

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791507

研究課題名（和文）

組織工学的手法を応用した急速骨延長法における細胞動態の検討

研究課題名（英文）

Histologic study on the cellular events during distraction osteogenesis using the tissue-engineered osteogenic materials.

研究代表者

木下 一彦 (KINOSHITA KAZUHIKO)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40467296

研究成果の概要（和文）：

ウサギの顎骨に急速な骨延長法をおこなった。延長終了時に培養骨髄間質細胞や骨形成性の成長因子であるBMP-2を応用して骨形成性の促進をえた。また経時的に骨・周囲組織を評価し、3.0 mm/dayでの急速な延長法をおこなっても、組織工学的な材料を応用することにより、延長された骨組織に良好な治癒が期待できることが示唆された。また、周囲歯肉組織は骨形成性に影響をあたえる因子を応用しても、その回復に大きく影響しないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The rabbits received an injection of cultured bone marrow stromal cells(BMSCs) or BMP-2 into the distracted tissue at the end of distraction. Each distracted mandible and gingival tissue were evaluated at 2, 4, and 6 weeks after the end of distraction.

This study showed that an injection of tissue-engineered osteogenic material at the end of distraction promoted new bone formation following a higher rate of distraction (3.0 mm / day). However, these materials might not affect distracted gingival tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：顎骨延長法 骨髄間質細胞 組織工学

## 1. 研究開始当初の背景

顎骨延長法は、腫瘍などの術後の顎骨再建、先天性疾患、顔面外傷、インプラント前の骨

造成などに対して、骨移植をすることなく予知性の高い骨造成が可能であり、周囲軟組織

の伸展も期待できるため、近年、普及してきた臨床術式である。しかしながら、治癒期間が長いという問題点が指摘され、敬遠する患者、施設も多い。治癒期間の長さは、この方法が仮骨形成を律速段階とするためであり、その間、義歯の使用などの制限により、治療期間中の Quality Of Life(QOL)が著しく低下する。従って、顎骨延長法の治癒期間の短縮が求められる。顎骨延長法は待機期間、延長期間、固定期間の3期間に分けられるが固定期間の短縮について、各種の培養細胞や成長因子の応用、超音波などの物理的刺激を加えることにより、一定の固定期間の短縮が可能であるとする報告が散見される。しかしながら、延長期間の短縮を目的とした延長速度の速い顎骨延長法においてそれらが応用された報告は少ない。代表者は組織工学的手法(培養骨)を応用した骨再生の研究を行っており、その応用で、ある程度、急速な顎骨延長法(2.0 mm/day)で骨形成の促進が可能であることを報告した。この方法では仮骨を律速とした従来法ではなく、周囲軟組織を律速とした方法であるとおもわれるが、その周囲組織の影響、細胞動態の評価をなされた報告はなく、その評価、検討を行うことにより、安全な急速骨延長法を行いうることが可能になり、治癒期間の短縮を得られれば、臨床家・患者の双方から望まれると考えられ、その適応も拡がると考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) 軟組織を律速段階とした急速な顎骨延長条件についての報告は少なく、経時的に周囲軟組織を評価した報告はほとんどない。本研究において、さまざまな延長条件で経時的に周囲軟組織を評価し、延長による軟組織への影響と回復の様相の調査を目的とした。

(2) 急速な延長をおこなった延長組織に培

養細胞や成長因子などの組織工学的材料を応用し、骨形成性と応用した組織工学的材料の周囲軟組織への影響と細胞動態の検討を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 急速顎骨延長法の最適延長条件を検討した。

—ウサギ顎骨に延長装置を設置し、12mm を延長量として待機期間(0、3、5日)、延長条件(2.0 mm/day、3.0 mm/day、4.0 mm/day、6.0 mm/day)で検討を行った。固定期間は延長終了後8週を最長とした。

延長後の骨形成性と周囲軟組織である歯肉上皮に着目し、その影響をH-E染色、Elastic van Gieson染色、PCNA染色、TUNEL染色を行い、組織学的、組織形態学的に調査した。

