

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (C)	
研究期間：2007～2008	
課題番号：19592299	
研究課題名 (和文)	新規多孔質セラミックスの骨形成発現メカニズムの細胞および遺伝子レベルでの解析
研究課題名 (英文)	analysis of osteogenic mechanism cell and genetic level of novel NEOBONE®
研究代表者	二宮 嘉昭 (NINOMIYA YOSHIAKI) 広島大学・病院・助教 研究者番号：60335685

研究成果の概要：

NEOBONE®は、ヒト顎骨骨芽細胞の増殖、分化および石灰化を支持し、顎骨組織再生において有用な生体材料である可能性が明らかとなった。また、骨芽細胞の足場としての scaffold としても有用であり、NEOBONE®と骨芽細胞複合体は生体親和性および骨伝導能を有し、骨組織の早期再生を促進することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：多孔質セラミックス、骨芽細胞、遺伝子解析、焼結アパタイト、チタン

1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域における腫瘍、嚢胞などの治療に伴う顎骨欠損部の再生には自家骨移植が第一選択であるが、二次的な骨採取手術の必要性、採取できる骨の量、形態や移植骨の吸収などの問題から、骨の無機主成分であるアパタイトを化学合成、焼結したアパタイト焼結体が骨補填・充填材として臨床応用されている。数年前、石膏のように硬化し、硬化体がアパタイトになるアパタイトセメント

の臨床応用が欧州および北米で認可され、画期的な骨再建材料として注目されていたため、申請者らは以前よりアパタイトセメントに着目し、同セメントの高機能化研究を進めてきた(研究業績、研究略歴参照)。研究過程においては、実験動物を用いてその生体親和性、骨伝導性等の検討を行ったが、アパタイトセメントの骨伝導性は焼結体アパタイトと比較して、格段に優れることが証明された。また、焼結体ア

パタイトは全く骨と置換しないが、アパタイトセメントは長期的にはあるが、骨と置換すると報告されている。しかし、アパタイトセメントを実際に臨床応用した場合、強度の問題と骨置換の速度の遅さに問題が残されている。そこで、これらの問題点を払拭するような最適な材料として、最近、独自の成形技術である「超泡ゲル化技術」の応用により、ハイドロキシアパタイト単一成分で、生体組織が容易に内部まで侵入する多孔体構造（内部結合を有する三次元連通気孔）をもつ新規多孔質セラミックス（NEOBONE®）が開発され、臨床応用が整形外科領域において認可され、画期的な骨再建材料また組織工学や再生医療における担体（scaffold）として注目されつつある。そのため、多数の気孔同士が、直径平均40 μm の大きな気孔間連通部により骨補填剤全域にわたって気孔が繋がった三次元連通気孔構造を有している。多孔質セラミックス（NEOBONE®）は、気孔率が72-78%、平均気孔径が約150 μm で、そのため、生体組織の迅速な侵入と良好な骨伝導能をもち、優れた内部骨形成能を可能とする材料である。また、臨床的に顎骨再建材料として使用する場合、強い強度が要求されるが、この材料は、海綿骨の数倍程度の適度な強度を有し、操作性においても優れた特徴をもっている。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝子工学的手法を用いて、多孔質セラミックス（NEOBONE®）の優れた骨伝導性、骨形成メカニズムを細胞レベル、遺伝子レベルで解明しようとするものである。本研究の遂行により、材料学的要素に起因する骨伝導性の差異の発現機構が細胞レベル、遺伝子レベルで明らかにされれば、多孔質セラミックス（NEOBONE®）の臨床応用に基礎的な裏付けがなされるだけでなく、より理想的な顎骨再建の材料設計にも

