

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10240

研究課題名(和文) オーダーメイド唇顎口蓋裂治療に向けた織り構造足場材料の開発

研究課題名(英文) Development of woven structural scaffold materials for tailor-made cleft lip and palate treatment.

研究代表者

松本 尚之 (MATSUMOTO, Naoyuki)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70199884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、Er:YAG パルスレーザー堆積法(PLD 法)によりハイドロキシアパタイト(HAp)を被覆したポリカプロラクトン多孔質足場(HAp-PCL)を作製し、in vivoおよびin vitroでの物性、生体適合性、骨形成能を評価した。Er:YAG-PLD 法によりPCL多孔質足場上にHApがコーティングされていることが確認された。in vivoの実験から、HApコーティングは骨形成を促進し、HAp-PCLグループの新生骨の量は、どの時点でもPCLグループより有意に高いことが判明した。これは、HApの優れた骨再生能に加え、足場表面の水濡れ性が向上したためと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎裂を伴う唇顎口蓋裂は、顎裂部への二次的新鮮自家腸骨海綿骨移植が行われてきた。一方で、臨床の現場で自家骨は早期に吸収してしまい長期効果がみられないとの報告もある。また、唇顎口蓋裂のような複雑な裂形態では高い靱性と骨伝導性を有する足場材料が望ましい。ポリ乳酸等の吸収性高分子を紡糸し、CTデータを元にして織ることで任意の3次元形状へと整形する特殊技術を保持している。さらに、歯科用レーザーを用いて手術サイトで骨伝導性を持たせることを考案した。CTデータを元にしたオーダーメイドの吸収性足場材料の骨造成のメカニズム解明と骨造成能の定量的評価が可能であれば大きな顎裂を伴う唇顎口蓋裂の治療につながる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to prepare polycaprolactone porous scaffolds (HAp-PCL) coated with hydroxyapatite (HAp) by Er:YAG pulsed laser deposition (PLD) and to evaluate their physical properties, biocompatibility and osteogenic potential in vivo and in vitro. The Er:YAG-PLD method confirmed the coating of HAp on the PCL porous scaffolds. In vivo experiments showed that HAp coating promoted bone formation and that the amount of new bone in the HAp-PCL group was significantly higher than in the PCL group at all time points. This may be due to the superior bone regenerative capacity of HAp as well as the improved water wettability of the scaffold surface.

研究分野：再生歯学

キーワード：アパタイト

1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂とは、唇や顎骨などの形成が不十分なため、亀裂が生じて生まれてくる先天異常である。日本における発生頻度は約 500 人に 1 人で、最も発生頻度の高い先天奇形であり、その半数は顎裂を伴っている。顎裂は歯牙の生える場所である歯槽部の骨欠損であり、顎裂の乱れのみではなく、口唇や口蓋の変形を来すため、歯槽骨の再建手術(顎裂治療)が必要である。1972 年 Boyne (JADA 1973, 1074-1080)らにより顎裂部への二次的新鮮自家腸骨海綿骨移植が報告された。この方法は、上顎の顎発育を阻害せずに良好な歯槽形態を作り、歯の萌出も期待される方法として認められている。さらに、新鮮自家骨が他の材料と比較して、組織内安定性や造骨能にすぐれていることや、自家骨髄には異所性の骨誘導形成能が存在していることが報告されている (Block, M. S. J Oral Maxillofac Surg 1985, 3-7)。一方で、臨床の現場で自家骨は早期に吸収してしまい長期効果がみられないとの報告もある。その原因は、自家骨が吸収する途中、大量の破骨細胞が移植部位に集中するからと考えられる。

顔貌に応じた形状再建を可能とするオーダーメイド再生治療としては、東京大学が 3D プリンターを用いた人工骨を報告している (Chung et al., Int J Automation Technology, 2009)。しかしながら、人工骨は韌性に乏しく、骨置換に数年の年月を要し、大型人工骨では破折が危惧される。一方、吸収性生体高分子は高い韌性をもつものの、低い骨伝導能ゆえに自家骨や骨髄間葉系幹細胞と複合化し研究が進められてきた (Kinoshita et al., Tissue Eng, 2007)。しかし、幹細胞から誘導した骨芽細胞を用いることは骨造成には有利ではあるが、コスト面でのハードルが高い。

骨伝導性を付与する代表的な方法として骨の無機成分であり、生体親和性が高くタンパク質の吸着特性を有するハイドロキシアパタイト (HAp) を材料表面にコーティングする方法がある。チタンなど無機材料表面には、プラズマやスパッタリング法でコーティングされた歯科用インプラントが実用化されている。しかし、吸収性生体高分子材料のような有機材料は低温度でコーティングする必要があり、浸漬法でコーティングする必要がある (Tanaka et al., J. Membr. Sci., 2004, 65-73)。しかし、浸漬法では厚みのあるメッシュ型足場材料の内部までコーティングするのは困難である。これらを学術的背景に唇顎口蓋裂が原因の複雑な裂形態に合わせたオーダーメイドの骨伝導性を有する吸収性足場材料の製作を試みる。

2. 研究の目的

本研究では唇顎口蓋裂患者の顎裂治療に適したオーダーメイドの新規足場材料の探索を行うことを目的とする。以下に学術的独自性と創造性を示す。

1) 骨伝導性を有するオーダーメイド吸収性足場材料の開発

申請者らは、ポリ乳酸等の生体高分子を紡糸し、CT データを元にして織ることで任意の 3 次元形状へと整形する特殊技術を保持している。すなわち、唇顎口蓋裂を原因とする複雑な裂形態に合わせてオーダーメイドで足場材料を製作できる。

また、歯質の切削等に用いられている歯科用の Er:YAG レーザーユニットを開発し、 α -TCP ターゲットに純水を浸透させ、Er:YAG-パルスレーザー (Er:YAG-PLD) 法で基板上に HAp 膜を作製することに成功している。この技術を用いれば手術サイドで足場材料にアパタイトをコーティングすることができる。すなわち、術部形態に応じて細胞接着の必要性が高い部分を重点的にコーティングできる。

2) 先天性ラット顎裂モデルを用いた骨増生のメカニズム解明と骨造成能の定量的評価

最近、柳生らは先天性ラット顎裂モデルを開発した (J Tissue Eng Regen Med 2015; 9: 276-285)。ラットは、下顎正中部に先天的に存在する自然には閉鎖しない顎裂欠損領域が存在する。申請者らは、その顎裂欠損領域に自家骨や様々な人工骨を移植し、その骨再生メカニズムを明らかにし、唇顎口蓋裂治療に適した足場材料を探索することが可能であると考えた。すでにビーグル犬を用いた人工顎裂モデルは確立されている。しかし、費用や倫理面から様々な条件で作製した新規の足場材料をスクリーニング評価することは困難である。

3. 研究の方法

Er:YAG パルスレーザーによる HAp の堆積とその後の加水分解の過程を経て、ポリカプロラクトン (PCL) 多孔質足場上に HAp をコーティングすることを試みた。PCL への HAp のコーティングは、走査型電子顕微鏡 (SEM)、X 線回折装置、X 線光電子分光法、フーリエ変換赤外分光法にて確認された。ラット骨髄由来間葉系幹細胞 (rBMSCs) を PCL または HAp-PCL ディスク/足場に播種した。ディスクを用いた初期接着と細胞の生存率を、DNA 含有量アッセイと live/dead アッセイで評価した。加えて、蛍光染色、SEM、DNA アッセイにより、足場への細胞の接着と増殖を評価した。8 週齢の F344 雄ラットの頭蓋骨にトレフィンバーとハンドピースを用いて、臨界サイズの骨欠損を形成した。形成した骨欠損部に、各足場 (PCL または HAp-PCL) を埋入した。埋入 2、4、8 週後にラットを安楽死させ、欠損組織周囲の頭蓋骨を採取し、マイクロコンピュータ断層撮影 (μ CT) により骨形成を定量的に評価した。ヘマトキシリン・エオジン染色、アルカリホ

スファターゼ染色、Von Kossa 染色、von Willebrand 因子の免疫染色、オステオカルシンの免疫蛍光染色を行い、顕微鏡観察した。

4. 研究成果

1. PCL 多孔質足場へのハイドロキシアパタイトコーティング

Er: YAG PLD 法による PCL 多孔質足場へのハイドロキシアパタイトコーティングには 2 つの処理がある。一つは-TCP をターゲットとした Er: YAG パルスレーザーの照射で、 α -TCP 微粒子を PCL 繊維上に析出させる。もう一つは加水分解で、 α -TCP からハイドロキシアパタイトへの構造変換を誘導し、最終的にハイドロキシアパタイト被覆 PCL を得る。走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察したところ、処理前の PCL 繊維の表面は平滑であった (図 1A(a-c))。一方、照射処理後の繊維表面には微粒子が均一に析出していた (図 1A(d-f))。加水分解処理後、微粒子の外観はブロック状から針状へと変化した (図 1A(g-i))。X 線回折 (XRD) により、 α -TCP (JCPDS NO.09-0348) とハイドロキシアパタイト (JCPDS NO.72-1243) の代表的なパターンが、それぞれ照射処理と加水分解処理後に出現することが明らかになった (図 1B)。加水分解処理後の X 線光電子分光 (XPS) では、リン酸カルシウム由来のピーク (O1s, Ca2p, P2p) が検出され、Ca/P 比は 1.44 と計算された。ハイドロキシアパタイトの一種であるカルシウム欠損ハイドロキシアパタイトの Ca/P 比と同等であった (図 1C)。

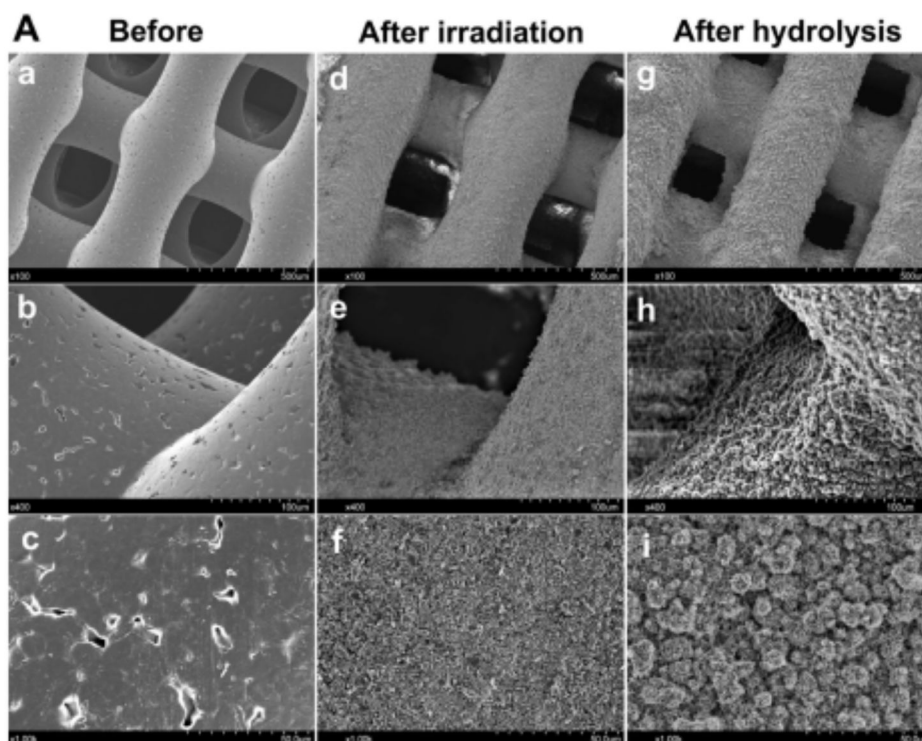


図 1 (A) . 照射および加水分解処理前 (a-c) と処理後 (d-f) の PCL 多孔質足場の SEM 像。

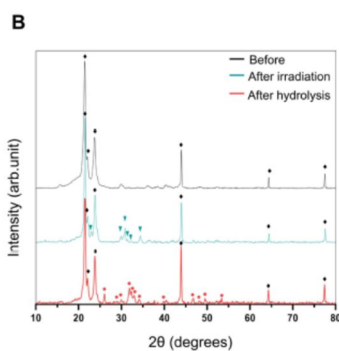


図 1 (B) 照射および加水分解処理前と処理後 (d-f) の PCL 多孔質足場の XRD 回折結果

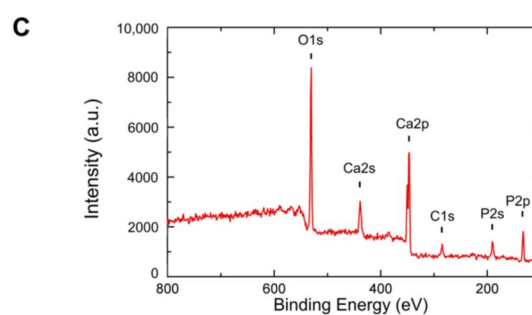


図 1 (C) 加水分解後の XPS チャート

ラット間葉系幹細胞 (rBMSCs) を PCL ディスクならびに HAp-PCL ディスクに播種し *in vitro* 実験を行った。その結果、HAp-PCL ディスクでより良好な初期細胞接着が観察された。一方、多くの rBMSCs は、HAp コーティングの有無に関係なく、ディスク上で生存していた。さらに、rBMSCs はどちらの足場にもよく接着し、増殖した。*in vivo* の実験から、HAp コーティングは骨形成を促進し (図 2A, B, D) HAp-PCL グループの新生骨の量は、どの時点でも PCL グループより有意に高いことが判明した (図 2C)。これは、HAp の優れた骨再生能に加え、足場表面の水濡れ性が向上したためと考えられる。

この研究にはいくつかの限界がある。この研究では PCL の完全な分解は観察されなかった。分解の遅れは、理想的な組織再生を物理的に妨げる。今後、足場作製に用いる材料の分解挙動を評価し、最適化する必要がある。また、細胞動態の観点からみた骨形成の詳細なメカニズムは、現在のところ不明な点が多い。骨芽細胞や血管内皮細胞が足場中でどのように出現するのか、今後の研究で明らかにする必要がある。

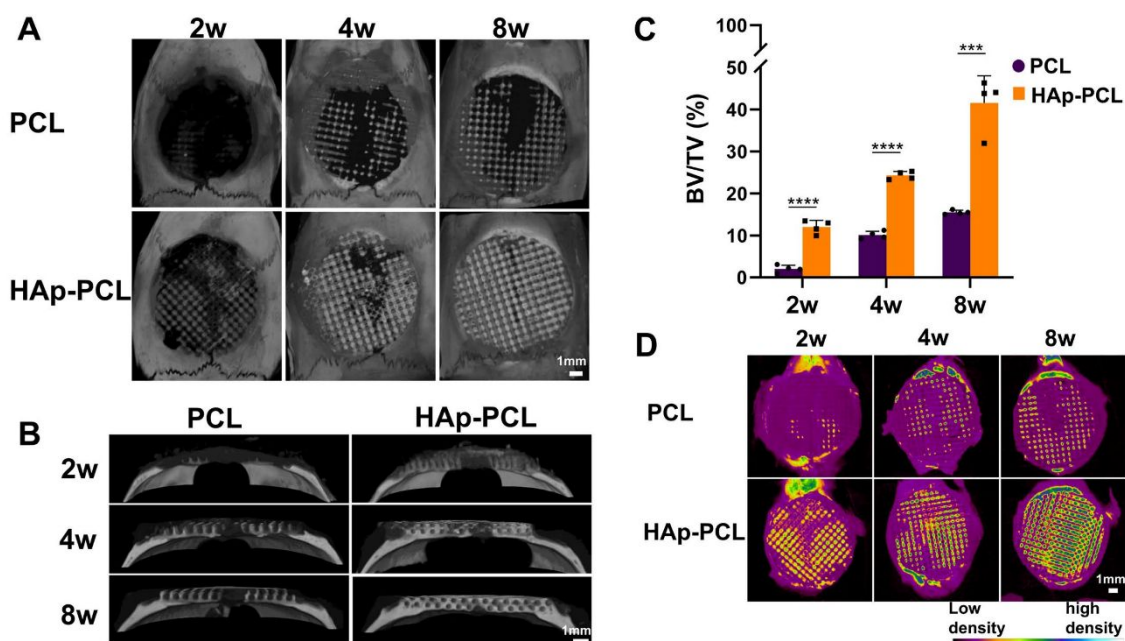


図 2. PCL または HAp-PCL をラットの臨界サイズの頭蓋骨骨欠損に移植して 2、4、8 週間後の骨形成の CT 分析。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Zhang Ye, Jo Jun-Ichiro, Chen Liji, Hontsu Shigeki, Hashimoto Yoshiya	4. 巻 23
2. 論文標題 Effect of Hydroxyapatite Coating by Er: YAG Pulsed Laser Deposition on the Bone Formation Efficacy by Polycaprolactone Porous Scaffold	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9048 ~ 9048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23169048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chen Liji, Hontsu Shigeki, Komasa Satoshi, Yamamoto Ei, Hashimoto Yoshiya, Matsumoto Naoyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Hydroxyapatite Film Coating by Er:YAG Pulsed Laser Deposition Method for the Repair of Enamel Defects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 7475 ~ 7475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma14237475	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 -

1. 著者名 Lyu Jinzhao, Hashimoto Yoshiya, Honda Yoshitomo, Matsumoto Naoyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Comparison of Osteogenic Potentials of Dental Pulp and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Using the New Cell Transplantation Platform, CellSaic, in a Rat Congenital Cleft-Jaw Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9478 ~ 9478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22179478	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 -

1. 著者名 Ma Lin, Li Min, Komasa Satoshi, Yan Sifan, Yang Yuanyuan, Nishizaki Mariko, Chen Liji, Zeng Yuhao, Wang Xin, Yamamoto Ei, Hontsu Shigeki, Hashimoto Yoshiya, Okazaki Joji	4. 巻 15
2. 論文標題 Characterization of Hydroxyapatite Film Obtained by Er:YAG Pulsed Laser Deposition on Sandblasted Titanium: An In Vitro Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 2306 ~ 2306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma15062306	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 -

1. 著者名 Yamaguchi Yusuke, Matsuno Tomonori, Miyazawa Atsuko, Hashimoto Yoshiya, Satomi Takafumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Bioactivity Evaluation of Biphasic Hydroxyapatite Bone Substitutes Immersed and Grown with Supersaturated Calcium Phosphate Solution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 5143 ~ 5143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma14185143	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Zhang Ye, Jo Jun-Ichiro, Chen Liji, Hontsu Shigeki, Hashimoto Yoshiya
2. 発表標題 Effect of Hydroxyapatite Coating by Er: YAG Pulsed Laser Deposition on the Bone Formation Efficacy by Polycaprolactone Porous Scaffold
3. 学会等名 国際歯科材料会議 2022 第80回 学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 陳麗吉 , 本津茂樹, 小正聡 , 山本 衛, 橋本典也, 松本尚之
2. 発表標題 エナメル質欠損修復のためのEr:YAGパルスレーザーディポジション法によるハイドロキシアパタイト成膜
3. 学会等名 日本歯科理工学会 第78回 秋期学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陳麗吉 , 本津茂樹, 小正聡 , 橋本典也, 松本尚之
2. 発表標題 Er:YAGレーザーアブレーション法によるエナメル質上へのアパタイト膜の直接形成
3. 学会等名 日本歯科理工学会 近畿・中四国地方会 令和2年度冬期セミナー
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	橋本 典也 (HASHIMOTO Yoshiya) (20228430)	大阪歯科大学・歯学部・教授 (34408)	
研究分担者	本津 茂樹 (HONTSU Shigeki) (40157102)	近畿大学・生物理工学部・教授 (34419)	
研究分担者	本田 義知 (HONDA Yoshitomo) (90547259)	大阪歯科大学・歯学部・教授 (34408)	
研究分担者	陳 麗吉 (CHIN Reiki) (20966816)	大阪歯科大学・歯学部・助教 (34408)	

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