

機関番号：17301
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K11911
 研究課題名(和文) Micro-graftを用いた培養操作を介さない骨再生法の確立

研究課題名(英文) Bone regeneration by non-cultured micro-graft

研究代表者

大場 誠悟 (OHBA, Seigo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：80363456

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)：Hydroxyapatite/collagen composite material (HAp/Col)をオス家兔の脛骨に形成した直径6mmの骨欠損に移植したところ、骨欠損と同等のサイズのHAp/Colを移植した場合が最も骨新生が認められた。本材料にmicro-graftを浸漬させた上で移植を行うと、さらに旺盛な骨新生が確認された。ラットの頭頂骨上に直径8mmの骨欠損を作成し、BMP-2やLeptinをHAp/Colに添加した後、凍結乾燥させた上で移植したところ、良好な骨形成の促進を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のインプラント治療計画は補綴主導型であり、補綴的に理想的な位置にインプラントを埋入することになる。歯を喪失すると歯を支える歯槽骨は吸収するため、インプラント埋入箇所は必然的に必要骨量が不足することとなる。このような場合には骨新生を必要とするが、ブロック骨移植だとドナーサイトが必要となる。比較的よく用いられているHAなどの人工材料は吸収されないために、インプラントと骨の接触を妨げたり、感染のリスクが存在する。本研究で用いたHAp/Colは完全に吸収置換されるとともに、ドラッグデリバリーとしても使用可能であるため、より低侵襲で骨新生が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hydroxyapatite/collagen composite material (HAp/Col) induced obvious bone formation when HAp/Col was filled into the bone defect (diameter; 6 mm) at the tibia of male rabbit. In this time, the appropriate size of HAp/Col was same size as that of bone defect. The mixture of HAp/Col and micro-graft enhanced bone formation on the mouse calvarium. BMP-2 solution (0.5 and 1.0 micro gram/ml) was dipped on the HAp/Col and the mixture material was frozen dry to capture BMP-2 into the HAp/Col. The mixture was transplanted into the defect (diameter; 8 mm) of the rat calvarium. BMP-2 enhanced the bone formation dramatically, even if its dose was very low (0.5 micro gram/ml). Same as BMP-2, leptin also induced bone formation at the defect of rat calvarium when HAp/Col conveyed leptin.

研究分野：口腔外科学

キーワード：骨再生 HAp/Col leptin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療は、歯の欠損補綴の治療の選択肢として必須なものになってきている。現在のインプラント治療計画は、補綴主導型で行い、理想的な補綴を設計した上で、その補綴に必要な位置及び方向へのインプラント埋入を計画する。そのため、インプラント治療を行うにあたり、必要十分量の骨が存在せず、骨移植などの処置が必要となることがある。

骨造成のためには自家ブロック骨移植術や guided bone regeneration (GBR) など様々な方法が用いられている。ブロック骨移植の場合にはドナーサイトが必要であり手術侵襲が大きくなる、母骨に密着した状態で移植する必要があり難易度が高いなどの欠点がある。また GBR では様々な人工材料が用いられているが、感染のリスクや不十分な骨新生など、確立した方法がまだ存在しない。Hydroxyapatite/collagen composite material (HAp/Col) は、良好な骨新生を誘導するのみではなく、それ自身は母骨に吸収置換されるため有用な材料であると考えられるが、骨新生の確実性に不安が残る。

そこで、小さな組織を細かく砕き、これを組織片ごと担体に浸漬し使用する micro-graft に着目した。Micro-graft は担体に浸漬させて使用することで、皮膚であれば約 20 倍の面積の皮膚再生を可能とすることが報告されており、組織中に存在する未分化間葉系幹細胞を有効に用いることができるとされている。我々は、Micro-graft を用いることで、血管新生が誘導されることを確認しており、これを HAp/Col に組み合わせることで良好な骨新生が可能となり、低侵襲で確実性の高い骨新生法が確立できると考えた。また本材料に様々な成長因子を添加することにより、さらに良好な骨新生を可能にできると考えた。BMP-2 は骨形成に必須のタンパク質であるが、使用濃度が濃い場合には著名な炎症反応を惹起するなどリスクを伴う。我々は以前よりエネルギー代謝に重要なホルモンである leptin に着目してきた。本ホルモンは局所では骨芽細胞に働き、形態発生に重要な役割を果たす蛋白である wnt のレセプターである frizzled や LRP の発現を上昇することを確認した。そこでホルモンである leptin を用いることで、生体内で安定して骨新生を enhance できるのではないかと考えた。HAp/Col の 20% は collagen で構成されており、タンパクを吸着できると考えられる。Micro-graft に存在する様々な細胞にこれらのタンパク(成長因子)が作用し、旺盛な骨形成が可能になると考えられた。

2. 研究の目的

HAp/Col の骨新生能を確認し、micro-graft を用いることで骨新生が enhance されるかを確認する。また BMP-2 や leptin などの成長因子を添加し、HAp/Col が drug delivery として用いることが可能であるかを明確にする。

3. 研究の方法

(1) HAp/Col をオス家兔の脛骨に形成した直径 6mm の骨欠損領域を作成し、骨形成能を評価した。骨欠損より一回り小さい(3x3x5 mm)あるいは大きいサイズ(7x5x5 mm)、及び骨欠損と同等のサイズ(5x5x5 mm)の 3 種を骨欠損部に填入した。本材料は dry な状態では脆いが、95%の気孔率を有し、湿潤させるとスポンジ様形態となる。従来は血液や PRP で湿潤させていたが、脛骨に骨欠損を形成する際の出血で代替した。術後 2、4、8、12 週後にマイクロ CT 撮影し、骨形成状態を評価した。術後 4、8、12 週目に屠殺し、組織評価を行った。

