

平成 21年 5月 8日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007年度～2008年度  
 課題番号：19592311  
 研究課題名(和文) 細胞ハイブリッド型人工骨による顎骨の再生医療に関する基礎的研究  
 研究課題名(英文) Bone regeneration around dental implants with artificial bone hybridized with cultured marrow stromal stem cells  
 研究代表者  
 代田 達夫(SHIROTA TATUO)  
 昭和大学・歯学部・准教授  
 研究者番号：19592311

研究成果の概要：インプラント治療において骨量が不足した場合には自家骨移植が最も有用である。しかし、大量の移植骨を必要とする場合には骨採取部の侵襲が大きくなることから、低侵襲な骨造成法の開発が望まれてきた。そこで本研究では、培養・増殖させたイヌ由来の未分化間葉系細胞と生体内吸収性の人工骨である - TCP を組み合わせた細胞ハイブリッド型人工骨を作製し、この人工骨を用いた骨再生の可能性について実験的に検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	105,000	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：生体材料，未分化間葉系細胞，顎骨再生，実験的研究

## 1. 研究開始当初の背景

インプラント治療における骨造成には自家骨移植がもっとも有用であるとされている。しかし、大量の移植骨を必要とする場合には骨採取部の侵襲が大きくなることから、低侵襲な骨造成法の開発が望まれてきた

## 2. 研究の目的

本研究の目的は最小限の手術侵襲でより効果的な骨の再生方法を確立するために、ミクロンオーダーの多孔性幾何構造を有するハニカム型 - TCP と培養・増殖させたイ

ヌ由来の未分化間葉系細胞とを組み合わせることによって、細胞ハイブリッド型人工骨を作製し、この人工骨をインプラント周囲に移植して骨の再生過程を形態学的に明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) 実験動物および骨髄細胞の採取  
 実験には体重約 12kg のビーグル犬(雌)を6頭用いた。骨髄細胞の採取は Kushi da らの方法 (STEM CELLS 2000: 18: 453-456) に準じ、還流法にて採取した。すなわち、大腿骨

骨幹部に 16G の注射針を 2 箇所刺入し、リン酸緩衝生理食塩水 (100U ノボヘパリン, 100U ペニシリン G および 100 ug/ml ストレプトマイシンを含有) を還流させて骨髄を採取した。この骨髄から比重遠沈法によって得られた中間層画分の細胞を D-MEM/10%FBS 中で培養し、初期付着細胞を未分化間葉系細胞 (BMSC) として使用した (図 1)。



図 1 . 還流法による骨髄の採取

### (2) 未分化間葉系細胞 (BMSC) の機能の確認

採取した BMSC の機能を検証するために  $1 \times 10^5$  個の細胞を 6cm dish に播種して骨芽細胞分化培地 (MSCGM BulletKitt, Osteogenic, Cambrex) および脂肪分化培地 (MSCGM Bullet, Adipogenic, Cambrex) 中でそれぞれ 6 週間培養した。次いで、アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色およびオイルレッド-O 染色を行い、骨芽細胞化および脂肪細胞化を確認した (図 2)。

脂肪分化培地で 6 週間培養



オイルレッド-O 染色



位相差顕微鏡所見

骨芽細胞分化培地で 6 週間培養



ALP 染色



位相差顕微鏡所見

図 2 . BMSC の分化能の確認

### (3) 細胞ハイブリッド型人工骨の作製

直径 3mm, 厚さ 1mm の円盤状に成型された -TCP に直径 300 $\mu$ m の孔が 37 箇所形成したものを八ニカム型 -TCP (以下 37H) として使用した。それぞれの実験動物から採取した BMSC を  $2 \times 10^5$  個/ml の濃度で 37H とともに 12 時間遠心管内で培養したもの、および培養液に rhBMP-2 (アステラス製薬より供与) 5 $\mu$ g/ml を添加して培養したものをそれぞれ細胞ハイブリッド型人工骨として実験に使用した (図 3)。

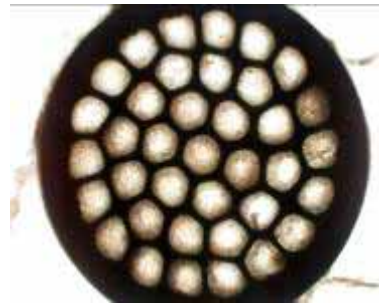


図 3. 37H における BMSC の培養 3 日目の所見

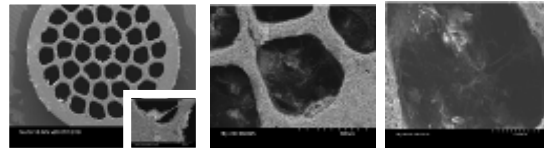


図 4. 37H における BMSC の培養所見 (走査電顕所見)

