

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 23 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592005

研究課題名（和文） 顎骨における水平的骨増生を目指した組織工学的手法の検討

研究課題名（英文） Horizontal bony outgrowth for mandibular bone using tissue engineering technology

研究代表者

百束 比古 (HYAKUSOKU HIKO)

日本医科大学医学研究科・教授

研究者番号：00165135

研究成果の概要（和文）：

加齢や歯周病等により菲薄化した顎骨量を回復させるため、「骨増生」を目的とした治療法の開発を実施した。本研究では、脂肪組織幹細胞（Adipose-derived stem cells; ASCs）と多血小板血漿（Platelet-Rich Plasma; PRP）の混合物移植時に、 α もしくは β -tri-calcium phosphate（TCP）を圧縮成形した足場材料を組み合わせた組織工学的手法を骨増生のために応用した。その結果、円筒状 α -TCPとASCs及びPRPを応用した組織工学的手法は硬組織再生に有用であり、骨増生法の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to establish the method for bony outgrowth on the original bone with the combination of adipose-derived stem cells (ASCs), platelet-rich plasma (PRP) and the compression molding tri-calcium phosphate (TCP). The implantation of ASCs/PRP and the compression molding α -TCP scaffold might be having a potential for the bony outgrowth method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

 キーワード：脂肪組織幹細胞、骨増生、多血小板血漿、 β -TCP、 α -TCP、頭蓋骨欠損モデル、水平性骨吸収

1. 研究開始当初の背景

加齢や歯周病等により菲薄化した顎骨は

自然骨折の危険性が生じるだけでなく、歯科インプラントなどの咬合回復を目的とした

治療を実施することが困難である。近年、幹細胞などを利用した様々な手法で骨を再生する試みがなされているが、これらは主に骨が欠損した部位、すなわち凹状に対する部位への骨再生であり、徐々に減少した骨幅径などの骨回復を対象とはしていない。そこで、このような新たに骨を築造する、「骨増生」を目的とした治療法の開発は重要と考えられる。

一方で、我々はこれまでに脂肪組織幹細胞 (Adipose-derived stem cells; ASCs) と多血小板血漿 (Platelet-Rich Plasma; PRP) の混合物移植が効果的に凹状骨欠損内部の硬組織再生を促進する結果を得ており、本混合物が骨増生にも応用できるのではと考えた。しかしながら、既存骨上に骨増生を行うためには、口腔内の咀嚼等の粘膜の可動に耐える足場材料が必要不可欠であり、今回、ASCs と PRP の混合移植に、骨増生に適した成形足場材料を併用する着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、ASCs と PRP の混合物を、 α もしくは β -tri-calcium phosphate (TCP) を圧縮成形した足場材料と組み合わせた組織工学的手法を応用し、既存の骨上部に硬組織を増生させることを目指した。

3. 研究の方法

H22年度は、骨増生に最適な足場材料の成形方法を検討した。 α 及び β -TCP を圧縮成形した構造物 (円形天板部と3本の支柱部から構成される、図1) を作製し、実験動物 (F344 ラット) 頭蓋骨に作製した直径6mmの骨欠損に植立した。具体的な足場材料の設

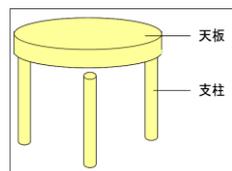


図1: 足場材料の構造

計としては、円形天板部は直径6mm、厚さ1mmとし、支柱部は高さ5mmで幅が1mmからなる一体型足場材料を作製し、 α 及び β -TCP の2種類の材料を用意した。支柱部を頭蓋骨上に植立する際は、支柱部を植立する部位の骨を歯科用エンジンバーにてドリリングした後、植立した。結果、移植6週間には足場材料の支柱部分の機械的強度不足による足場材料の破折が認められた。

そこでH23年度は同材料を円筒状に成形した足場材料を作製した (図2)。円筒状足場材料は高さ3mm、直径 (外径) が4mmの大きさになるよう圧縮成形した。

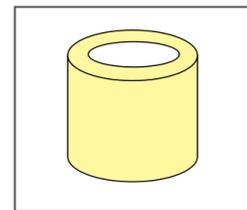


図2: 円筒状足場材料

実験動物の頭蓋骨上へ深さ約1mm、直径4mmの円形骨欠損を作製し、足場材料単独の移植実験を実施したところ、足場材料は移植4週間においても破壊は認められなかった。そこで、本構造の足場材料を用いた骨増生実験を行うこととした。

H24年度は、足場材料と間葉系幹細胞等を用いた骨増生実験を実施した。移植実験前に同種実験動物から採取したASCs及びPRPの混合物を準備した。

ASCsは実験動物鼠径部の皮下組織から脂肪組織を採取し、細切及びコラゲナーゼ処理後、遠心分離操作 (120g/5min) を実施し、下層に集積した間質系細胞集団 (Stromal vascular fractions; SVFs) を回収した。SVFsは基本培地 (DMEM+10% FBS+1% 抗生剤) を用いて初代培養を開始し、3日毎に培地交換を実施した。移植実験には第3継代後のASCsを使用した。

