

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10165

研究課題名(和文) 3Dプリント吸収性トレーと培養骨膜細胞により顎骨の形態を忠実に再建する

研究課題名(英文) Morphologically faithful reconstruct the of the jawbone with 3D printed absorbable trays and the cultured periosteal cell graft

研究代表者

永田 昌毅 (Masaki, Nagata)

新潟大学・医歯学総合病院・特任教授

研究者番号：10242439

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)：3Dプリント- TCPトレーの顎骨再建における可能性とともに、細胞親和性リコンビナントRGDペプチドの移植基材としての有効性、ならびに培養骨膜細胞の骨形成における作用を検討した。ヌードラットへのヒト培養骨膜細胞移植を3Dプリント- TCPトレーに入れた基材に封入して移植した。組織学的観察では骨形成はほとんど見られなかった。これは移植材の骨誘導活性の不足に起因すると考えられる。TCPトレーは異常な炎症細胞や骨破壊所見を示さなかったものの、観察期間では骨組織への置換は観察されなかった。3Dプリント- TCPトレーは毒性を示さず、賦形性の利点から顎骨再生における有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

培養自家骨膜による顎骨再生は「骨形成能」を基本とする再生療法であり、骨形成能は細胞療法によるのみ獲得できる効果であり、これによって広範囲かつ複雑な骨再生を期待することができる。TCPの3Dプリント技術はオーダーメイド人工骨として用いられつつあるが、本研究計画ではこれを造形性の高い顎骨再建トレーとして用いる。骨再生細胞療法のアドバンテージと3Dプリント- TCP吸収性再建トレーの形態再現性の融合はこれまでに類のない試みである。いずれも臨床段階にある技術であることから、将来、広範囲かつ複雑な形態の顎骨再生を低侵襲で実現することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the potential of 3D print- TCP trays in jawbone reconstruction, the effectiveness of the cell-affinitive recombinant RGD peptide as a transplant base material, and the effect of cultured periosteal cells on bone formation. Human cultured periosteal cell transplantation into nude rats was encapsulated in a substrate placed in a 3D printed- TCP tray. Histological observations showed rare bone formation. This is considered to be due to the lack of bone-inducing activity of the transplant material. Although the TCP tray showed no abnormal inflammatory cells or findings of tissue destruction, The 3D printed- TCP tray was not toxic, suggesting its usefulness in jawbone regeneration due to its advantages in buildability of individual bone form. This is considered to be due to the lack of bone-inducing activity of the transplant material. The 3D printed- TCP tray was not toxic, suggesting its usefulness in jawbone regeneration due to its morphogenic advantages.

研究分野：口腔外科

キーワード：3Dプリント 顎骨再建 細胞親和性移植材 培養骨膜細胞

1. 研究開始当初の背景

【顎骨領域の骨再生の困難性】

顎骨は神経堤細胞に由来し、軟骨原基形成を介さない骨芽細胞の基質形成の直接骨化を特徴とする。そのため長管骨や体幹部に比べて骨形成能が低い。さらに、歯槽骨部では口腔粘膜を介して口腔に隣接するため、感染を回避し、迅速な血管誘導と骨同化が移植材の要件となる。

【骨形成能を有する培養骨膜細胞による顎骨再生治療を臨床実用している】

私たちは培養骨膜細胞による顎骨再生を第2種再生医療(治療)として提供している。その骨形成能は顎骨再生を低侵襲かつ安全に提供することを可能にした。迅速な血管誘導と骨同化は感染に強く、移植材として優れた特徴を持つ。

【新たな顎骨再建トレイと骨再生細胞療法の組み合わせが必要】

顎骨の区域切除後などの広範囲顎骨再建では移植材を入れるチタンメッシュトレイを用いることができるが、金属トレイが生涯にわたり体内に残遺する。これを解消するために、同様に形態再現性に優れ、かつ吸収性の再建トレイの開発が良好な形態と機能回復において有利である。

