

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 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791981

研究課題名（和文）多孔質セラミックスにおける骨芽細胞の骨形成分子メカニズムの解析

研究課題名（英文）The Bone Regenerative effect of Osteoblasts on Novel Hydroxyapatite Ceramics

研究代表者

多田 美里（平岡 美里）（TADA MISATO）（HIRAOKA MISATO）

広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号：40572326

研究成果の概要（和文）：

連通気孔を有する多孔体 HA セラミックス骨補填材 IP-CHA がヒト骨芽細胞に及ぼす影響を細胞生物学的に検討し、骨芽細胞の増殖、分化を支持し、骨芽細胞の足場の担体として有効に機能することを明らかにした。また、IP-CHA/骨芽細胞複合体は生体親和性および骨伝導能を有し、早期の骨組織再生を促進すること、さらに異所性骨形成能を確認し、また IP-CHA/骨芽細胞/TGF- β 1 複合体では早期に新生骨形成を認めることを報告してきた。バイオマテリアルと骨芽細胞複合体による骨形成分子機構を明らかにすることにより、理想的な骨再建材料の開発と臨床応用へと発展する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

IP-CHA (Interconnected Porous Calcium Hydroxyapatite) is an excellent ceramic for use in bone tissue engineering because of its fully interconnected porous structure, which allows osteoblasts dispersion and supports their osteogenic differentiation. This study provided biochemical evidence that the IP-CHA/osteoblasts composite and IP-CHA / osteoblasts / TGF- β 1 (Transforming growth factor- β 1) composite could enhance osteogenic potential. It was strongly suggested that IP-CHA was a useful biomaterial for bone tissue regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 462,735 | 138,820 | 601,555 |
| 2011年度 | 637,265 | 191,179 | 828,444 |
| 2012年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,200,000 | 659,999 | 2,859,999 |

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：多孔質セラミックス，ハイドロキシアパタイト，ヒト骨芽細胞，骨再生，IP-CHA

1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域における腫瘍、嚢胞、骨髄炎などの顎骨疾患の治療に伴う骨欠損部の再建、また、高度に萎縮した顎堤症例に対するインプラント治療における骨増生に対し、自家骨移植が一般的な方法として最も多く行われてきたが、二次的な骨採取手術の必要性、採取骨量の制限、術後の移植骨の吸収などの問題点があり、近年自家骨移植に代わる各種生体材料の開発がなされている。

自家骨移植に代わる骨再建・再生法として、これまで我々は多孔質セラミックス (IP-CHA) と骨芽細胞のハイブリッド人工骨が有用であることを報告してきた。IP-CHA がヒト顎骨骨芽細胞に及ぼす影響を細胞生物学的に検討し、①IP-CHA の表面性状は、ヒト顎骨骨芽細胞の接着、増殖に適していること、② IP-CHA におけるヒト顎骨骨芽細胞の石灰化能を認め、IP-CHA の連通多孔構造は骨芽細胞の増殖、分化を支持すること、③ IP-CHA は骨芽細胞の足場の担体として有効に機能することを報告し、また、IP-CHA と骨芽細胞複合体の臨床応用を目的とし、その第一歩として、IP-CHA とラット骨芽細胞との組み合わせによる培養型人工骨を作製し、ラット脛骨骨欠損モデルを用い IP-CHA と骨芽細胞複合体の骨形成能や骨形成過程について組織学的、細胞生物学的に検討し、④ IP-CHA と骨芽細胞複合体は生体親和性および骨伝導能を有し、早期の骨組織再生を促進することを報告してきた。さらに、ラット皮下埋入実験により IP-CHA/骨芽細胞複合体の異所性骨形成能を確認し、また IP-CHA/骨芽細胞/TGF- β 1 複合体では早期に新生骨形成を認め、TGF- β 1 は、ヒト顎骨骨芽細胞の培養初期の増殖および分化を促進し、*in vivo* においても培養骨芽細胞による骨形成に影響を及ぼすことを明らかにしてきた。

多孔質セラミックスは骨芽細胞および破骨細胞の活性化に大きな影響を及ぼしていると考えられるが、その詳細は明らかにされていない。細胞レベルの研究はほとんど行われておらず、多孔質セラミックスにおける細胞挙動や骨芽細胞分化を制御するシグナル因子群に関する詳細な報告はほとんどなく、その治療課程における細胞動態の詳細については未だ明らかになっていない。

したがって、IP-CHA における骨芽細胞の骨形成発現メカニズムの解析を目的とした本研究は、同研究領域に新たな研究分野を開拓するものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究において、IP-CHA におけるヒト骨芽細胞増殖・分化促進メカニズムを遺伝子レベルで解明し、特異的かつ普遍的に作用するシグナル伝達物質を含めた因子の発見・解析により IP-CHA におけるヒト骨芽細胞による骨形成課程における細胞動態の詳細を明らかにする。

また、バイオマテリアルと骨芽細胞複合体による骨形成分子機構を明らかにすることにより、多孔質セラミックス/骨芽細胞複合体の臨床応用に基礎的な裏付けを行うとともに、より理想的な骨再建材料の開発と臨床応用を検討することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

IP-CHA におけるヒト骨芽細胞の骨形成メカニズムの解析を行うため、IP-CHA に当科にて継代培養を行っているヒト顎骨骨芽細胞を播種し、デキサメタゾンを含む石灰化誘導培地で培養後、骨芽細胞から mRNA を抽出し、Runx2, Osteorix などの転写因子の発現を real-time PCR 法にて検討し、多孔質セラミックス (IP-CHA) における骨芽細胞の骨形成・分化マーカー (ALP, Type I collagen, OCN, OPN) の遺伝子発現に対する相乗効果、あるいは抑制効果を経時的に検討した。

