promote new bone formation more promptly. The multi-layered structure of this material would enable tissue regeneration by acting on multiple tissues due to the drug action at different times.

研究分野：口腔病理学

キーワード：生体材料 再生 骨

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨再生治療は、優れた生体材料の開発、骨再生メカニズムの解明などによって予知性の高い治療法として広く行われている。しかし未だに広範囲の顎骨の欠損や平坦な骨面に対する外方性の骨再生については困難ないし希望の再生量を得られないことが少なくない。欠損部への競合組織の侵入からの不完全治癒が原因の1つとしてあげられ、生体の組織反応の速度をこえる早期の骨芽細胞の増殖、誘導、活性化が必要と考える。また骨再生においては競合組織の侵入や線維化を中心とする成熟を抑制しなければならないと考える。そのためには競合組織の形成前に骨再生に適した環境組織を構築することで、早期の骨形成を誘導することが可能になると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、早期の環境形成とそれに続く実質細胞、すなわち骨芽細胞の誘導を引き起こす材料デザインとして多層化構造の材料開発を目的とした。多層化構造は、外側の材料から徐々に環境をつくり、内側の材料へ移行しながら作用させる細胞を切り替えていく材料である。本研究ではハイドロキシアパタイトの線維構造の凝集からなるシート状の材料に成長因子など蛋白質系薬剤を含浸させ、異なる蛋白を含浸させたシートを重ねることで作用時間をずらす材料としての使用することを検討した。特に線維構造の凝集ハイドロキシアパタイトの生体安全性、骨再生効果を検討し、その後、多様な成長因子を含む骨髄幹細胞由来抽出蛋白質溶液を含浸させた材料の骨再生効果について検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 線維凝集ハイドロキシアパタイトシートの合成と電子顕微鏡および組織学的観察

線維凝集ハイドロキシアパタイトは、NaOH水溶液を、機械的攪拌下の氷水浴中のメタノール、オレイン酸、脱イオン水の混合物に添加し、30分後、CaCl<sub>2</sub>水溶液を、機械的に攪拌しながら上記の混合物に添加して、白濁液を得た。次に、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>O水溶液を上記の懸濁液に攪拌しながら加えた。得られた白濁液をオートクレーブに移し、180°Cに加熱し一定時間維持した後、室温まで冷却した。処理した白濁液をエタノールと脱イオン水でそれぞれ3回洗浄し、スラリーを形成した。ラピッドケーテンシートフォーマーを用いて、パルプスラリーを円形の紙シートにし、プレートプレス機で圧縮し、368Kで乾燥させて作製した。

ハイドロキシアパタイトシートに炭素蒸着を行った後、表面微細構造分析と元素分析について走査型電子顕微鏡を使用して行った。

生体内に埋植されたハイドロキシアパタイトシートについてEDTA脱灰後、パラフィン包埋標本を作製し、光学顕微鏡下にて観察した。

#### (2) ハイドロキシアパタイトシートの生体安全性、分解挙動およびシート自体の骨形成効果

ラット骨欠損部への埋植による実験にて生体安全性および骨形成評価を行った。約12週の雄性ラットを全身麻酔下にて固定し、頭蓋部の局所麻酔、滅菌を行って皮膚切開した。骨膜を剥離した後、直径8.8(外寸)のトレフィンバーにて脳硬膜を開放する円形の骨欠損部を作製した。対照群として欠損部を洗浄後、そのまま皮膚で封鎖した群、直径8mmの円形状ハイドロキシアパタイトシートを滅菌した後、生理食塩水に浸漬し欠損部に設置し、皮膚の縫合、封鎖した。術後2、4、8週後に過剰麻酔にて安楽死させ、実験部位のマイクロX線CT撮影およびEDTA脱灰後、パラフィン包埋し、HE染色、膠原線維染色するEM染色、破骨細胞および骨芽細胞活性を評価するTRAP染色およびALP染色を行って光学顕微鏡下にて種々の観察、計測を行った。

#### (3) ハイドロキシアパタイトシートへの骨髄幹細胞由来抽出蛋白質溶液含浸による骨形成効果

2と同様のラット実験モデルにて検討を行った。2と同様のハイドロキシアパタイトシートを用意し、対照群としては生理食塩水を含浸させたもの、実験群として骨髄幹細胞由来抽出蛋白質を含浸させて頭蓋欠損部に設置して皮膚の縫合、封鎖した。術後2、4、8週後に安楽死させ、2と同様にマイクロX線CT撮影から脱灰後の組織標本を作製し、各染色を行った後、種々の観察、計測を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ハイドロキシアパタイトシートの電顕像

