

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23108

研究課題名(和文) 難治性インプラント周囲炎に対するBMP-2含有人工骨膜を応用した治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a treatment method for intractable peri-implantitis using BMP-2-containing artificial periosteum

研究代表者

納所 秋二(nosho, shuji)

岡山大学・大学病院・医師

研究者番号：40884797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、当初の計画で使用する予定であったPLGAメンブレンとは異なる新たな歯科用メンブレンを用いてヒト遺伝子組み換えBMP-2(以下、rhBMP-2)含有人工骨膜の作製を試みた。このメンブレンは片面のみに物質吸収性を示すため、我々は一面のみにrhBMP-2を吸着させることで、メンブレン内側に理想的な顎堤に近い形態の新生骨の形成を促すことが出来るのではないかと考えた。検討の結果、我々がこれまでに研究を進めているPLGAメンブレンを用いたrhBMP-2含有人工骨膜とほとんど同等の骨形成作用がこの新たなメンブレンの凍結乾燥体の内側において片側性に認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はこれまでにBMP-2/-TCP複合体による骨組織の再生に成功しているが、この再生骨は海綿骨が中心であり、インプラント体のオッセオインテグレーションの獲得に有利な皮質骨の効率的な再生には至っていない。本研究におけるrhBMP-2含有人工骨膜の応用により、インプラント周囲炎、および感染や粉碎骨折、血行不全により骨膜の機能不全が原因で一つの骨再生プロセスが途中で停止し生じる偽関節といった疾患に対する新たな治療法を確立できる可能性がある。また、本人工骨膜を歯科用インプラントを用いた治療に先立ち骨増生を行う際のメンブレンとして使用すれば、皮質骨組織と海綿骨組織の双方の再生を図れる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to create artificial periosteum that contains recombinant human bone Morphogenetic Protein-2 (rh-BMP-2) by using a new dental membrane that has absorbability of materials in only one side, although our first plan was to research validity of artificial periosteum that contains rh-BMP-2 by using PLGA-membrane. We made a hypothesis that the new membrane that contains rh-BMP-2 in only one side could promote new bone formation only inside of membrane, and control the shape of alveolar ridge after bone regenerative therapy. We revealed that the freeze-dried the new membrane contains rh-BMP-2 could promote new bone formation only inside of membrane, and the bone forming effect of new membrane contained rh-BMP-2 is almost same as PLGA-membrane.

研究分野：骨再生療法

キーワード：rhBMP-2含有人工骨膜 歯科用メンブレン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨形成を強力に誘導する骨形成タンパク質 (BMP) -2は、欧米において整形外科・歯科領域で臨床応用されている。我々もこれまでに大腸菌発現系ヒト遺伝子組み換えBMP-2 (以降、rhBMP-2) の開発を進め、大型動物においてrhBMP-2と -TCPの組み合わせで、確実にインプラント体周囲に骨を再生することが可能であることを報告してきたが、rhBMP-2と -TCPの組み合わせで再生される骨は海綿骨が中心であり、再生骨量の維持およびインプラント体のオッセオインテグレーション獲得に有利と考えられている皮質骨の効率的な再生には至っていない。歯科臨床で広く使用されている -TCPをrhBMP-2と同時に投与すると、 -TCPの単体投与群と比較し、 -TCPが早期に吸収されることが確認されたため、皮質骨を効率よく再生させるには、より長期に骨再生のために必要なスペースを確保し、BMP-2を作用させ骨再生を促す必要があると考えた。まず我々は、この骨代謝の変化により分解速度の影響の受けない乳酸・グリコール酸重合体 (PLGA) をrhBMP-2のキャリアとして用いることで、効率よく皮質骨再生を促すことができるのではないかと考えた。これまでの研究から、PLGAメンブレンにrhBMP-2を含浸させたものをラット頭蓋骨骨欠損・骨膜欠損モデルに応用することで、骨髄組織をほとんど含まない皮質骨様骨組織が再生されることが明らかとなっており、本メンブレンを、皮質骨周囲に存在する骨再生能を有する骨膜と類似した機能を有することから、人工骨膜と名付け本技術の特許を取得した (『人工骨膜の作成方法』 特許第5924610号)。しかし、rhBMP-2含有人工骨膜が大型動物や骨再生に厳しい条件下にて確実に骨再生が可能なのか点は未だ不明である。インプラント周囲炎などにより骨が吸収し、その部位が不良肉芽にて満たされ、慢性の炎症が存在する部位には健全な骨膜が存在しないためか、再生療法がうまくいかないケースがある。また、感染や粉碎骨折、血行不全などによる骨膜の機能不全が原因の一つで骨折部の骨再生プロセスが途中で停止し、偽関節になることがある。このような疾患に対し我々が開発してきた人工骨膜が有用ではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