また、骨芽細胞へ分化させた細胞より mRNA を抽出し、RT-PCR 法により mRNA の発現を調べた。その結果、いずれの細胞においても Runx2 および osteocalcin の mRNA の発現が検出され、骨芽細胞への分化能が確認できた (図 4)。

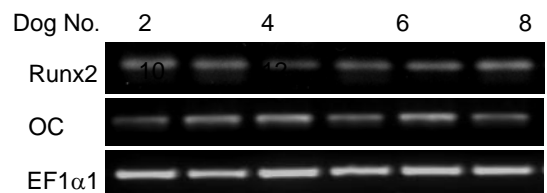
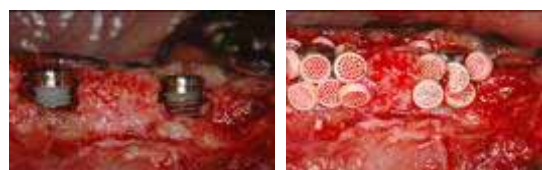


図 4 . BMSC における骨芽細胞系 mRNA の発現

### (4) 実験手順

下顎両側小臼歯を各 3 本抜歯後 3 ヶ月経過させてから以下の実験を行った。両側の下顎骨に  $5 \times 5 \times 5$  mm の骨欠損を 2 箇所ずつ形成し、同部へ直径 4.0mm, 長さ 11.5mm の Brånemark Mark TiUnite (Nobelbiocare) を植立した。次いで八ニカム型 -TCP (37H) 単独, BMSC を混合した 37H, および rhBMP を添加した 37H をそれぞれインプラント周囲に移植した。また、骨欠損を形成し、何も移植することなく閉創したものを対照とした (図 4)。



インプラントの植立

37H による骨造成

#### (5) 観察法

術後 28 日および 84 日目に下顎骨を摘出した。次いで試料を通常に従ってポリエステル樹脂にて包埋し、非脱灰研磨片を作製した。次いでトルイジンブルー染色を施し、光顕的に観察し、骨欠損部における骨の再生状態を比較検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 結果

対照のインプラントは術後 84 日目においてもその表面の大部分は結合組織によって覆われていた。37H のみを移植したインプラントでは、骨断端から 37H の表面に沿って新生骨の形成を認めたが、術後 84 日目においても骨とインプラントの直接接触は一部に見られたのみで、その表面の広い範囲が結合組織によって覆われていた (図 5-A)。

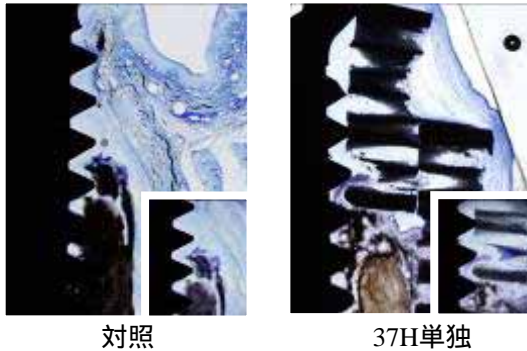
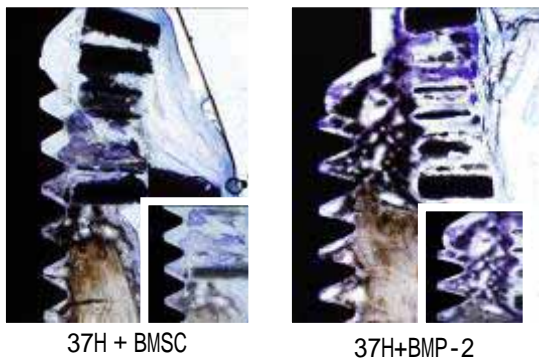


図 5-A 術後 84 日目の組織所見

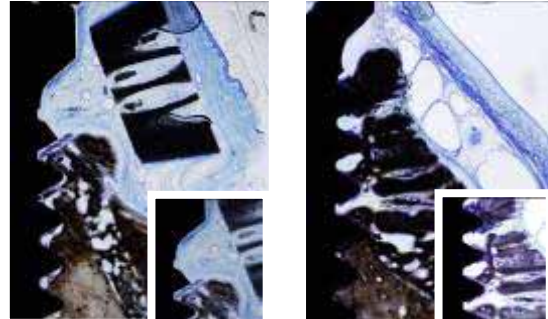
BMSC を混合した 37H を移植したインプラントも骨との接触は少なく、37H 単独の場合とほぼ同様の所見を呈していた。