【細胞療法のアドバンテージを生かし、いかにして複雑な顎骨再建を実現するか】

顎骨周囲に発生する腫瘍、嚢胞、外傷、先天異常によって生じた複雑な顎骨欠損の形態回復は整容のみならず機能回復においても重要である。本研究に用いるオーダーメイド3Dプリント吸収性再建トレイはTCPを材質とし、骨に置換されるとされている。CTデータをもとにしたTCP-3Dプリント技術は顎骨再建材として開発されたものであり、デジタルデータから設計したトレイの形状を正確に造形することができるので、移植材を顎骨の形態に成型して移植することが可能と考えられる。

一方で、トレイの材質のTCPが細胞移植に際して、投与した細胞や再生骨に与える影響は明らかでなく、再建材料としての生物学的ならびに支持材としての適合性を実験的に検証する必要がある。

2. 研究の目的

【明らかにすること】

3Dプリント- TCP吸収性再建トレイと培養骨膜細胞移植による

1. 骨再生の過程でみられるトレイ材と細胞移植材の組織学的現象の詳細：

細胞の生存状態、骨形成像、血管新生像、破骨細胞の誘導、トレイと新生骨の境界部組織、等

2. 顎骨再建の実現可能性の検証：トレイの形状(小孔や厚み)による強度、トレイの移植術式、等の所見から骨再生細胞療法とTCP吸収性再建トレイの組み合わせの安全性および骨再生への影響を検証する。

【骨再生細胞療法とTCP-3Dプリント技術の融合】

培養自家骨膜による顎骨再生は「骨形成能」を基本とする再生療法であり、治療として継続的に実施されている顎骨再生細胞療法としては私たちが唯一である。骨形成能は細胞療法によってのみ獲得できる効果であり、これによって広範囲かつ複雑な骨再生を期待することができる。

TCPの3Dプリント技術はオーダーメイド人工骨として用いられつつあるが、本研究計画ではこれを造形性の高い顎骨再建トレイとして用いる。骨再生細胞療法のアドバンテージと3Dプリント- TCP吸収性再建トレイの形態再現性の融合はこれまでに類のない試みである。いずれも臨床段階にある技術であることから、将来、広範囲かつ複雑な形態の顎骨再生を低侵襲で実現することが期待される。

3. 研究の方法

当初使用する細胞をウサギ骨膜細胞と予定したが、将来的な実験の結果の解釈を考慮して、確立したヒト培養骨膜細胞と免疫不全動物の組み合わせによる実験に変更した。

(1) 培養骨膜細胞の製造

骨膜採取：下顎智歯抜歯に際して、周囲の骨膜を5×5mmを採取し、4%FBS含有MSC-PCM(骨膜専用培地：(株)コージンバイオ)で4週間培養する。

(2) 移植材

3Dプリント- TCPトレイ：製造委託〔(株)ネクスト21〕で必要な形状を作製

ヒト培養骨膜細胞

ラット骨細片(長管骨、頭蓋骨、他)

細胞親和性リコンビナントRGDペプチド顆粒(セルネスト：富士フィルム)

ヒト多血小板血漿(PRP)

(3) 移植実験

【目的】 3D プリント- TCP 吸収性トレー(L 箱型)と培養骨膜細胞移植材の移植を実施し、骨組織形成における各移植材成分の作用を解析する。

【移植】

3D プリント- TCP 吸収性トレイ (移植実験 用: 内腔 3×短角 10×長角 20mm) に

A 群: 培養骨膜細胞 + 細胞親和性リコンビナント RGD ペプチド

B 群: 培養骨膜細胞 + 自家骨細片 + PRP

を入れ、ヌードラット背部皮下に移植した。

【経過および組織学的観察】

移植材を移植後 4 週間で摘出し、パラフィン切片の HE 染色による組織学的観察を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト培養骨膜細胞の製造

* ヒト培養骨膜細胞を用いた。そのため、動物実験倫理審査に加えて、臨床研究倫理審査を受け、承認を受けた。

【細胞採取部位】 下顎抜歯に際して、下顎骨臼歯部から骨膜を採取した。

【培養方法】 新潟大学における臨床で使用が開始された骨膜培養用培地 MSC-PCM (コージンバイオ社製) に 4%FBS もしくは 4%ヒト血清を添加して培養に用いた。従来の M199 + 10%FBS に比べて、細胞シートの増殖が速く 4 週間を培養期間とした。

- ・ 骨膜組織片からの遊走による培養の状況を観察した。結果としてこの方法によって培養細胞の製造が可能だった。
- ・ 培養細胞の特性を解析した: 培養骨膜細胞の骨細胞マーカーの定量 PCR 法による発現解析系を樹立した。対象分子は RANKL、ALP、COL1a1、Osteocalcin、RUNX2、Osteopontin の発現が確認され、骨芽細胞としての分化が示唆された。
- ・ フローサイトメトリーによる幹細胞マーカー発現解析を CD45、CD90.1、CD29、CD44H、を行い、陽性を確認した。

【細胞数の測定】

- ・ 製造した培養骨膜細胞シートの重層化部の長径を測定した。
- ・ 酵素分散は当初トリプシンを使用したが、分散が完全にできず、コラゲナーゼ/デスペパーゼ合剤を使用して、良好な結果を得た。
- ・ 細胞数を測定し、投与細胞数の管理法を確立した。細胞数 = 細胞シート長径 (mm) × 9.2 + 2 (× 10⁴ 個) 移植材 1cm³ に 4 × 10⁴ 個に設定した。

(2) 移植に用いるトレイの作製

【3D プリント TCP トレイの作成】 CAD/CAM により、長片 3cm 短辺 1cm 厚 3mm 内腔の TCP 製移植用トレイを作製した。壁厚は 1mm とし、0.5mm の小孔を多数設置した。箱状に上蓋を設定し、移植材を収納し、移植する、投与方法を計画した。

【従来法のチタンメッシュトレイの作製】 0.3mm 厚のチタンメッシュを用いてかまぼこ型長径 10 mm の籠状の移植用トレイを作製した。従来法との比較のため。

(3) 移植実験

【ラット移植モデルの確立】 背部皮下、筋膜上に移植スペースを形成し、移植トレイを設置する計画とした。雄 8~9 週齢を使用した。体重は 170~185g

<PRP・自家骨細片・培養骨膜細胞> 3D プリント TCP トレイおよびチタンメッシュトレイ

- ・ 臨床で使用している移植材と同じ組成である B 群各 3 匹: 培養骨膜細胞 + 自家骨細片 + PRP を移植した。
- ・ 移植材の調製: 液状 PRP4g に骨細片 0.4 と培養骨膜細胞 1 枚 (3~4 × 10⁴ 細胞) を加え 1g の移植材を調製した。PRP 糊化は塩化カルシウム 0.1Eq を滴下して誘発した。
- ・ 糊化した移植材をトレイに充填し、移植スペースに移植した。
- ・ ステイプラで縫合閉創した。この方法で感染は起きなかった。

<RGD ペプチド基材・培養骨膜細胞> 3D プリント TCP トレイ

- ・ 細胞親和性リコンビナント RGD ペプチド顆粒 (セルネスト: 富士フィルム) の供給が受けられた。
- ・ リコンビナント RGD ペプチドを移植基材とする A 群 3 匹: 培養骨膜細胞 + RGD ペプチドを移植
- ・ PBS で膨潤した RGD ペプチド 1g に培養骨膜細胞 1 枚 (3~4 × 10⁴ 細胞) を調合した。
- ・ 移植材をトレイに充填し、移植スペースに移植した。

- ・ ステイブラで縫合閉創した。この方法で感染は起きなかった。

(4) 組織学的観察

【骨形成期間】 移植後は4週間の経過観察期間を設けた。

- ・ 摂食、活動に大きな影響は出なかった。メッシュトレイのB群動物×1に被覆する皮膚の壊死を生じた。排膿、腫脹はなく同化不全による血行障害、被覆皮膚の壊死と考えられた。
- ・ 術後死する動物はなかった。