骨の創傷治癒において、骨膜に存在する骨芽細胞分化能を有する間葉系幹細胞が重要な役割を担っていることから、細胞生物学的観点では健全な骨膜を再生することが健全な歯周組織の再生に繋がると考えられる。そこで我々は研究当初、PLGAメンブレンを用いたrhBMP-2含有人工骨膜の臨床応用に向け、大型動物や骨再生に厳しい条件下にて、その有効性を明らかにすること掲げていた。しかし、研究を進める過程において、実際の臨床で歯槽堤増大術などの処置を行う際、メンブレン内部にのみ骨形成を誘導することで理想的な顎堤形態の獲得を図る点を考慮し、PLGAメンブレンのようなメンブレンの両側に骨形成を誘導する材料よりも、片側性に骨形成を誘導する異なった材料がより適しているのではないかと考えるようになった。そこで、これまで用いてきたPLGAメンブレンとは異なった2層性の構造を持つ新たな歯科用メンブレンを応用してrhBMP-2含有人工骨膜の作製を試みることにした。同メンブレンは2層構造のうちの1層のみが物質吸収性に優れた多孔性を持ち、もう一つの層は粘膜の侵入を防ぐ目的で設計されている。同メンブレンの多孔性を持つ層に対して液体を浸潤させた場合、他方の層までは浸潤しないため、rhBMP-2をこのメンブレンの多孔性の層にのみ浸潤させることで臨床応用の際にも実用的な片側性の骨形成が促進されるのではないかと考えた。したがって、本研究ではこの新たな歯科用メンブレンを用いたrhBMP-2含有人工骨膜の作製、検討を進めることにした。

### 3. 研究の方法

まず、今回使用する新たな歯科用メンブレンが、rhBMP-2含有人工骨膜として十分な機能を果たすのかを確認するため、以下の検討を行った。

なお、8~12週齢の雄マウスの背部皮下、および頭蓋骨骨欠損部に移植が可能なメンブレンのサイズは7.5mm×12.5mmであり、この面積に対して約15 $\mu$ lの水分量を吸収させることができるため、同メンブレンの多孔性の層に十分量のrhBMP-2を吸着させることは可能であると考えられる。

rhBMP-2を吸着させたメンブレンの示す異所性骨形成作用の確認：rhBMP-2を吸着させた同メンブレンをマウスの背部皮下に移植して、移植部位で実際に骨形成作用が認められるのかどうかを検討する。実際にはメンブレンに1.0 $\mu$ g、5.0 $\mu$ g、10 $\mu$ gのrhBMP-2を吸着させたものをマウスの背部皮下に移植（rhBMP-2吸着層を内側に設定）したのち、2週間後に組織を回収する。回収した組織については、組織学的解析、および骨形態学的評価を行う。また、rhBMP-2を吸着させたメンブレンを凍結乾燥処理したものについても同様に検討を行う。

同メンブレンの骨欠損部に示す骨形成作用の確認：マウスの頭蓋骨に直径2mmの骨欠損を作製する。この時、頭蓋骨の骨膜は可及的にすべて除去する。作製した骨欠損部に10 $\mu$ gのrhBMP-2を浸潤させたメンブレンを移植し、2週間後に組織を回収する。回収した組織については、組織学的解析（H-E染色）、および骨形態学的評価を行う。

骨形態学的評価：micro-CT 解析により、再生した皮質骨の厚み、骨密度を計測し評価する。

組織学的解析：非脱灰研磨組織標本を作製し、再生骨量を計測し、対照群と比較し評価する。

### 4. 研究成果

rhBMP-2を吸着させたメンブレンをマウスの背部皮下に移植した結果、同メンブレンのrhBMP-2を吸着させた側のみにおいてrhBMP-2の濃度依存的に新生骨組織の形成を確認した。さらに、このメンブレンに凍結乾燥処理を施したのものにおいても同様の結果が認められた。この結果より、同メンブレンを用いてもrhBMP-2の異所性骨形成作用は発揮され、凍結乾燥処理の有無により、その骨形成作用は影響を受けないことが明らかとなった。

次いで、マウスの頭蓋骨に作製した骨欠損部に凍結乾燥処理を施したrhBMP-2含有メンブレンを移植した。なお、当初は頭蓋骨骨欠損部へメンブレンを移植した後に創部の裂開が相次いでいたが、メンブレンの形態のみを修正することで、吸着させるrhBMP-2の量は変更せずとも創部の裂開を防止することができた。解析の結果、マウスの頭蓋骨骨欠損部においても同メンブレン移植群は対照群と比較して皮質骨様の再生骨が認められた。そして、組織学的評価によりこの再生骨組織はrhBMP-2含有PLGAメンブレンを応用した人工骨膜により形成された骨組織と同様に皮質骨様の組織像を呈していた。

したがって、rhBMP-2を吸着させたこの新たな歯科用メンブレンは人工骨膜として皮質骨の再生に応用できる可能性を秘めているが、依然として同メンブレンを用いた人工骨膜が大型動物やより骨再生に厳しい条件下において確実に骨再生が可能であるかどうかは不明であるため、現在イヌを用いたインプラント周囲炎モデルを作製しており、今後この新たなrhBMP-2含有人工骨膜の有効性について検討を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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