大きく寄与すると考えられる。

3. 研究の方法

(I) ヒト正常顎骨由来骨芽細胞の初期接着能の測定

24 wellプレートに直径10 mm、厚さ2 mmのディスク状のNEOBONE®、チタン、焼結体アパタイトを作成し、静置する。その上に 1×10^4 個のヒト正常顎骨由来骨芽細胞を播種する。培地として2 mM β -グリセロリン酸および50 $\mu\text{g/ml}$ アスコルビン酸を含む α -MEMを用いる。5時間培養後、トリプシン処理を行い細胞を回収し、0.15% トリパンプルーを用いた色素排除法にて、附着骨芽細胞数を測定する。コントロールとしてディッシュ上で培養を行う細胞を用い、また細胞株としてMC3T3-E1も用いて同様に実験を行う。

(II) 相対増殖率の測定

(I) の実験と同じディスク上に 1×10^4 個のヒト正常顎骨由来骨芽細胞を播種し、5時間培養後、さらに培地を添加し10日間培養を行う。播種して1・3・5・7・10日後、MTT assayを行う。測定にはマイクロプレートリーダーを使用し、波長570 nmにて吸光度を測定し、増殖率の検討を行う。

(III) 骨形成マーカー遺伝子の発現解析

(I) と同様に培養を行い、培養7、14、21日後の細胞からmRNAを抽出し、これを鋳型としてcDNAを作成し、骨形成マーカーであるAlkalinephosphatase、Type I collagen、Osteocalcine、Osteopontinの遺伝子発現をRT-PCR法およびリアルタイムRT-PCR法にて検討する。

(IV) 走査型電子顕微鏡による骨芽細胞の形態観察

走査型電子顕微鏡（Scanning electric microscope、SEM）を用いて、培養骨芽細胞とディスク状のNEOBONE®、チタンおよび焼結体アパタイトの形態観察を検討する。具体的には、ディスク体試料を2.5%グルタルアルデヒドを含むPBSで2時間前固定した後、2%四酸化オスミウムを含むPBSで2時間後固定を行い、脱水処理後、酢酸イソアミルに置換しSEM観察用試料を作成する。

(V) マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

10 cm ディッシュ 2 枚に直径 30 mm、厚さ 2 mm の上記 3 種類のディスク体試料を計 16 枚静置させ、2 mM β -グリセロリン酸および 50 μ g/ml アスコルビン酸を含む α -MEM にて 5 時間培養後、さらに培地を加え 14 日間培養を行う。RNA を細胞から抽出し、サンプルの濃度、純度を測定する。サンプル量は 7 μ g 以上回収し、Affymetrix[®] GeneChip[®] にて網羅的遺伝子発現解析を行う。コントロールとしてディッシュ上で培養を行う細胞の RNA を用い、①コントロール 対 NEOBONE[®]、②コントロール 対 チタン、③コントロール 対 焼結体アパタイトの遺伝子発現解析を行い、これら 4 者間の遺伝子発現の差を検討する。

(VI) NEOBONE[®] と培養骨芽細胞を用いた骨形成の組織学的検討

数種類形態の NEOBONE[®] を MC3T3-E1 細胞浮遊液に浸し 2 mM β -グリセロリン酸および 50 μ g/ml アスコルビン酸を含む α -MEM 培地にて培養、分化させ同系マウス皮下に移植する。移植後 2、4、8 週に試料を摘出し、骨形成マーカーである Alkalinephosphatase、Type I collagen、Osteocalcine、Osteopontin の遺伝子発現を RT-PCR 法およびリアルタイム RT-PCR 法にて検討するとともに、骨の再生をマイクロ CT を用いて三次元的に評価する。また、病理切片を作成し、組織学的評価を行う。

(VII) 培養骨髄細胞を用いた骨形成の組織学的検討

ラットの大腿骨から採取した骨髄細胞を培養し、骨髄間葉系細胞を回収後、上記 (I) のように同系ラット脛骨に数種類の形態の NEOBONE[®] を移植する。移植後 2、4、8 週に試料を摘出し、骨形成マーカーである Alkalinephosphatase、Type I collagen、Osteocalcine、Osteopontin の遺伝子発現を RT-PCR 法およびリアルタイム RT-PCR 法にて検討するとともに、骨の再生をマイクロ CT を用いて三次元的に評価する。また、病理切片を作成し、組織学的評価を行う。