【組織学的観察】

- ・ 背部皮下に移植した移植材をいれたトレイを摘出し、半量を室温 10%中性ホルマリン 72 時間浸漬固定し、残り半量を 4 10%中性ホルマリン 24 時間浸漬固定した。続いて常温で 10%EDTA 脱灰液にて 72 時間脱灰した。前者はパラフィン包埋、後者は凍結包埋材で包埋した。
- ・ 切片作成パラフィン切片 6 μm を作成し、HE 染色を施した。一部の凍結標本については凍結切片 12 μm ~ 16 μm を作成し、再賦活化後 ALP 染色および TRAP 染色を施した。
- ・ 検鏡はオールインワン顕微鏡で行った。

< A 群 : PPR・自家骨細片・培養骨膜細胞移植材 > 3D プリント TCP トレイおよびチタンメッシュトレイ

- ・ HE 染色では移植材は全般に線維化が観察された。ところどころに新生骨が形成されているが、その領域は比較的まばらであった。細胞成分は線維芽細胞が主であり、エオジン好染性のライニングを有する新生骨は部分的に観察されるのみだった。
- ・ 3D プリント TCP トレイ周囲には薄い線維性の被膜が形成されていた。TRAP 染色で陽性細胞の付着は確認できず、吸収所見は観察されなかった。炎症細胞の浸潤は比較的まばらであり、異常な組織反応は指摘できなかった。骨芽細胞の ALP 活性は骨形成部位に認められるが、骨の周囲に限局していた。
- ・ チタンメッシュトレイの周囲には比較的厚い線維性被膜の形成があり、移植材部分の分離がむずかしかった。細胞は乏しく、炎症反応も軽微であり、異常な組織反応を指摘できなかった。
- ・ 細片骨が比較的大きな塊として残っていた。その周囲に主に骨形成が観察された。移植した培養骨膜細胞に類似の細胞の分布は、総じて観察されなかった。

< B 群 : RGD ペプチド基材・培養骨膜細胞 > 3D プリント TCP トレイ

- ・ HE 染色では移植材は全般に線維化が観察された。細胞成分が比較的豊富であるが、骨形成については A 群より弱く、ほとんど認められなかった。ほとんどの細胞成分は線維性組織であり、明らかな骨基質の形成や新生骨は観察されなかった。一方で血管構造は比較的多く観察されることを特徴とした。
- ・ 3D プリント TCP トレイ周囲には A 群と同様に薄い線維性の被膜が形成されていた。TRAP 染色細胞についても同様に付着は確認できず、吸収所見は観察されなかった。炎症細胞の浸潤についてもまばらであり、異常な組織反応は指摘できなかった。

(5) 結果に関する解釈および考察

ヒト培養骨膜細胞の製造について

- ・ 4%血清加 MSC-PCM による培養骨膜細胞の製造は短期間で比較的多くの細胞製造に適していることが示された。とくに、原材料骨膜は 1×1~2mm の細片として使用するとほぼ 100% のシート形成をもたらす安定性を示した。ただし、骨芽細胞前駆細胞としての能力については、明確な答えはなく、引き続きデータを集積するひつようがある。
- ・ 培養骨膜細胞は平均値 3.5cm 前後の重層化シートを形成した。長径とともにコラゲナーゼ/デスパーゼ合剤による分散化で細胞数を測定し、[細胞数 = 細胞シート長径 (mm) × 9.2 + 2 (× 10⁴ 個)] の回帰式を設定した。ドナー間においても細胞シート大きさの分布に変動が少なく、安定した製造が可能であった。移植材 1cm³ に 4×10⁴ 個に設定した。

移植用トレイの作製について

- ・ CAD と 3D プリンターを用いて TCP 製のトレイを作製する手法は容易に正確な形態の造形を可能にするので、複雑な顎骨の形態を形作るうえで実用的な可能性を有している。短時間で設計と作成が可能であった。
- ・ 一方の従来のチタンメッシュトレイの作製は手作業によるものであり、顎骨形態を形作るうえで十分な可能性を有していると考えられる。

移植実験

- ・ A 群：PPR・自家骨細片・培養骨膜細胞移植材の移植法は細片骨と細胞をフィブリンに封入することによって、移植材の一塊性を持たす。さらに PRP 由来の血清は血小板成分が 2 倍程度に濃縮されているので、移植部位における血管新生や肉芽形成の促進によって、創治癒促進に有利に作用する移植基材であると考えている。一方で PRP 調製には一定の採血が必要になることが、患者への侵襲を減らすという再生医療そのものの利点を損なっていると考えなければならない。移植材に封入される骨細片はその周囲にある培養骨膜細胞に PRP と同様骨質内の成長因子、基質タンパクが骨芽細胞や破骨細胞の前駆細胞の分化を誘導することを期待している。
- ・ A 群では 3D プリント TCP トレイとチタンメッシュトレイを使用した。これらの移植材料の周囲には骨芽細胞および破骨細胞の分化所見は確認できなかった。その周囲は線維性組織が形成されており、異常な炎症反応や組織破壊は観察されていない。

組織学的観察の所見について

- ・ A 群、B 群ともに骨形成は不十分な結果であった。これは培養骨膜細胞と移植材組成による骨形成の不足の可能性が解釈として挙げられる。一方で移植した組織の細胞が乏しい所見はヌードラット背部への移植においてヒト培養骨膜細胞が死滅する経過をたどり、増殖に至らなかった可能性も示唆される。免疫不全動物を使用したとはいえ異種細胞と血液成分に対する反応が皆無でない可能性がある。
- ・ A 群において観察された散発的な骨形成は培養骨膜細胞に由来するか、もしくは移植したラット由来骨細片によるものである可能性がある。今後検討を有する点である。
- ・ B 群の移植材に含まれる RGD ペプチド基材の作用は未知である。血管新生と細胞の構成が比較的多い所見は本移植基材の作用である可能性があり、今後の実験計画において組織細胞絵の影響、組織誘導の作用を検討する余地がある。

(6) 考察まとめ

3D プリント TCP トレイ (3DPT トレイ) について

3DPT トレイは賦形性の自由度から顎骨の再建に用い得ると考える。一方で本研究では示すことが出来なかったが、長期間経過した場合の吸収性や組織反応、毒性の詳細については不明である。また外力がかかる顎骨のフレームを作るという目的においては、強度的な問題があり、それを含む検討が必要と考えられる。今回は骨形成が十分でなかったために、骨形成への直接の影響や作用を提示できなかったが、少なくとも骨形成能は有しておらず、あくまで移植材を入れる賦形材としての役割を期待するものである。

RGD ペプチド基材について

今回の実験内容の範囲では断定できないが、少なくとも RGD ペプチド基材のみでは培養骨膜細胞を骨芽細胞への分化に維持誘導する骨形成作用は十分でないことを示した。一方で骨周辺に移植した場合の活発な骨誘導活性が示されているので、今後の研究計画においては自家骨との併用や骨誘導能を有する成長因子等との併用が重要な検討対象となると考えた。異なる投与経路、投与部位を比較することにより、投与細胞が果たす役割を解明する。

培養骨膜細胞の作用について

移植した培養骨膜細胞の多くが観察の時点で生存増殖をしていなかった可能性が高い。どの時点まで移植した細胞が生存しているかについての具体的データがないので、観察された所見の原因と経緯を正確に示すことができない。今後は異なる投与経路、投与部位を比較することにより、投与細胞が果たす役割を解明する必要がある。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 84.Kawase T, Nagata M, Okuda K, Ushiki T, Fujimoto Y, Watanabe M, Ito A, Nakata K.	4. 巻 20(5)
2. 論文標題 Platelet-Rich Fibrin Extract: A Promising Fetal Bovine Serum Alternative in Explant Cultures of Human Periosteal Sheets for Regenerative Therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 pii: E1053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20051053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永田昌毅
2. 発表標題 培養自家骨膜細胞の歯科再生医療への実装の取り 組み
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永田昌毅
2. 発表標題 培養自家骨膜細胞による顎骨再生 - 歯科再生医療実用化の取り組み -
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021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
研究分担者	川瀬 知之 (KAWASE TOMOYUKI) (90191999)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

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