(2) (1)の家兔の脛骨に骨欠損を作成することで、一定の割合で下肢の骨折が認められたため、動物種をラットに変更した。ラットの頭頂骨上に直径 8mm の骨欠損を作成し、ここに HAp/Col を填入し、骨形成能を評価した。HAp/Col のサイズは(1)の結果から骨欠損と同サイズの直径 8mm とした。骨欠損のみを control、HAp/Col のみを sham とした。骨形成に重要な役割を果たす BMP-2 を低容量(0.5、1.0 マイクログラム)HAp/Col に添加し凍結乾燥したものを実験群とした。移植後 2、4、8、12 週後にマイクロ CT を撮影し、骨欠損領域の骨新生状態を確認した。また、移植後 8、12 週後に屠殺し、組織学的検討を行った。

(3) (2)の結果から、HAp/Col がタンパクを保持できることが明らかになった。そこでエネルギー代謝に重要なホルモンであり、固体発生に必須な蛋白である wnt のレセプターの frizzled や LRP の発現を上昇させる leptin を BMP-2 と動揺に HAp/Col に浸漬させ凍結乾燥させたものを移植した。過去の結果で、in vitro では、軟骨細胞や、骨芽細胞に 100nM で作用し、frizzled や LRP5/6 の発現に関与することを示した。そこで、leptin の濃度を、10、100、1000nM に割り振り、これを HAp/Col に吸着させ凍結乾燥した。

(4) HAp/Col がタンパク質を吸着しこれを組織内で供給できることが(2)、(3)で確認できた。豚埋伏歯の歯髓を細砕し micro-graft を作成した。これを培養操作を介さずに HAp/Col に浸漬させマウスの頭頂骨上に移植を行った。

4. 研究成果

(1) control 以外のすべての群で骨新生は認められたが、材料のサイズが小さい群では骨再生に時間を要し、材料のサイズが大きい場合には、材料本体の吸収置換に時間を要した。移植後 8 週間では、control 以外の群で骨欠損部の皮質骨は連続していた。しかしながら、その皮質骨の厚さは、3x3x3mm の群では残り 2 つの群に対して、優位に薄い結果であった。また、骨髓内の材料の残存量は、5x5x5mm 群で他の群より優位に少ない結果であった。すなわち、HAp/Col は少ないと周囲骨からの骨伝道が遅れ骨新生に時間を要し、その結果母骨の理モデリング機構に取り込まれて吸収置換に要する時間が長くなると考えられる。一方、HAp/Col が多い場合には、周囲の母骨と密着可能なため、骨伝道は問題ないが、材料の構成成分である HA の体積当たりの量が増し、また、95%の気孔率が圧縮されることで小さくなってしまふことから、吸収置換に時間を要したものと考えられる。骨形成能・吸収置換の観点から骨欠損と同等のサイズ/material を填入するのが最も適していると判断された。

(2) control 群では骨欠損部は観察期間中は、ほとんど骨欠損の大きさに変化を認めなかった。移植後 4 週では Sham 群では材料が母骨に接している箇所であると考えられる骨欠損部の辺縁にわずかに骨様構造物が確認された。これに対して、BMP-2 群では明らかな骨新生が確認された。術後 8 週では、sham 群でも明らかな骨新生が確認されたが、骨欠損部をまたいでブリッジを形成するほどではなかった。これに対して、BMP-2 群では 0.5 マイクログラムの群であっても、骨欠損領域を一部では完全に跨ぐような骨形成を認めた。1.0 マイクログラム群ではさらに旺盛で、母骨の厚さの 1.5-2.0 倍の厚さの新生骨を形成している箇所も認められた。これらのことから HAp/Col は BMP-2 を吸着し、移植後にこれらを放出することが可能であることが証明された。また、HAp/Col に含有される HA を足場にすることで、BMP-2 の効果や効率よく発揮され、極めて低容量での骨形成誘導が可能になったと考えられる。すなわち、HAp/Col は骨補填材としての使用とともに、drug delivery system としても使用可能であることが確認された。

(3) BMP-2 と同様に sham と比較して、leptin 群では骨新生が enhance されることが確認された。(2)と同様にマイクロ CT 上でも組織検査上でも骨新生が確認された。Leptin はホルモンであるが、局所作用も有することが確認された。実際に骨関節症の滑液内には leptin が健常者よりも高濃度に含まれていることが確認されており、leptin が骨関節症の osteophyte の形成に関与すること考えられる。生体内で安定しており、安全な leptin による骨形成の促進が可能になれば、安全な骨新生法の一助となりうる。現在、組織標本で、wnt のレセプターである frizzled や LRP5/6 の発現を検討中である。

(4) HAp/Col 単独群と比較して、micro-graft+HAp/Col 群では、優位に骨新生が enhance された。また成熟速度も早く、移植後 8 週で新生骨内には骨髓が形成され、母骨との区別が不明瞭になっていた。

今後は micro-graft を、BMP-2 や leptin などの成長因子を添加させ凍結乾燥させた HAp/Col に浸漬させた上で移植を行い、骨新生を評価する予定。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大場誠悟、中谷佑哉、四道玲奈、榎原峻、住田吉慶、朝比奈泉
2. 発表標題 骨欠損領域の骨造成に最適なhydroxyapatite/collagen composite materialの填入法
3. 学会等名 第72回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----