一方、rhBMP-2 を添加した 37H を移植したインプラントでは、術後 28 日目より 37H の表面や孔内にも骨形成を認め、84 日目では 37H 表面に沿って形成された新生骨がインプラント表面の広い範囲で直接接していた (図 5-B)。



#### 図 5-B 術後 84 日目の組織所見

rhBMP-2 を添加した BMSC を混合した 37H を移植したインプラントにおいても、術後 28 日目より 37H 表面に沿って新生骨を認め、術後 84 日目では広い範囲で新生骨とインプラント表面との直接接触が見られた (図 5-C)。



術後28日目の所見 術後84日目の所見

図 5-C 37H + BMSC + rhBMP-2 の組織所見

#### (2) 結果に対する考察

インプラント周囲に形成した骨欠損部における骨再生には 37H に BMSC を混合しただけでは有効性は認められず、rhBMP-2 を添加することで効果的な骨再生が可能となった。

したがって、細胞ハイブリッド型人工骨に用いる細胞には未分化間葉系細胞の状態ではなく、rhBMP-2 によって骨原性細胞に分化誘導させた細胞の方が骨再生には有用であると考えられる。

#### (3) 得られた成果の国内外における位置付けとインパクトおよび今後の展望

骨組織の再生に必要な 3 大要素は幹細胞、Scaffold および成長因子であり、これらの全ての条件を満たすことによって適切な再生が可能となる。本研究では、これら 3 大要素の中で、特に基質の  $\mu\text{m}$  単位の構造が細胞増殖・分化ならびに組織形成に大きな影響を与えるという、Scaffold の幾何学的な側面に着目し、ハニカム構造を有する -TCP を Scaffold とした細胞ハイブリッド型人工骨を作製し、インプラント周囲における骨再生に応用する点が先駆的かつ独創的であったと思われる。さらに、このハニカム -TCP を Scaffold とした細胞ハイブリッド型人工骨を用いることによって、新たな顎骨再建治療の戦略として、口腔外科の臨床に貢献するものと考えられる。

今後は顎堤の骨吸収やインプラント周囲における歯槽骨欠損など比較的小さな骨欠損における骨再生のみならず、複雑な 3 次元形態を有する顎骨に対しても細胞ハイブリッド型人工骨を用いた顎骨の再生方法の

確立が必要であると考えられる。

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3件)

Matsui Y, Ohno K, Nishimura A, Shirota T, Kim S, Miyashita H.: Long-term study of dental implants placed into alveolar cleft sites. Cleft Palate Craniofac J 44: 444-447, 2007 (査読有り).

代田達夫, 松井義郎, 西村明子, 鈴木規子, 羽鳥仁志, 佐藤裕二, 宮下元, 新谷悟: 骨移植による顎裂閉鎖部へのインプラント治療に関する臨床的検討. 日口腔インプラント誌 21: 32-38, 2008 (査読有り).

Matsui Y, Shirota T, Yamashita Y, Ohno K.: Analyses of speech intelligibility in patients after glossectomy and reconstruction with faciocutaneous/myocutaneous flaps. Int J Oral and Maxillofacial Surg 38: 339-345, 2009 (査読有り).

〔学会発表〕(計2件)

1. 代田達夫, 八上公利, 吉澤泰昌, 他: 細胞ハイブリッド型人工骨によるインプラント周囲の骨再生に関する実験的研究, 第62回NPO法人日本口腔科学会学術集会 2008年4月17日, 福岡国際会議場

2. 八上公利, 代田達夫, 吉澤泰昌, 他: 幾何構造とメカノストレスを応用した自己間葉系幹細胞・ハニカムb-TCPハイブリッド型骨補填技術の開発 第26回日本骨代謝学会学術集会 2008年10月30日, 大阪国際会議場

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

代田達夫 (SHIROTA TATSUO)  
昭和大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 60235760

(2) 研究分担者

新谷悟 (SHINTANI SATORU)  
昭和大学・歯学部・教授  
研究者番号: 20294429

(3) 連携研究者

八上公利 (YAGAMI KIMITOSHI)  
松本歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 00210211

伊藤英寿 (ITOH HIDETOSHI)  
昭和大学・歯学部・非常勤講師  
研究者番号: 80384303