4. 研究成果

IP-CHA は既に臨床応用されており、本材料と骨原性細胞複合体に関する研究は活発に行われているが、多孔質セラミックスにおける細胞挙動や骨芽細胞分化を制御するシグナル因子群に関する詳細については未だ明らかになっていない。骨形成に関わるシグナル伝達系として、MAPK カスケード, Smad シグナリング, Wnt シグナリングが関係することが明らかとなっている。これらの伝達系はストロークしており、骨形成は複雑なネットワークで制御されている。

IP-CHA における骨芽細胞の骨形成・分化マーカーの遺伝子発現を経時的に検討した結果、細胞内分子と細胞内シグナル伝達系が、ALP, Type I collagen, OCN, OPN mRNA の発現に特異的な作用をきたして骨芽細胞の分化を促進し、制御している可能性が示唆された。

バイオマテリアルと骨芽細胞複合体による骨形成分子機構を明らかにすることにより、多孔質セラミックス/骨芽細胞複合体の臨

床応用に基礎的な裏付けを行うこととなり、より理想的な骨再建材料の開発と臨床応用へと発展する可能性が示唆された。

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 3-dimensional composite scaffolds consisting of apatite-PLGA-atelocollagen for bone tissue engineering. Takechi M, Ohta K, Ninomiya Y, Tada M, Minami M, Takamoto M, Ohta A, Nakagawa T, Fukui A, Miyamoto Y, Kamata N.: Dent Mater J. 2012;31(3):465-71. 査読有
- ② Wound healing effects of gingival fibroblasts cultured in animal-free medium. Nishi H, Ohta K, Takechi M, Yoneda S, Hiraoka M, Kamata N.: Oral Dis. 2010 Jul; 16(5): 438-44. 査読有
- ③ Influence of factors related to implant stability detected by wireless resonance frequency analysis device. Ohta K, Takechi M, Minami M, Shigeishi H, Hiraoka M, Nishimura M, Kamata N.: J Oral Rehabil. 2010 Feb;37(2):131-7. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 連通多孔体ハイドロキシアパタイト/骨芽細胞複合体の骨形成能に及ぼす transforming growth factor- β 1(TGF- β 1) の影響と顎骨組織再生への応用に関する基礎的研究 : 多田美里, 武知正晃, 南正彦, 太田耕司, 鎌田伸之. : 第 60 回 NPO 法人日本口腔科学会中国・四国地方部会 (2012.10.6 広島)
- ② NEOBONE[®]と吸収性メッシュを顎堤萎縮症例に使用した骨造成の 1 例 : 二宮嘉昭, 武知正晃, 太田耕司, 中川貴之, 多田美里, 高本 愛, 鎌田伸之. : 第 57 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 (2012.10.19 横浜)
- ③ スプリットクレスト法に NEOBONE[®] 顆粒を使用したインプラント同時埋入の 1 例 : 山本 一博, 武知 正晃, 二宮 嘉昭, 重石 英夫, 多田美里, 高本 愛, 鎌田 伸之. : 第 16 回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会 (2012. 12. 1 北九州)

④ 炭酸アパタイト-PLGA 複合体の新規開発と基礎的研究について : 太田 彰, 武知正晃, 太田耕司, 多田美里, 南 正彦, 都留寛治, 石川邦夫, 鎌田伸之. : 第 45 回広島大学歯学会総会 (2012.6.9 広島)

⑤ 炭酸アパタイト-PLGA 複合体による新規骨再生材料の開発 : 太田 彰, 武知正晃, 太田耕司, 二宮嘉昭, 中川貴之, 多田美里, 南 正彦, 高本 愛, 都留寛治, 石川邦夫, 鎌田伸之. : 第 33 回日本バイオマテリアル学会総会 (2011.11.22 京都)

⑥ Fabrication and basic properties of poly(DL-lactide-co-glycolide) containing Carbonated apatite: Ota A, Takechi M, Ota K, Ninomiya Y, Nakagawa T, Tada M, Minami M, Takamoto M, Tsuru K, Ishikawa K, Kamata N.: 4th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry (2011.10.10 広島)

⑦ GM含有 α -TCP/AC の顎骨骨髄炎への応用に関する基礎的研究—基本物性と骨形成評価について : 二宮嘉昭, 武知正晃, 太田耕司, 南 正彦, 多田美里, 太田 彰, 湯浅哲也, 石川邦夫, 鎌田伸之. : 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会 (2010.11.30 広島)

⑧ 連通気孔体ハイドロキシアパタイトブロックを用いた骨造成に関する基礎的研究 : 南正彦, 武知正晃, 平岡美里, 太田耕司, 二宮嘉昭, 高本 愛, 鎌田伸之. : 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会 (2010.11.30 広島)

⑨ インプラント埋入を目的とする骨造成への連通気孔体ハイドロキシアパタイト (ネオボーン) ブロックの応用に関する基礎的研究 : 南正彦, 武知正晃, 平岡美里, 太田耕司, 二宮嘉昭, 高本 愛, 鎌田伸之. : 第 64 回日本口腔科学会学術集会・学術総会 (2010.6.25 札幌)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 美里 (平岡 美里) (MISATO TADA)
広島大学・病院・歯科診療医
研究者番号：40572326

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：