Figure 1は、表面の走査型電子顕微鏡写真(B)および元素マッピングの図でカルシウム(C)とリン(D)の局在を示したものである。図より本シートが細繊維状のハイドロキシアパタイトが行下構造であり、それらはカルシウムとリンからなるアパタイトであることが確認された。

#### (2) ハイドロキシアパタイトの断面構造

Figure 2は、表面と断面を比較した電子顕微鏡像である。表面構造と異なり(A、B)断面ではシート状構造が積層化した構造として確認できた(C)。拡大図では、表面と同様、繊維状ハイドロキシアパタイトの切断断面として確認できた(D)。(1)(2)の結果より蛋白を浸漬したとき、保水効果による薬剤の保持が可能であると思われた。

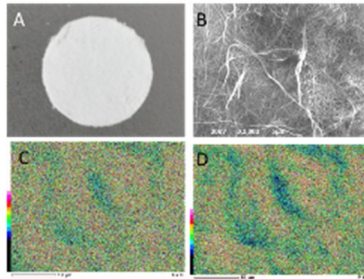


Figure 1. A: Hydroxyapatite sheet hollowed out using a punch of a diameter of 8 mm. B: Surface photograph of hydroxyapatite sheet (x3000). C: Calcium mapping in the field of view of B. D: Phosphorus mapping in the field of view of B.

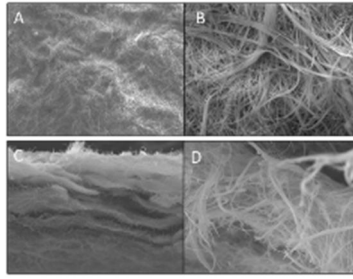


Figure 2. Electron microscope image of a hydroxyapatite sheet. A: Sheet surface (x400). B: Sheet surface (x5000). C: Sheet cross section (x400). D: Sheet cross section (x5000).

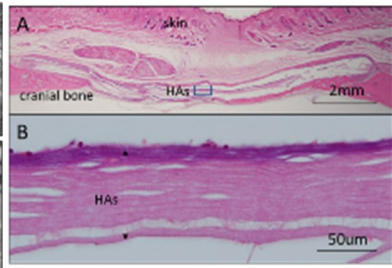


Figure 3. Histological findings of hydroxyapatite sheet. A: In vivo findings of hydroxyapatite sheet placed on rat skull. The arrangement of skin, skeletal muscle, fat layer, hydroxyapatite sheet, and dura mater can be confirmed (x12.5). B: An enlarged image of hydroxyapatite sheet (x100).

### (3) ハイドロキシアパタイトシートの組織学的観察

Figure 3は、生理食塩水に浸漬したハイドロキシアパタイトを生体内に入れた部位の脱灰後の組織写真を示す。通常、ハイドロキシアパタイトは組織標本作製過程時に脱灰により抜けてしまうが、シートの大部分は好酸性ないし好塩基性の染色性を示して、組織液が侵入しやすい構造であると推察された。

### (4) ハイドロキシアパタイトシートの生体安全性

ラット頭蓋骨欠損部に設置したシート周囲および骨欠損部での肉芽ないし線維性結合組織について観察し、その厚さを比較した。

Figure 4は、ハイドロキシアパタイトシート周囲の肉芽 - 線維性結合組織被膜の組織写真を示している。図のように2週では細胞成分の多い肉芽組織、徐々に線維化を示して菲薄化している。著しい炎症性細胞浸潤はみられず、為害作用のない材料であると思われた。またFigure 5に対照群である欠損内の肉芽組織および線維性結合組織の被膜厚さと比較したグラフを示した。図のように欠損部の方が有意に肉芽組織および線維性結合組織が厚く形成されており、ハイドロキシアパタイトシートがより被膜厚さをなわち為害作用に対する反応性でみる安全性が高いことが確認された。

またFigure 6は、CD68陽性マクロファージの免疫組織化学染色を示している。2週では一般的にみられる肉芽組織内のマクロファージがみられ、徐々に減少している。マクロファージの出現数についてFigure 7に示した。欠損部の肉芽組織ないし線維性結合組織内のマクロファージ数を比較したグラフである。マクロファージ数は対照群、実験群とも減少傾向を示し、密度はハイドロキシアパタイトシート周囲がやや多かったが有意な差はみられなかった。

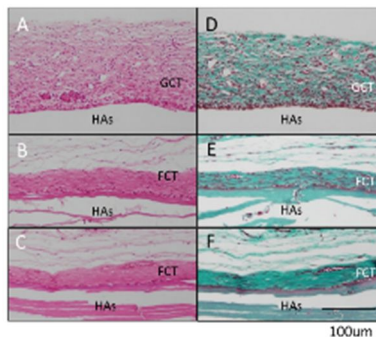


Figure 4. Histological changes of capsule around the hydroxyapatite sheet. A: 2 weeks (HE image). B: 4 weeks (HE image). C: 8 weeks (HE image). D: 2 weeks (EM image). E: 4 weeks (EM image). F: 8 weeks (EM image). GCT: granule connective tissue, FCT: fibrous connective tissue.

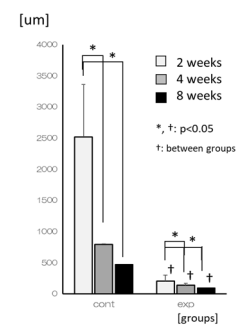


Figure 5. Time-dependent changes in the thickness of granulation tissue or fibrous connective tissue around the hydroxyapatite sheet.

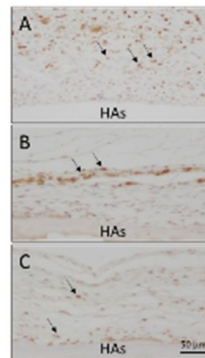


Figure 6. CD68-positive macrophages around the hydroxyapatite sheet. A: 2 weeks, B: 4 weeks, C: 8 weeks.

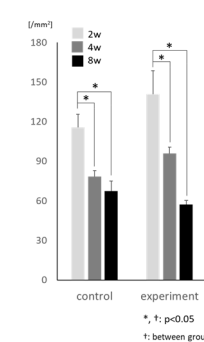


Figure 7. Time-dependent changes in the number of CD68-positive macrophages in granulation tissue or fibrous connective tissue around the hydroxyapatite sheet.

### (5) ハイドロキシアパタイトシートの分解

分解に関連する特徴的な生体内反応としては、Figure 8で示すシート断面で観察された。図は左からHE染色、EM染色、TRAP染色を示す。シート辺縁では積層化したシート構造がほぐれて隙間に組織液および細胞が侵入し、特にほぐれたことにより表面積が拡大したハイドロキシアパタイト表面に破骨細胞様細胞が出現した。表面での破骨細胞様細胞や線維構造、積層化構造の崩壊に伴って表面積を増やしながらか分解を進めていく可能性が示唆された。実際の分解にはさらに長期飼育が必要である。

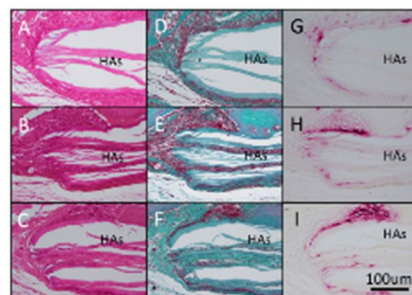


Figure 8. Histological findings in edge of hydroxyapatite sheet. A: 2 weeks (HE image). B: 4 weeks (HE image). C: 8 weeks (HE image). D: 2 weeks (EM image). E: 4 weeks (EM image). F: 8 weeks (EM image). G: 2 weeks (ALP staining). H: 4 weeks (ALP staining). I: 8 weeks (ALP staining).

(6) ハイドロキシアパタイト周囲の骨形成

ハイドロキシアパタイトシート自体の骨形成、骨伝導効果について検討した。Figure 9は、シート周囲の組織および新生骨周囲のアルカリフォスファターゼ活性を示す。アパタイトシートの周囲には部分的にアルカリフォスファターゼ活性を示す茶褐色染色領域が確認され、骨伝導性を示すことが確認された。また断面の剥離した領域でも剥離面表面に同様の褐色染色領域が確認され、剥離面では破骨細胞様細胞による吸収と同時に骨形成がみられると思われた。

Figure 10では、対照群および実験群での欠損部前頭断面のマイクロX線CT像を示す。対照群において欠損部辺縁から伝導性に8週までに広範囲に骨形成が確認された。実験群では、欠損部にX線透過性の特徴を示すハイドロキシアパタイトシートが観察され、シート内外表層に新生骨の形成が確認された。新生骨は表層を這うように骨欠損断面の辺縁から中央に向かって形成された。

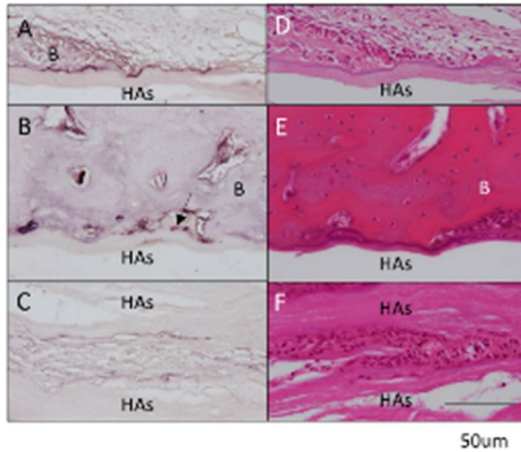


Figure 9. Alkaline phosphatase activity around the hydroxyapatite sheet. A: 2 weeks (HE image), B: 4 weeks (HE image), C: 8 weeks (HE image), D: 2 weeks (EM image), E: 4 weeks (EM image), F: 8 weeks (EM image).

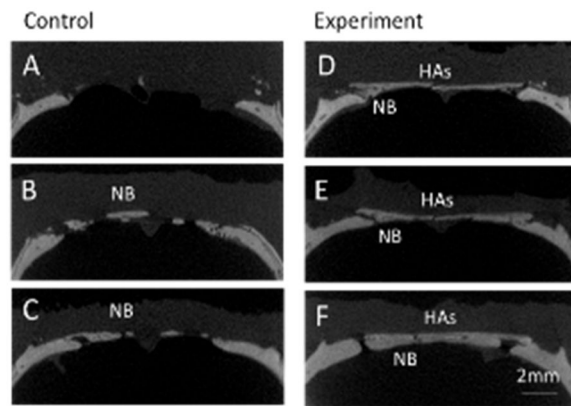


Figure 10. Micro-CT images in bone defect area in control and experimental groups. A: 2 weeks (HE image), B: 4 weeks, C: 8 weeks. Experimental group: D: 2 weeks (EM image), E: 4 weeks (EM image), F: 8 weeks. HAs: hydroxyapatite sheet, NB: newly formed bone

Figure 11は、マイクロX線CT断面像で観察された新生骨の形成量(面積)を計測した結果を示す。対照群、実験群はいずれも有意に時間とともに増加し、対照群に比べて実験群が有意に形成量が多かった。

(7) 骨髄幹細胞由来抽出蛋白に含有成分

骨髄幹細胞由来抽出蛋白溶液に含まれる成長因子は、IGFBP-3、-6、-4、-2、VEGF、Insulin、TIMP-2、PAI-1、Activin A、VEGF-R1、MIF、ANG-1、TIMP-1、CPN、TNF $\alpha$ 1、HGF、FGF-4、OPG、TGF- $\beta$ 1、Angiogenin、BMP-5などが含まれている。

(8) 骨髄幹細胞由来抽出蛋白含浸ハイドロキシアパタイトの骨形成効果

骨髄幹細胞由来抽出蛋白を含有した群と生理食塩水を含有した群での骨形成について比較した。組織学的には8週までにハイドロキシアパタイトシートの脳側、皮膚側周囲に新生骨形成がみられ、シートをとり囲んだ。新生骨は、対照群ではおもに骨欠損部の辺縁から伝導性に形成がみられたが、実験群の2週では脳側にも島状に新生骨の形成が確認された。実験群に含浸された骨髄幹細胞由来抽出蛋白の効果と思われた。また新生骨の形成は、組織観察においても明らかに皮膚側に比べ、脳側で形成量が多かった。8週では脳側においてより厚く新生骨の形成が確認された。

マイクロX線CTでの立体構築像をFigure 13および14に示した。Figure 13の皮膚側に比べ、脳側では欠損のマーヅンが不明瞭になり欠損部からの骨形成による修復が進んだことが明らかとなった。一方で皮膚側では、対照群、実験群ともに欠損部の外景が明瞭であり、骨形成による修復が脳側に比べて明らかに遅いことがわかった。

Figure 15は、皮膚側、脳側での骨形成量の計測データを示した。縦軸の数値が異なることを

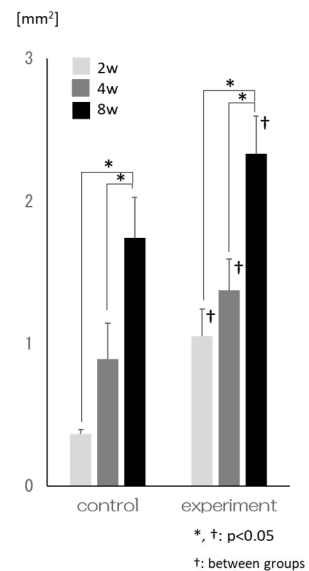


Figure 11. Changes in new bone formation using CT images

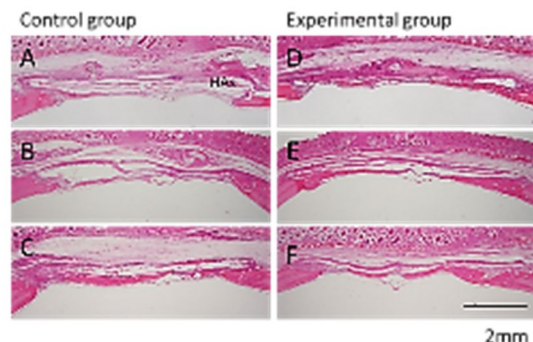


Figure 12. Tissue findings with a hydroxyapatite sheet ( $\times 12.5$ ). Control group: A: 2 weeks (HE staining), B: 4 weeks (HE staining), C: 8 weeks (HE staining). Experimental group: A: 2 weeks (HE staining), B: 4 weeks (HE staining), C: 8 weeks (HE staining). HAs: Hydro apatite sheet.

配慮し、確認すると、有意に皮膚側に比べて脳側での骨形成量が多いことが確認された。皮膚側(A)と脳側(B)はいずれも実験群での骨形成量が多く、特に実験2週後の早期では、有意に実験群が多いことが明らかになったが、8週では骨改造によると思われる骨量の減少がみとめられた。

(9) ハイドロキシアパタイトシート周囲の破骨細胞反応

Figure 16は、ハイドロキシアパタイトシート周囲の破骨細胞の出現を示している。破骨細胞様細胞はハイドロキシアパタイトシートの皮膚側、脳側の両方にみられた。実験群での4週では特に脳側4週では多く、経時的に変化があることが推察された。Figure 17は、破骨細胞様細胞の密度について計測した結果で、皮膚側に比べ脳側で多くみられた。皮膚側では2、4、8週で経時的に増加を示したが、対照群と実験群で有意な差はみられなかった。一方、脳側では4週の実験群で最も出現数が多く、その後減少した。

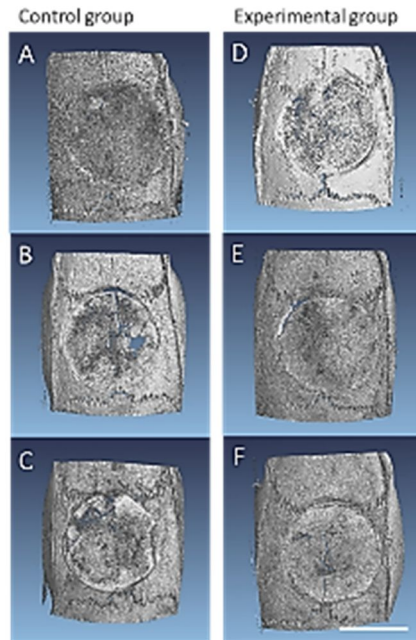


Figure 13: Micro X-ray CT stereoscopic image on the skin side of the bone defect. Control group: A: 2 weeks, B: 4 weeks, C: 8 weeks; Experimental group: D: 2 weeks, E: 4 weeks, F: 8 weeks