4. 研究成果

まずヒト正常顎骨由来骨芽細胞の骨再生の評価として、作製した試料上にヒト正常顎骨由

来骨芽細胞を播種し、培養後、実験を行った。その結果、NEOBONE[®] は、対照群として用いたチタン、焼結体アパタイトと比較して、細胞接着能、増殖能、アルカリフォスファターゼ活性、タイプ I コラーゲン合成能 およびオステオカルシン産生能において優れていた。次に、NEOBONE[®] と骨芽細胞の複合体を利用し異所性骨形成実験を行った。NEOBONE[®] と骨芽細胞を培養することによって試料を作製し、同系ラットの脛骨に移植した。その結果、経時的に新生骨量は増加し、移植後 8 週においては、試料全体において骨形成が認められた。以上の結果から NEOBONE[®] は、ヒト顎骨骨芽細胞の増殖、分化および石灰化を支持し、顎骨組織再生において有用な生体材料である可能性が明らかとなった。また、骨芽細胞の足場としての scaffold としても有用であり、NEOBONE[®] と骨芽細胞複合体は生体親和性および骨伝導能を有し、骨組織の早期再生を促進することが明らかとなった。少量の自己の顎骨より培養した骨芽細胞と NEOBONE[®] の複合体の応用は、口腔外科領域において、従来の自家骨移植と比較して手術侵襲が少なく、有用な顎骨再建・増生材料となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Masaaki Takechi, Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorphometric study. Journal of materials science. Materials in medicine. 有. 19 2008 2949-2952

2. Misato Hiraoka, Masaaki Takechi, Hideo Shigeishi, Masahiko Minami, and Nobuyuki Kamata. Evaluation of bone regeneration of osteoblasts derived from human jaw bone cultured on interconnected porous hydroxyapatite ceramics (NEOBONE[®]). Archives of BioCeramics Research. 有 7 2007. 255-260.

[学会発表] (計 6 件)

1. 武知 正晃 アテロコラーゲン含有アパタイトセメントにおける骨形成評価 第30回日本バイオマテリアル学会シンポジウム 平成20年

11月17・18日 東京大学

2. 二宮 嘉昭 GM含有 α -TCP/ACの顎骨骨髓炎への応用に関する基礎的研究 - 基本物性と徐放特性について - 第30回日本バイオマテリアル学会シンポジウム 平成20年11月17・18日 東京大学

3. 二宮 嘉昭 GM含有 α -TCP/ACの顎骨骨髓炎への応用に関する基礎的研究 - 基本物性と徐放特性について - 第53回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会 平成20年10月20・21日 アスティとくしま

4. 平岡 美里: 新規連通多孔体ハイドロキシアパタイトの顎骨組織再生への応用に関する基礎的研究. 第53回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会. 平成20年10月20・21日. アスティとくしま

5. Misato Hiraoka: The bone Regenerative effect of Osteoblasts on Novel Hydroxyapatite Ceramics. International Association for Dental Research 86Th general session and exhibition. 平成20年7月2~5日. Metro Toronto convention centre, Canada

6. 平岡 美里: 新規連通多孔体ハイドロキシアパタイトセラミックスの顎骨組織再生への応用に関する基礎的研究. 第41回広島大学歯学会総会. 平成20年6月15日. 広島大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二宮 嘉昭 (NINOMIYA YOSHIAKI)
広島大学・病院・助教
研究者番号: 60335685

(2) 研究分担者

鎌田 伸之 (KAMATA NOBUYUKI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 70242211

武知 正晃 (TAKECHI MASAOKI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 00304535

瀧 雅行 (TAKI MASAYUKI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 00403551

(3) 連携研究者