

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5月28日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592172

研究課題名（和文） 骨折治癒メカニズムを応用した歯科インプラントにおける新規骨誘導法の開発

研究課題名（英文） Development of a novel bone induction method for dental implant based on the mechanism of fracture healing

研究代表者

山下 秀一郎（YAMASHITA SHUICHIRO）

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80242212

研究成果の概要（和文）：本研究では、骨折治癒過程に集積する骨芽細胞に分化が決定付けられた細胞（骨折誘導性骨芽細胞前駆細胞 FOPC）に着目し、FOPC を応用した新規骨増生法の可能性を探索した。骨原性細胞の動態について、ラットモデルを用い、Thy-1（CD90）をマーカーとして免疫組織化学的に検討した結果、骨髄中に存在する Thy-1 陽性細胞が、骨折の刺激により同部位に集積、増殖し、骨折の修復過程に関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on fracture-induced osteoblast precursor cells (FOPC), which are the cells accumulated at sites of fracture and committed to the osteoblast lineage, and attempted to establish a new bone induction method using a rat fracture model. Immunohistochemical examination showed the accumulation and proliferation of bone marrow-derived Thy-1 (CD90)-positive osteogenic cells, suggesting their possible involvement in fracture healing.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、補綴・理工系歯学

キーワード：顎口腔機能学

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国において、歯周疾患等に伴う歯の喪失に対する機能回復の手段として、歯科用インプラントの需要は年々増加している。にもかかわらず、イン

プラント体の埋入に必要な歯槽骨量の不足により適応が制限される場合も少なくない。この問題を解決するためには、歯槽骨の再生療法が必須であり、現在までに多くの基礎研究が行われ、様々な治療法が試みられている。

しかし、予知性の高い方法は未だ確立されていない。

2. 研究の目的

近年、幹細胞研究の進歩に伴い、幹細胞を応用した組織再生療法が実際の臨床の場でも応用されつつある。骨組織再生の分野においては、現在、最も有望視されているのが骨髄間葉幹細胞である。しかし、単一組織の再生を考えた場合、多分化能を有する幹細胞の応用はかえって非効率的であり、骨組織再生に特化した細胞の優位性が推測される。従来からの研究から、「インプラント埋入時のオッセオインテグレーションの獲得が、骨折時の創傷治癒に準ずる」ことが明らかにされている。本研究では骨折治癒過程に集積する骨芽細胞に分化が決定付けられた細胞(骨折誘導性骨芽細胞前駆細胞 FOPC)に着目し、FOPC を応用した新規骨増生法の可能性を探索した。

3. 研究の方法

(1) ラット骨折モデルの作成

本研究では、申請者らがこれまでに確立したラット骨折モデルを用いた。このモデルは、歯科用ラウンドバーにて大腿骨皮質骨を貫通し骨髄に至る組織損傷を与えることで、骨折類似の病態を作り出すものである。本研究では、FOPC を選択的に採取するために、骨折部の肉芽組織を回収した。酵素処理により細胞を分散させた後、ディッシュに播種し、接着細胞を FOPC として、以後の実験に用いた。

(2) 骨折修復過程における骨原性細胞の動態

①マイクロアレイによる FOPC 特異遺伝子の網羅的検索

得られた FOPC から RNA を抽出し、マイクロアレイに供した。正常大腿骨から採取した BMMSC と比較することで、FOPC 特異遺伝子マーカーを検索した。なお、BMMSC は骨髄を採取し培養ディッシュに播種後、接着した細胞を使用した。

②FOPC 様細胞の単離

FOPC は、もともと骨髄に存在している間葉系細胞が増殖、分化、集積してきたものと推測される。そこで、得られた FOPC 特異遺伝子マーカーをもとに、fluorescence activated cell sorting (FACS) 装置を用い、骨髄から FOPC 様細胞の単離を試みた。FACS に