PRPは同種同系実験動物から得た全血から精製した。十分な麻酔を実施した後、心臓穿

刺より約 8ml の全血を採取し、ACD 入り採血管に回収した。1 回目の遠心分離操作 (450g/10min) の後、上層の血漿部分と赤血球の上層約 1ml を 15ml 遠心チューブに回収した。2 回目の遠心分離操作 (800g/15min) の後、血漿最下層の約 1ml を PRP と定義し、ASCs (1x10⁷ 細胞個) と混合した。

ASCs と PRP の混合物は 0.1ml の 2%CaCl を滴下し、ゲル化後に移植した。

移植方法としては成形した円筒状足場材料を骨欠損部に静置後、その内部にゲル化させた混合物を移植した。実験群として、(1) α-TCP 由来足場材料単独移植群、(2) β-TCP 由来足場材料単独移植群、(3) α-TCP 由来足場材料と ASCs/PRP 混合物の移植群、(4) β-TCP 由来足場材料と ASCs/PRP 混合物の移植群を準備した。

評価方法として、各実験群の足場材料内部に再生される硬組織量を比較検証した。具体的には、移植 4 週間後にマイクロ CT 撮影による足場材料内部の硬組織再生体積の計測及び組織学的観察を実施した。

4. 研究成果

実験動物頭蓋骨の骨欠損部に足場材料を単独移植した場合、移植 4 週後の足場材料内部における硬組織再生能は低く、骨増生、すなわち作製した骨欠損量以上の硬組織再生は認められなかった。一方で、ASCs と PRP の混合物を足場材料と併用移植した場合、骨欠損部上にも硬組織再生が移植 4 週後に確認された。また足場材料の材質の違いによる骨再生能を比較した結果、α-TCP と ASCs 及び PRP の併用では、既存周囲骨と新生硬組織の連続性が確認され、既存骨上部に骨増生が観察された。

今回、骨増生を目的とし、ASCs と PRP 及び TCP の組み合わせによる検証を実施し

た。本手法は自己由来材料と人工材料の組み合わせであるため、臨床応用を考えた際に、高い安全性と実用性を兼ね備えた方法であると考えられた。

また α-TCP 及び β-TCP 由来足場材料は、ともに硬組織伝導能を有する優れた骨補填材であるが、ASCs 等の幹細胞移植との併用の際には、分解速度の違いが硬組織再生能に影響している可能性が示唆された。α-TCP の分解速度は β-TCP の分解速度と比較して、幹細胞を用いた硬組織再生に適している可能性が考えられる。

しかし、骨増生量の制御及び増生した骨の由来等は未解明であり、さらに長期的な評価も不十分であることから、今後も継続的検証が必要と考えられた。

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 4 件)

Mizuno H, Tobita M, Uysal AC, Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. Stem Cells, 査読有り, 30, 2012, pp 804-810.

Tobita M, Orbay H, Mizuno H, Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. Discov Med, 査読有り, 11, 2011, pp 160-170.

Orbay H, Tobita M, Hyakusoku H, Mizuno H, Effect of adipose-derived stem cells on improving the viability of diced cartilage graft. Plast Reconstr Surg, 129, 2011, pp 369-377.

Tobita M, Mizuno H, Periodontal Disease and Periodontal Tissue Regeneration. Curr Stem Cell Res Ther, 査読有り, 5, 2010, pp 168-174.

[学会発表] (計 4 件)

田島聖士、飛田護邦、ハカン オルバイ、百束比古、水野博司. ラット頭蓋骨における脂肪組織幹細胞と多血小板血漿による骨再生能の免疫学的検証. 第 12 回日本再生医療学会総会. 2013 年 3 月 21 日、神奈川・日本

飛田護邦、田島聖士、ハカン オルバイ、百束比古、水野博司. ラット頭蓋骨における脂肪組織幹細胞と多血小板血漿を用いた硬組織再生への効果. 第 42 回日本創傷治癒学会. 2012 年 12 月 4 日、北海道・日本

飛田護邦、田島聖士、ハカン オルバイ、百束比古、水野博司. 多血小板血漿を移植キャリアーとして用いた脂肪組織幹細胞の硬組織再生能. 第 4 回 PRP 療法研究会. 2012 年 11 月 25 日、大阪・日本

水野博司、形成外科領域における脂肪組織由来幹細胞を用いた再生医学の現状. 第 53 回歯科基礎医学会、2011 年 10 月 2 日、岐阜・日本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

百束 比古 (HYAKUSOKU HIKO)
日本医科大学医学研究科・教授
研究者番号：1 6 5 1 3 5

(2) 研究分担者

水野 博司 (MIZUNO HIROSHI)

順天堂大学医学部・教授

研究者番号：8 0 3 4 3 6 0 6

(3) 連携研究者

飛田 護邦 (TOBITA MORIKUNI)

順天堂大学医学部・助教

研究者番号：1 0 5 9 9 0 3 8