(2) 至適な組織工学的移植材料(細胞、担体、成長因子)の条件の検索を行った。

—チタン製シリンダーを用いたウサギ頭頂骨造成モデルを作成し、そのモデルの妥当性を検討したうえで、培養骨形成性細胞、BMP-2などをペプチドハイドロゲルやPRPなどの担体と混和して移植し、術後4、8週で非脱灰標本を作製し、その骨形成性について比較検討を行った。

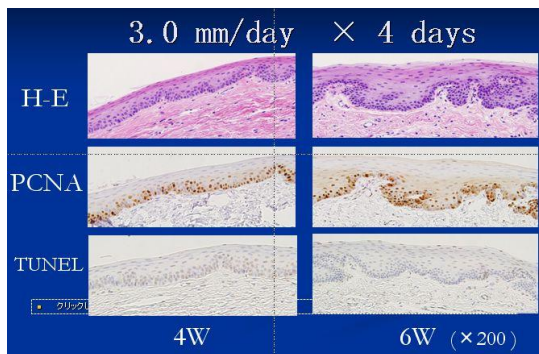
(3) 急速延長法をおこなった延長組織に組織工学的移植材料を応用し、骨形成性と周囲軟組織における影響と細胞動態を調査した。

—(2)で検討し良好な結果を得られた培養骨髄間質細胞( $1 \times 10^7$ )とBMP-2(50  $\mu$ g/ml)を延長終了時に延長組織内に注入(0.3 ml)した。(1)の結果を対照として延長後の骨形成性と周囲軟組織である歯肉上皮に着目し、延長終了後2、4、6週で(1)と同様の染色をおこない、その影響を組織学的、組織形態学的に調査した。

## 4. 研究成果

(1) 急速顎骨延長法の延長条件の最適条件を検討

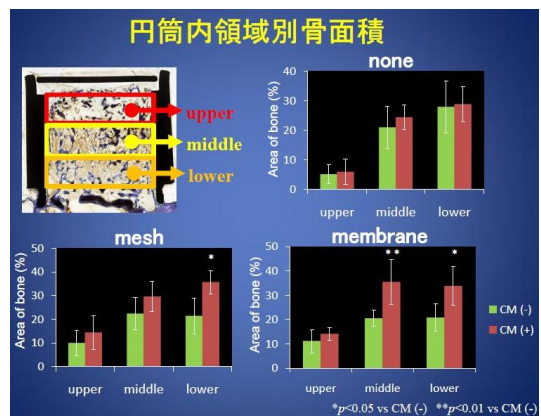
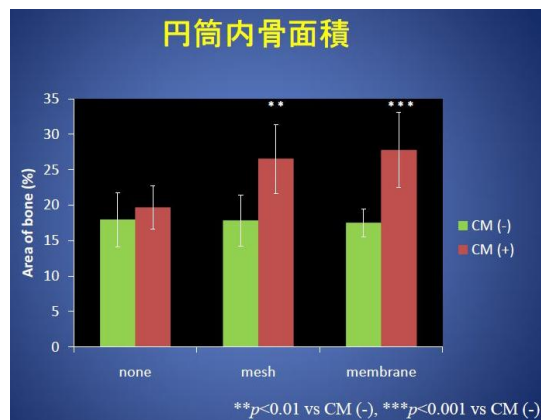
—従来法である緩徐な延長 (1.0 mm/day) では周囲軟組織である歯肉上皮は延長終了後に菲薄化し、延長終了後 4 週から上皮釘脚が伸長し、歯肉上皮の肥厚化がみられた。上皮下組織では Elastica van Gieson 染色で黒紫色を呈する弾性繊維をかすかにみとめた。一方、急速顎骨延長法の最適条件は歯肉組織の損傷、治癒の遅延程度などから、待機期間 5 日、3.0mm/day の延長条件とおもわれた。延長終了時には角化層の剥離など損傷をみとめる個体もあるものの、歯肉上皮全体の損傷はみとめられず、歯肉上皮は緩徐延長群と比較し、有意に菲薄化するが経時的に肥厚し、延長終了後 6 週より、上皮釘脚の伸長をみとめた (下図)。



