

平成22年5月18日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890076

研究課題名（和文）骨再生バイオマテリアルに応じた骨カップリング現象の細胞学的解明

研究課題名（英文）Histological examination on cellular coupling with using the bone regenerating biomaterials

研究代表者

小島 拓 (KOJIMA TAKU)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：90515777

研究成果の概要（和文）：

骨再生バイオマテリアルのうち β -TCPは吸収置換型骨補填材といわれているが、その吸収・骨形成過程について詳細に報告したものは少ない。そこでラット頭蓋骨に規格化した骨窩洞を形成し β -TCP顆粒を充填して、同部位を組織的に解析した。術後初期では窩洞底付近の β -TCP顆粒表層にTRAP陽性破骨細胞が局在し、隣接するALP陽性骨芽細胞直下に線維性骨を認めた。経時的に β -TCP顆粒は吸収され、緻密な新生骨に置換された。以上より、 β -TCPは破骨細胞による吸収が先行し、その後に骨芽細胞の定着、骨形成が誘導されるカップリングのプロセスを経て緻密な新生骨が形成されると推測された。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed to elucidate the biological effects of highly purified β -tricalcium phosphate (β -TCP) applied in rat calvaria defect. Specimens were harvested, and were analyzed immunohistochemistry. At the early stage, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-reactive osteoclasts accumulated on the surface of the β -TCP particles facing the bottom of the cavity. Alkaline phosphatase (ALP)-positive osteoblasts neighboring the osteoclasts deposited bone matrices onto this material, implying a coupling between osteoclasts and osteoblasts. At the late stage, small remnants of β -TCP particles were present in the new bone with a profile of compact bone. Thus, β -TCP is resorbed by osteoclasts, and succeeded by osteoblastic bone apposition with a coupling of osteoclasts and osteoblasts at the later stage. In conclusion, the use of β -TCP provides adequate bone regeneration with the profile of compact bone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

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：骨再生、バイオマテリアル、骨カップリング、破骨細胞、骨芽細胞、骨質

1. 研究開始当初の背景

1960年代にFrostは骨吸収と骨形成が共役しておこることを発見し、骨リモデリングにおける「カップリング現象」を提唱した(Frost, Henry Ford Hosp Med Bull. 1962; Hattner et al., Nature, 1965)。それを細胞レベルで見ると、骨吸収を行う破骨細胞とその後に骨形成を行う骨芽細胞との間で生じる細胞間相互作用と考えることができる。1980年代にBaylinkはin vitroの系で亢進した骨吸収に伴って骨形成が亢進することから、カップリングファクター(骨形成共役因子)の概念を提唱した(Howard et al, Proc Natl Acad Sci USA. 1981)。この概念は、生理的状态あるいは骨代謝回転の上昇時の多くの場合、当てはめて考えることができる。一方、骨再生を期待して自家骨や人工ハイドロキシアパタイトなどが用いられているが、これらバイオマテリアルによって破骨細胞と骨芽細胞のカップリングの仕方が異なることを申請者は観察してきた(Kojima et al., BioMed Res, 2007; Kojima et al., JBMM, 2007)。そこで、本研究では「骨再生バイオマテリアルに応じた骨カップリング現象の細胞学的解明」を行いたいと考えている。

2. 研究の目的

本研究は、バイオマテリアルを用いて骨再生を図った場合に、どのような破骨細胞と骨芽細胞のカップリングが成立するか細胞学的に解析することが目的である。これまでの研究は、生理学的な観点からカップリング現象における破骨細胞や骨芽細胞の活性・動向を検索することが多かったが、本研究では、骨再生に用いる骨バイオマテリアルがカップリングにどのような影響を及ぼすかという視点でアプローチする。また、用いた骨バイオマテリアルの性質によってカップリングの有無が生じ、その結果、骨再生が骨リモデリングによるものか、あるいは骨モデリングによるものが異なる。このような異なるプロセスで生じた再生骨がどのような性質を有するかについても大きな情報を得ることができ、近年、注目を浴びている「骨質」についても評価することが可能である。

骨再生バイオマテリアルにはハイドロキシアパタイト(HA)、 α -TCP、 β -TCPなどが存在するが、これまでの研究において、合成型ハイドロキシアパタイト(Kojima et al; J Bone Miner Metab 2007)、自己硬化型 α -TCP(Hao et al; Biomaterials 2004)、熱処理ウシ骨

(Tapety et al; Clin Oral Implants Res 2004)について検索を行ってきた。そこで本研究では、これまでの実験系と同様の骨欠損を作製し、同部位に β -TCP顆粒(オリンパスバイオマテリアル社・オスフェリオン)を補填した場合に、どのような破骨細胞と骨芽細胞のカップリングが成立するか細胞学的に解析する。さらには、誘導される再生骨の「骨質」についても評価を行う。

3. 研究の方法

(1) 動物：生後12週齢雄性ウイスター系ラット

(2) 骨再生バイオマテリアル： β -TCP顆粒(オスフェリオン：オリンパスバイオマテリアル社)；気孔率75%、顆粒径300-500 μ m

(3) 実験術式：ラット頭蓋骨に、歯科用切削バーで人工的な骨欠損(直径5mm)を形成し、その骨欠損部に β -TCP顆粒を充填した。顆粒の流出を防止し骨欠損部に維持するために、同部を熱可塑性吸収性プレートで被覆した。



① 骨欠損形成 ② β -TCP顆粒充填 ③ プレート被覆



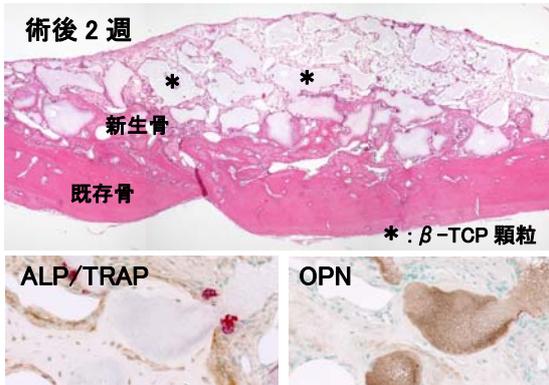
〈頭蓋骨前頭断像〉

(4) 解析項目：術後2, 4, 24週目に灌流固定を行い、骨新生について組織化学的、微細構造学的に以下の検討を行った。

- ① 組織化学：酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP:破骨細胞の同定)、アルカリ性ホスファターゼ(ALP:骨芽細胞系細胞の同定)、オステオポンチン、オステオカルシン(骨基質蛋白)など
- ② 透過型電子顕微鏡解析
- ③ electron probe micro-analyzer (EPMA)を用いた元素マッピング(Ca, P解析)

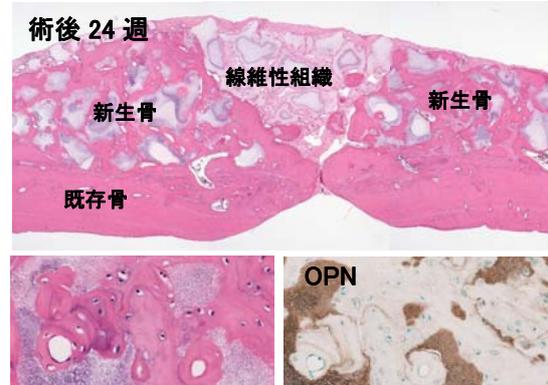
4. 研究成果

(1) 新生骨形成の組織化学的観察



術後2週の組織像

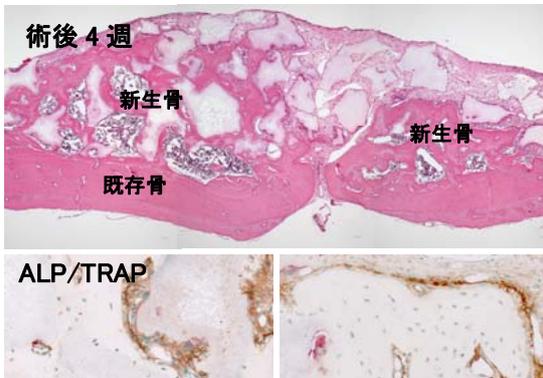
上段：ラット頭蓋骨中央に形成した骨欠損部に β -TCP 顆粒(*)を充填し熱可塑性吸収性プレートで被覆した状態の前頭断像。窩洞の半分の高さにまで骨新生を認める。下段： β -TCP顆粒はOPN陽性で、その表層にはTRAP陽性破骨細胞を認める。隣接してALP陽性骨芽細胞が多数配列し、直下に線維性骨を認める。



術後24週の組織像

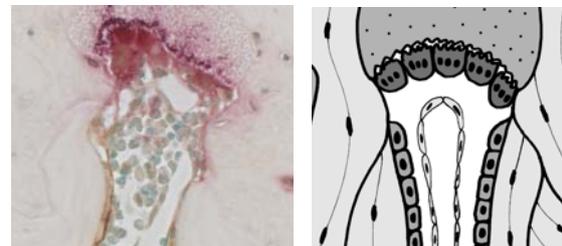
上段：頭蓋骨中央部を除く窩洞内全域に骨新生を認め、術後4週と比較して骨髓腔領域が少ないのがわかる。窩洞中央部の β -TCP顆粒は密性結合組織で囲まれている。下段：OPN陽性反応を示す β -TCP顆粒は辺縁不整で小型になっており、その周囲にはセメントラインを多数認める。

(2) β -TCP に対する細胞学的動態

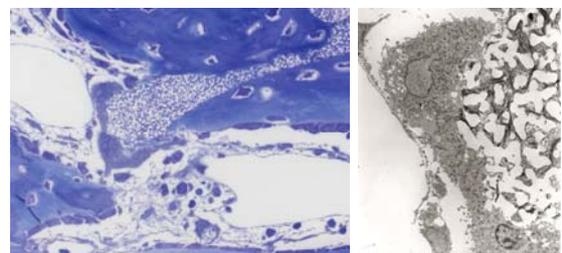


術後4週の組織像

上段：窩洞中央部を除き、新生骨がプレート界面付近にまで形成されているが、内部には大きな骨髓腔を認める。下段：新生骨内に埋め込まれた β -TCP顆粒上にTRAP陽性破骨細胞を認め、隣接してALP陽性骨芽細胞を認める。新生骨表層にはALP陽性骨芽細胞が配列している。



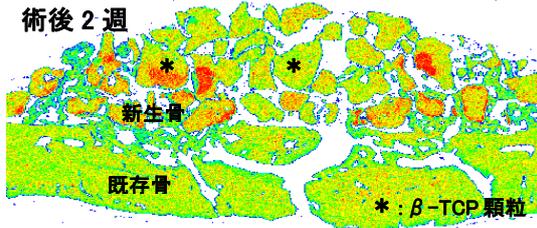
β -TCP は破骨細胞による吸収を受けた後に骨芽細胞の骨形成を誘導する。新生骨内に埋め込まれたあとも、リモデリングを受けて徐々に吸収され新生骨に置換されていく。



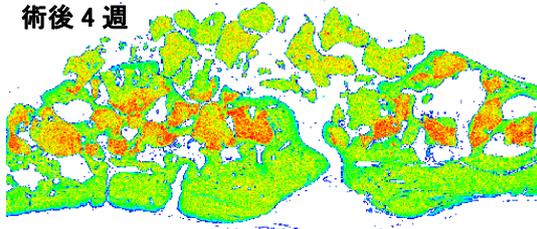
β -TCP 顆粒表層に破骨細胞が直接接着しているのがわかる。また、隣接して骨芽細胞が存在し、直下に新生骨を形成している。

(3) 新生骨の元素マッピング

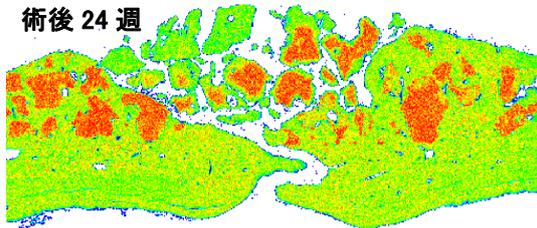
術後 2 週



術後 4 週



術後 24 週



新生骨における Ca, P 濃度は経時的に上昇し、24 週目には既存骨と同等の値を示す。また、その分布は均一である。

(4) まとめ

- ① β -TCP 顆粒は OPN 陽性反応を示し、これらの顆粒表面には TRAP 陽性破骨細胞を認めた。
- ② TRAP 陽性破骨細胞に隣接して ALP 陽性骨芽細胞が局在し、これら骨芽細胞直下に新生骨（線維性骨）を認めた。
- ③ 新生骨内部に埋め込まれた β -TCP 顆粒は新生骨とともに骨改造（骨リモデリング）を受け、徐々に吸収されて小型かつ不整な辺縁を示した。
- ④ 経時的に新生骨は上方に形成するとともに骨梁幅を増加させた。また骨髓腔領域の減少とともに新生骨の緻密化が認められた。
- ⑤ 新生骨における Ca, P 濃度は経時的に上昇し、24 週目には既存骨と同等の値を示した。
- ⑥ 窩洞中央部の β -TCP 顆粒は線維性結合組織で被覆され、同部には骨新生がほとんどみられなかった。

(5) 結語

β -TCP 補填材は破骨細胞による吸収が先行し、その後に骨芽細胞の定着・骨形成が誘導されるカップリングのプロセスを経て新

生骨を形成することが示された。また、その後の骨リモデリングにより徐々に新生骨に置換されることで緻密な骨基質を形成し、最終的には既存骨と同等の骨を再生することが可能であると示唆された。

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 3 件）

① Narimatsu K, Li M, Freitas PHL, Sultana S, Ubaidus S, Kojima T, Liu Z, Guo Y, Suzuki R, Yamamoto T, Oda K, Amizuka N: Ultrastructural observation on cells meeting the histological criteria for preosteoblasts - a study in the mouse tibial metaphysis. *J. Electron Micro.* 2010 in press. 査読有

② Li M, Seki Y, Freitas PHL, Nagata M, Kojima T, Sultana S, Ubaidus S, Maeda T, Shimomura J, Henderson JE, Tamura M, Oda K, Takagi R, Amizuka N: FGFR3 down-regulates PTH/PTHrP receptor gene expression by mediating JAK/STAT signaling in chondrocytic cell line. *J. Electron Micro.* 2010 in press. 査読有

③ Sobhan Ubaidus, 李 敏啓, Sara Sultana, 鈴木礼子, 柳 鎊晟, Paulo Freitas, 小島拓, 下村一黒木淳子, 織田公光, 網塚憲生, 小澤英浩: 骨細胞・骨細管系における FGF23 と DMP-1 の免疫局在. THE BONE, 23 巻, 361-366, 2009. 査読有

〔学会発表〕（計 4 件）

① 小島拓: 吸収性プレートによる顎骨の再生. 第 26 回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い、歯科医師会館（東京）、2010 年 1 月 9 日

② Kojima T, Amizuka N, Suzuki A, Yoshizawa M, Saito C: Bone augmentation with β -tricalcium phosphate and a thermoplastic bioresorbable plate: a histological study in rat. 3rd Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, International Conference Center Hiroshima (Hiroshima), 2009. 11. 7-8.

③ 小島拓, 網塚憲生, 鈴木晶子, 芳澤享子, 齊藤 力: 熱可塑性吸収プレートと β -TCP 補填材併用による骨増生法の開発-ラット頭蓋骨を用いた実験モデルにおける組織化学的検討-. 第 7 回日本再生歯科医学会学術大会、

九州歯科大学（小倉）、2009年9月11-12日
④ 小島 拓、網塚憲生、芳澤享子、齊藤
力： β -TCP補填材を用いた骨再生におけるカ
ップリング現象の組織化学的解明．第63回
日本口腔科学会学術集会、アクトシティ浜松
（浜松）、2009年4月16-17日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 拓 (KOJIMA TAKU)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：90515777