よる細胞傷害性が高い場合には、magnetic activated cell sorting (MACS) 法による採取を試みた。また、採取した細胞の FOPC 特異遺伝子マーカーの発現はリアルタイム PCR 法にて、再度、確認を行った。

③FOPC 様細胞の性状・機能解析

FOPC 様細胞の性状、および機能について、研究計画 1 と同様の方法で、解析を行った。

4. 研究成果

(1) ラット骨折モデルの作成

8 週齢、オス、Wistar ラット大腿骨中央部に、皮質骨を貫通し骨髄のほぼ全層に渡る組織欠損を形成した。同部位を経時的に組織学的観察を行った結果、術後 1 日目に血腫形成、3 日目に肉芽組織～線維組織形成 (図 1)、5～7 日目にかけて新生骨の形成が認められた (図 2)。

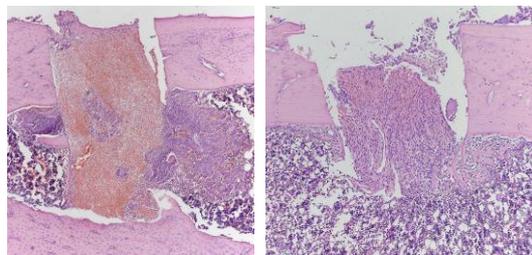


図 1：組織損傷後 1 日目には血腫形成 (左)、3 日目には肉芽組織～線維組織形成 (右) が観察された。

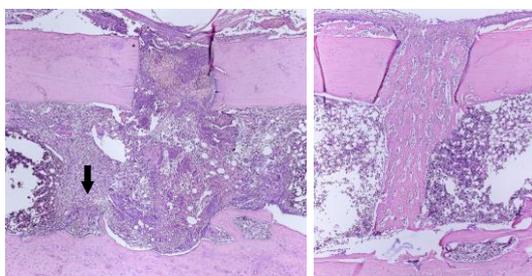


図 2：5 日目には一部に幼若な骨形成の開始 (左、矢印)、7 日目には新生骨の形成 (右) が観察された。

本モデルは、皮質骨の連続性を失わせないため、固定等の操作なしに骨折類似の病態を再現することができ、かつ、ヒトの場合、通常 1 ヶ月以上要する治癒過程を 1 週間程度で観察できる非常に有用な動物モデルであることが判明した。

(2) 骨折修復過程における骨原性細胞の動態

骨折修復過程における骨原性細胞の動態について、作成した動物モデルを用い、Thy-1 (CD90) をマーカーとして免疫組織化学的に

検討した。その結果、術後3日目に形成される肉芽組織、および線維組織中に見られる線維芽細胞様細胞の多くがThy-1陽性であった。(図3)

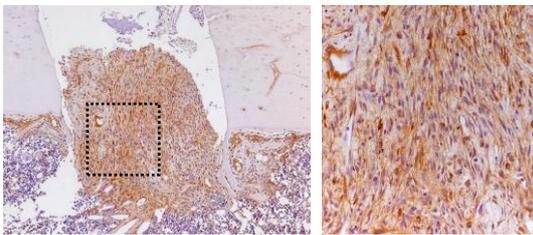


図3：肉芽組織を構成する線維芽細胞様細胞の多くがThy-1陽性である(右図は左図点線部の拡大)。

術後5~7日目にみられる新生骨形成の過程では、骨芽細胞周囲の線維芽細胞様細胞に強いThy-1陽性反応が認められた一方、骨芽細胞は弱陽性~陰性であった(図4)。また、新生骨中の骨細胞はThy-1陰性であった。

