

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16622

研究課題名(和文) micro-engineeringを用いた血管ネットワーク付き人工骨の開発

研究課題名(英文) Development of vascularized artificial bone using micro-engineering technology

研究代表者

河井 利之 (Kawai, Toshiyuki)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：80806828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：人工物内部で組織再生が起こるには、インプラント深部までホスト細胞が進入して生存する必要があり、インプラント全体を栄養する微小血行路の再生が必要となる。今回ラットの大腿骨に8mmの欠損を作成し、三次元微細造形技術で作成した多孔体にBMP-2を添付し、大腿動静脈の分枝Superficial epigastric artery+veinをトンネル内に挿入し骨形成・血管新生が促進されることを確認した。今回の研究から、3次元微細造形技術を用い血管束挿入を併用することで巨大骨欠損の再建の可能性が示された。今後は血管部分も人工材料で作成した人工血管付人工骨による再建が目標となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨欠損に対し、近年自身の骨の移植を行わず組織工学的手法により、細胞・足場・成長因子などを組み合わせて硬組織再生を行う方法が有望視されている。人工物内部で組織再生が起こるには、インプラント深部まで自身の細胞が進入して生存する必要があるが、細胞は栄養の供給源から数百マイクロメートル以上離れてしまうと生存することができない。そのためインプラント全体を栄養する微小血行路の再生が必要となる。我々は近年著しい進歩を遂げている微小造形の技術を利用してインプラント内に三次元微小血管ネットワークの誘導をおこなった。この技術によりこれまで不可能であった巨大骨欠損部の再建が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Vascularization is currently considered the biggest challenge in bone tissue engineering due to necrosis in the center of large scaffolds. We established a new expendable vascular bundle model to vascularize a 3D printed channelled scaffold with and without BMP2 for improved healing of large segmental bone defects. Bone formation and angiogenesis in an 8 mm critical sized bone defect in the rat femur were significantly promoted by inserting a bundle consisting of the superficial epigastric artery and vein into the central channel of a large porous polycaprolactone scaffold. BMP-2 delivery was found to promote not only bone formation, but also angiogenesis in the critical sized bone defects. Both insertion of the vascular bundle alone and BMP-2 loading alone induced comparable levels of angiogenesis and when used in combination, significantly greater vascular volume was observed. These findings suggest a promising new modality of treatment in large bone defects.

研究分野：整形外科学

キーワード：bone defect angiogenesis vascularization polycaprolactone BMP2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

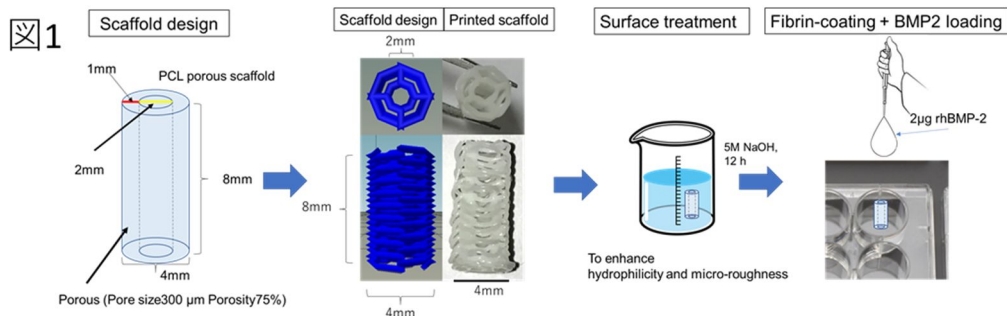
頭蓋顔面骨・四肢骨の骨欠損は、骨折・変性・先天性形成異常・腫瘍切除の結果生じ、治療には多くの場合骨補填(骨再生)を要する。このような患者に対しては本邦では自家骨移植が選択される事が多いが、採骨可能な部位・量が限られる上、採骨部の疼痛・機能低下といった問題があった。欠損部のサイズや部位によっては自家骨移植単独では十分な血流が得られず、血管柄付自家骨移植が必要になる場合もある。近年採骨を行わず、組織工学的的手法により、細胞・Scaffold・成長因子などを組み合わせて硬組織再生を行う試みがなされているが、組織工学的に作成した人工骨は深部を栄養する血流がないためサイズ・部位によっては生着の遅延化もしくは癒合不全を起こし、血管柄付自家骨移植に匹敵するような骨再生の手法はいまだ確立していない(Canecedda R, Biomaterials 2007, Christenson EM J Orthop Res 2007)。