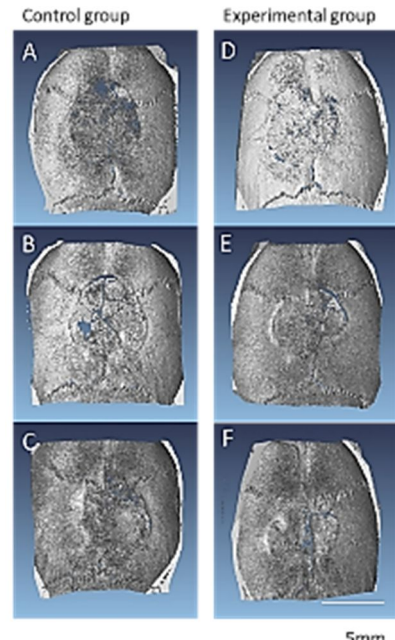


Figure 14: Micro X-ray CT stereoscopic image on the brain side of the bone defect. Control group: A: 2 weeks, B: 4 weeks, C: 8 weeks; Experimental group: D: 2 weeks, E: 4 weeks, F: 8 weeks

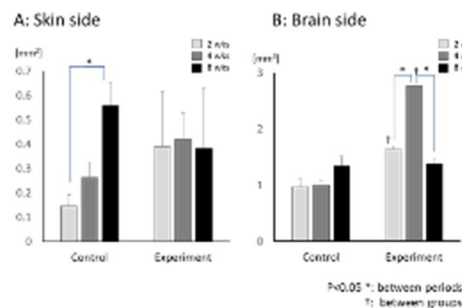


Figure 15: Change in new bone formation over time. (\*: P < 0.05) A: Skin side of HA sheet, B: Brain side of HA sheet.

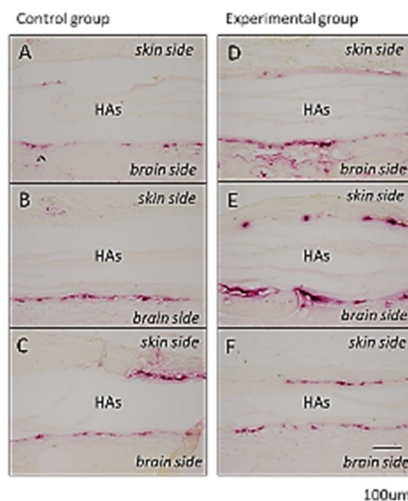


Figure 16: Osteoclasts on the surface of hydroxyapatite sheet (×400). Control group: A: 2 weeks, B: 4 weeks, C: 8 weeks; Experimental group: D: 2 weeks, E: 4 weeks, F: 8 weeks.

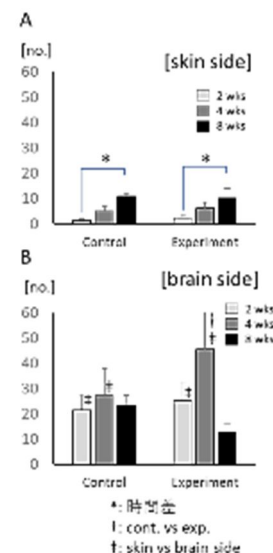


Figure 17: Time dependent change in the number of osteoclasts on the hydroxyapatite sheet surface (\*: p < 0.05)

(10) 総括

ハイドロキシアパタイトシートは線維の凝集構造で、生体安全性および骨形成能を有する優れた材料であり、その構造から薬剤の含浸の能力が高く、異なる薬剤のシートを組み合わせることによって時間差での組織作用の再生治療に活用できると思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hajime Kashiwada, Yoshinaka Shimizu, Yuya Sano, Kensuke Yamauchi, Hong Guang, Hiroyuki Kumamoto, Hidero Unuma, Ying-Jie Zhu	4. 巻 in print
2. 論文標題 In vivo behaviors of highly flexible paper consisting of ultralong hydroxyapatite nanowires	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Part B Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 in print
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.b.34819	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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	山内 健介 (Yamauchi Kensuke)  (10364150)	東北大学・歯学研究科・准教授  (11301)	
研究分担者	三木 康宏 (Miki Yasuhiro)  (50451521)	東北大学・災害科学国際研究所・講師  (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------