また 3.0 mm/day 以上の急速延長群では上皮下組織において弾性繊維を多くみとめた。PCNA 染色、TUNEL 染色では、延長終了時では 1 日延長量の増大により、その陽性細胞数はともに増加する傾向であった。また、この条件では延長終了時に従来法である緩徐延長 (待機期間 5 日、延長条件 1.0 mm/day) と比較し、PCNA 染色陽性細胞数・TUNEL 染色陽性細胞数は有意に多かった。急速な顎骨延長法において周囲軟組織の回復は緩徐な延長と比較し遅く、弾性繊維の発現から歯肉組織の回復は、組織学的にも相違が生じることが示唆された。

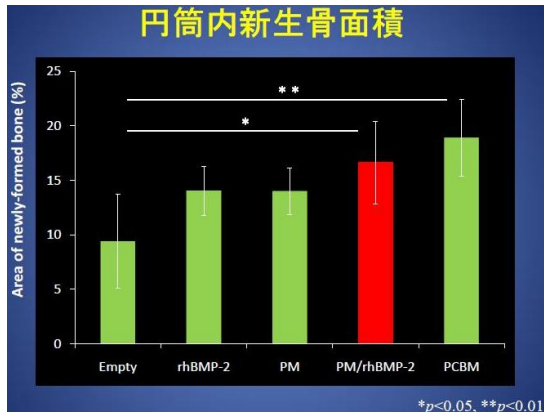
(2) 至適な組織工学的移植材料 (細胞、担体、成長因子) の条件の検索

—本研究課題で用いたチタン製シリンダーを用いたウサギ頭頂骨造成モデルはすでに報告のあるモデルであるが、至適な組織工学的移植材料の検討のためにモデルの遮蔽材料の違いによる骨形成性の検討を行い、骨形成の様相を評価することでモデルの妥当性を検証した。移植材料として PCBM (particulate cancellous bone and marrow) を用い、チタンメッシュ・e-PTFE 膜と比較した (下図)。



本研究で用いた遮蔽材はその遮蔽度の相違によって新生骨量には有意な差異をみとめないものの、造成域の骨の分布に相違をみとめ、遮蔽度の高いほど遮蔽材直下の領域 (母骨から遠位) に骨量が多いことが示唆された。つぎに、担体の検討としてペプチド水ゲルに着目し、骨形成性をみとめる周知の成長因子である BMP-2 と混和し骨形成性の評価

を行った（下図）。

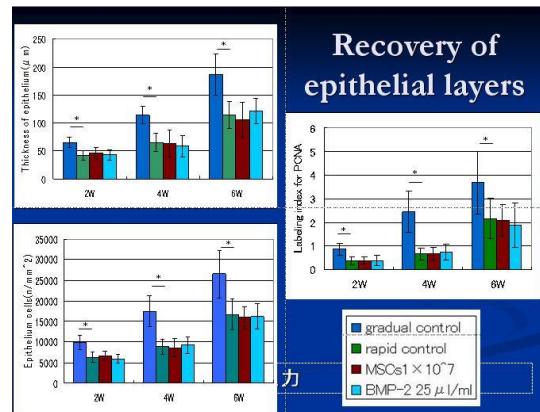


ペプチド水素ゲルと混和することにより、BMP-2 は 25  $\mu$ g/ml で本モデルにおいて有意な骨形成性を示した。BMP-2 濃度を上昇 (50  $\mu$ g/ml、75  $\mu$ g/ml) させても 25  $\mu$ g/ml 群と比較し、有意な差異はみとめなかった。ペプチド水素ゲルの徐放性により、成長因子が少量でも有効な骨形成性が得られることが示唆された。

同様に、培養骨髄間質細胞 ( $1 \times 10^7$ ) をペプチド水素ゲルと混和し、移植実験を行った。ペプチド水素ゲルのみを移植した対照群と比較し、有意な骨形成性を示したが、移植した培養骨髄間質細胞数 ( $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ ) に依存する傾向を示さなかった。骨造生における必要細胞数についてさらなる検討が必要であることが示唆された。