2. 研究の目的

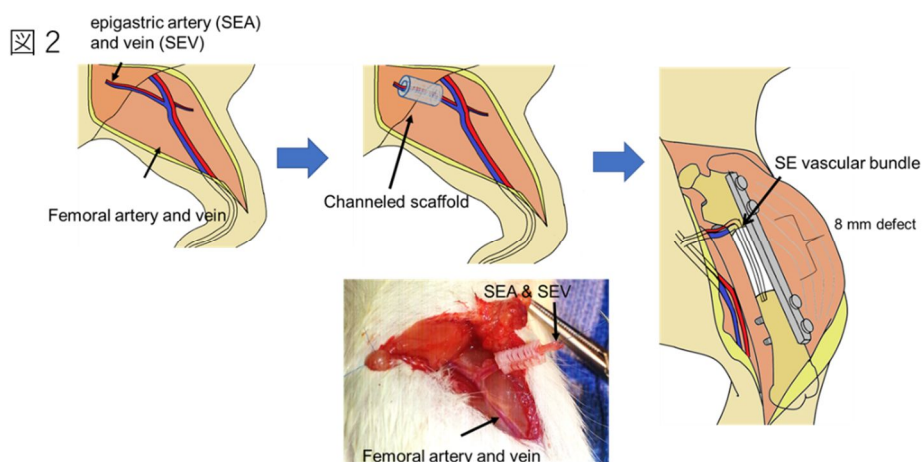
Microfabrication(マイクロレベルの微細造形)を用いて微細血管ネットワーク構造を持つ人工骨を作成し、生体内でインプラントを還流する栄養路の構築を目指す。これにより骨欠損に対してサイズの制約を受けない骨再生医療を実現することを目的とする。

3. 研究の方法

ポリカプロラクトン(Sigma-Aldrich Chemical Company)を用いて、直径4mm長さ8mmの多孔体を3次元印刷することとした。PythonのG-code generatorを用いて、上記サイズの多孔体を印刷した。中央に血管束を挿入するための直径2mmのトンネルをデザインした(図1)。



ラットの大腿骨に8mmの欠損を作成し、欠損部に多孔体を留置して骨再生、血管新生量を評価した。作成した多孔体に recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)2µグラム添付し、大腿動静脈の分枝 Superficial epigastric artery+vein をトンネル内に挿入した(図2)。



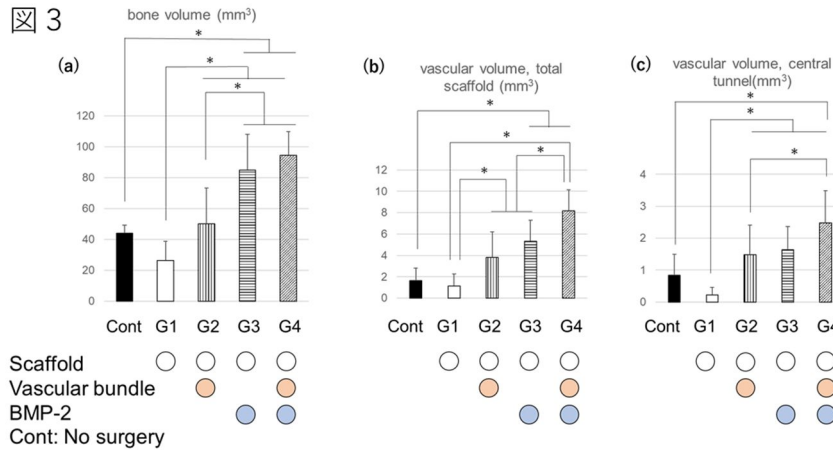
比較のため、グループ1(多孔体のみ)、グループ2(多孔体+血管束)、グループ3(多孔体+BMP-2)、グループ4(多孔体+BMP-2+血管束)の4群に分け、それぞれ4週、8週においてレントゲン撮影を行い骨癒合の有無を確認した。8週の間で、腹部大腿動脈から Microfil を注入し下肢血管造影を行った。造影後にマイクロCT撮影を行い、その後EDTAを用いて脱灰後に再びマイクロCTを撮影した。

脱灰後のCTで骨欠損部にできた血管新生量を測定した。また、脱灰前、脱灰後のCT上のポリユ

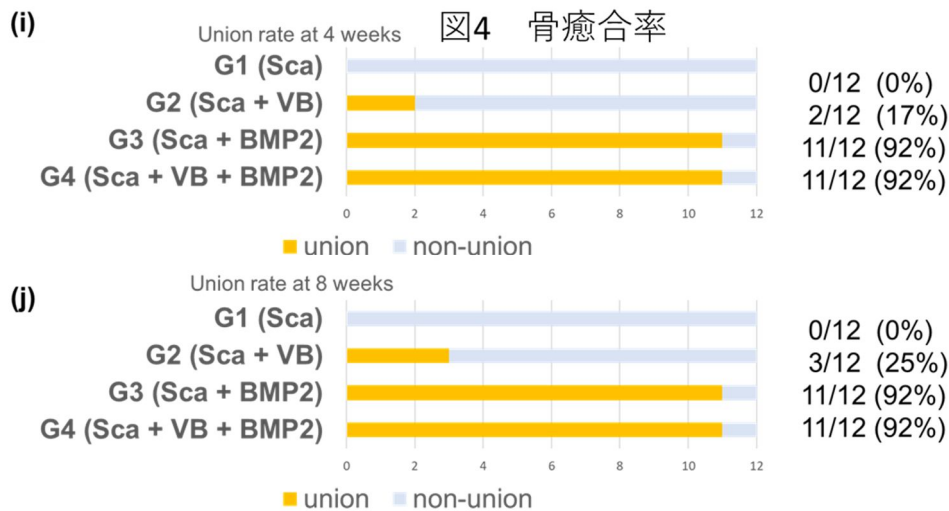
ームの差を骨形成量とした。骨欠損部全体の血管新生量、トンネル内の血管新生量に分けて計測を行った。

4. 研究成果

骨形成量はグループ2でグループ1より有意に多く、また血管新生量もグループ2はグループ1より有意に多かった。血管束の挿入により多孔体への血管新生と骨形成が増強されたことが確認できた(図3)



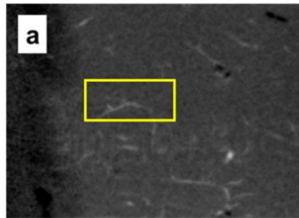
骨癒合率でみると、4週の段階ではグループ1 4で0%、17%、92%、92%であった。8週では0%、25%、92%、92%であり、血管束の挿入により骨新生は増強したものの、骨癒合率の上昇は満足するものではなかった(図4)



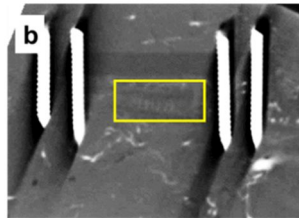
脱灰後のマイクロCTをみると、グループ3では欠損部周囲から微小血管が侵入してきていることがわかる。BMP-2の持つ血管誘導作用によるものと思われた。またグループ2では中央のトンネルから周囲にsproutするように微小血管が存在していることがわかる(図5)。グループ4ではグループ1-3と比較しても有意に多い血管新生を認めていた。BMP-2と血管束によるシナジー効果が得られていると考えられた。

図 5

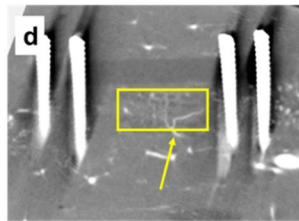
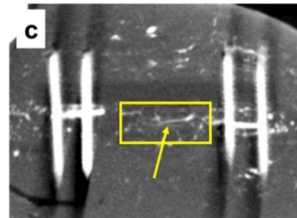
無処置



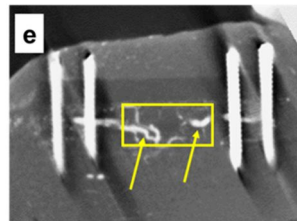
グループ 1



グループ 2



グループ 3



グループ 4

今回の研究から、3次元微細造形技術を用い血管束挿入を併用することで巨大骨欠損の再建の可能性が示された。今後は血管部分も人工材料で作成した人工血管付人工骨による再建が目標となる。

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 Toshiyuki Kawai, Chi-Chun Pan, Yaichiro Okuzu, Takayoshi Shimizu, Alexander Stahl, Shuichi Matsuda, William Maloney, Yunzhi Peter Yang	4. 巻 epub
2. 論文標題 Combining a vascular bundle and 3D printed scaffold with BMP-2 improves bone repair and angiogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Eng Part A	6. 最初と最後の頁 epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEA.2021.0049	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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------