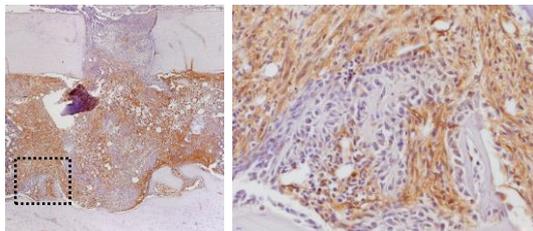


図4：新生骨周囲の線維芽細胞様細胞はThy-1陽性である一方、新生骨に近接する細胞、および骨芽細胞ではThy-1発現が減弱している(右図は左図点線部の拡大)。

以上の所見から、骨髄中に存在するThy-1陽性細胞が、骨折の刺激により同部位に集積、増殖し、骨折の修復過程に関与することが示唆された。しかし、Thy-1陽性が直接、骨芽細胞に分化するか否かについては不明であり、今後の検討課題としたい。

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)

- ① Hosoya A, Hiraga T, Ninomiya T, Yukita A, Yoshiba K, Yoshiba N, Takahashi M, Ito S, Nakamura H, Thy-1-positive cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells, *Histochemistry and Cell Biology*, 査読有、137巻、2012、733-742
DOI:10.1007/s00418-012-0928-1

- ② Tanigawa Y, Kasahara T, Yamashita S, Location of main occluding areas and masticatory ability in patients with implant-supported prostheses, *Australian Dental Journal*, 査読有、57巻、2012、171-177
DOI:10.1111/j.1834-7819.2012.01680.x
- ③ Nakamura H, Yukita A, Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T, Ozawa H, Localization of Thy-1-positive cells in the perichondrium during endochondral ossification, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 査読有、58巻、2010、455-462
DOI:10.1369/jhc.2010.955393
- ④ 山下秀一郎, 下顎臼歯部における咬合の再建にインプラントを用いた1症例、*日本口腔インプラント学会誌*, 査読有、23巻、2010、757-758
<http://ci.nii.ac.jp/naid/10027841839>

〔学会発表〕(計7件)

- ① Tanigawa Y, Yamashita S, Mitsui T, Kasahara T, Location of main occluding areas in patients with implant-supported prostheses, *International Association for Dental Research, 91th General Session of the IADR, 2013年3月23日, Washington State Convention & Trade Center, Seattle, USA*
- ② 西田 茜, 松崎文頼, 古屋克典, 関根秀志, 山下秀一郎, インプラント療法を希望した患者の臨床調査—過去2年間の調査結果の比較—, 第42回日本口腔インプラント学会学術大会, 2012年9月22日, 大阪国際会議場(大阪)
- ③ 谷川雄一, 笠原隼男, 山下秀一郎, 鷹股哲也, 臼歯部咬合支持の喪失をインプラントと部分床義歯で補綴処置した場合の主機能部位の比較, 第41回日本口腔インプラント学会学術大会, 2011年9月17日, 名古屋国際会議場(愛知)
- ④ 細矢明宏, 平賀 徹, 二宮 禎, 雪田 聡, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 中村浩彰, Thy-1陽性 subodontoblastic layer 細胞の高い硬組織形成能, 第9回日本再生歯科医学会, 2011年9月10日, 大阪国際会議場(大阪)
- ⑤ Tanigawa Y, Nakatsuka Y, Yamashita S, Kasahara T, Hashii K, Comparison of main

occluding areas between implant and denture patients、International Association for Dental Research、89th General Session of the IADR、2011年3月17日、San Diego Convention Center、San Diego、USA

- ⑥ 細矢明宏、平賀 徹、二宮 禎、雪田 聡、吉羽邦彦、吉羽永子、中村浩彰、Thy-1 陽性歯髓細胞の硬組織形成能に関する形態学的研究、第52回歯科基礎医学会学術大会、2010年9月20日、タワーホール船堀（東京）
- ⑦ 井出吉信、山下秀一郎（座長）、安全で確実なインプラント治療に必要となる解剖学的知識、第40回日本口腔インプラント学会学術大会、2010年9月18日、札幌コンベンションセンター（北海道）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 秀一郎 (YAMASHITA SHUICHIRO)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：80242212

(2) 研究分担者

平賀 徹 (HIRAGA TORU)
松本歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：70322170

(3) 連携研究者

()

研究者番号：