(3) 急速延長した組織に組織工学的移植材料を応用した骨形成性と細胞動態の調査  
 - 急速延長の条件は (1) で検討した待機期間 5 日 延長条件 ; 3.0 mm/day  $\times$  4 days とした。延長終了時に培養骨髄間質細胞 ( $1 \times 10^7$ ) と BMP-2 (50  $\mu$ g/ml) を延長組織内に注入 (0.3 ml) し、(1) の結果を対照として延長後の骨形成性と周囲軟組織である歯肉組織を延長終了後 2、4、6 週で評価した。  
 この延長条件において、対照群では延長終了後 6 週においても骨の連続性は得られず、延長組織中心部は狭窄する傾向であった。しか

しながら BMP-2 群、培養骨髄間質細胞群は延長終了後 2 週で骨の連続性が得られはじめ、その後も対照群と比較し有意な骨形成性を示した。培養骨髄間質細胞-BMP-2 群間では培養骨髄細胞移植群の方が骨形成性の高い傾向を示したものの統計学的に有意ではなかった。周囲軟組織において、上皮の厚さ・上皮内細胞・上皮釘脚・弾性繊維・PCNA 陽性細胞、TUNEL 陽性細胞において検討を行ったが、急速に延長した群はいずれも緩徐延長群と比較すると有意に低値と示した（下図）。



培養骨髄間質細胞群と BMP-2 群は骨形成性においては有意であったが、歯肉上皮をはじめとした周囲軟組織には対照群と比較し前記のパラメータでは有意でなかった。培養間質細胞に PKH-26 でラベリングを行った（延長終了後 2、4 週）が、報告されているような応用因子の周囲組織への拡散はみとめるものの、その影響は少ないように思われた。培養細胞や成長因子を応用し、早期に骨形成性を得ても歯肉上皮組織の経時的变化には大きく影響を与えないことが示唆された。

### 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 1 件)

(1) Effects of cortical bone perforation

on periosteal distraction: an experimental study in the rabbit mandible. Tomoo Oda, Kazuhiko Kinoshita. et al. J Oral Maxillofac Surg. 2009 Jul;67(7):1478-85. 査読有

〔学会発表〕(計 7件)

(1) ウサギ頭頂部造成モデルにおける自己組織化ペプチド水素ゲルの効果 池野 正幸、木下 一彦 他 第55回 日本口腔外科学会総会・学術大会 2010.10.17 幕張

(2) ウサギ頭頂部骨移植モデルを用いた骨造成における遮蔽材の検討 池野 正幸、木下 一彦 他 第9回日本再生医療学会総会 2010.3.19 広島

(3) 骨延長部の骨形成過程におけるSDF-1/CXCR4 システムの役割 藤尾 正人、木下 一彦 他 第9回日本再生医療学会総会 2010.3.19 広島

(4) The effect of shields on the bone augmentation model in the rabbit calvariae. Masayuki Ikeno, Kazuhiko Kinoshita, et al. 13<sup>th</sup> Biennial Internal Congress incorporating the Paris Distraction Symposium 2009.9.26 Oxford, U.K.

(5) Transplantation of the tissue-engineered osteogenic material to the distracted callus in the rabbit maxilla. Kazuhiko Kinoshita, et al. 13<sup>th</sup> Biennial Internal Congress incorporating the Paris Distraction Symposium 2009.9.26 Oxford, U.K.

(6) Internal transport distraction for mandibular reconstruction. Hideharu Hibi, Kazuhiko Kinoshita, et al. 13<sup>th</sup> Biennial Internal Congress incorporating the Paris Distraction Symposium 2009.9.26 Oxford, U.K.

(7) ウサギ頭頂部骨移植モデルを用いた骨造成における遮蔽材の検討 池野 正幸、木下 一彦 他 第63回 日本口腔科学会学術集会 2009.4.17 浜松

〔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  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 一彦 (KINOSHITA KAZUHIKO)  
名古屋大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：40467296

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし