

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592913

研究課題名(和文) オステオンを含有する成熟皮質骨形成を誘導する in situ 骨再生技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of in situ bone regenerative technology to induce mature cortical bone formation containing osteons

研究代表者

菅野 勇樹 (Kanno, Yuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80451813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、従来ほとんど検討されていなかったオステオンの形成・再生機構を解明し、さらに新規の生体材料技術を用いてオステオン形成・再生機構を生体内で再現することにより、これまで難しかった成熟骨基質形成を誘導する in situ 骨再生技術を確立することである。そのため、ヒトと同様にオステオン構造が見られるイヌ(ビーグル)の実験モデルを使用し、成長因子・サイトカインを添加した皮質骨誘導型人工骨の有用性を検証した。さらに、このような皮質骨誘導型人工骨を新規吸収性メッシュトレーに入れて in situ 再生骨組織を作製し、ビーグル骨欠損モデルに移植して、その有用性を検証した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the mechanism of osteons formation and regeneration that has never been studied and in vivo osteons formation and regeneration mechanism using novel biomaterials technologies. Therefore, we establish the in situ bone regeneration techniques to induce mature cortical bone matrix formation that was difficult until now. Thus, we examined the utility of cortical bone induced artificial bone with the addition of growth factors or cytokines by using the experimental dog (Beagle) model which found osteons structure in the same as human. Furthermore, we prepared in situ regenerative bone tissue, which placed in a new absorbable mesh tray cortical bone induced artificial bone, and implanted in beagle bone defect model to verify their usefulness.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、外科系歯学

キーワード：オステオン 皮質骨誘導型人工骨 成長因子 サイトカイン in situ 骨再生技術 吸収性メッシュトレー

### 1. 研究開始当初の背景

口腔周囲には、下顎骨、上顎骨、口蓋骨、篩骨、鋤骨などといった複雑な形状を持った骨が多数存在し、これらの骨が複合して顎・口腔領域のフレームワークを構成する。上記の骨は、顔面の形状保持、歯の力学的支持、その他、咀嚼、発声、構音などに重要な役割を果たすが、このような多岐にわたる機能を実現するためには、骨が複雑な形状を維持するとともに、十分な力学的強度を保持することが不可欠である。したがって、これらの骨に、癌や腫瘍の手術侵襲、外傷、先天性形態異常や歯周病といった疾患で欠損を生じた場合、欠損に対する治療としては、骨の生理的な3次元形状と各種機能を支持する力学的強度の再現が必須となる。元来、骨は外殻となる皮質骨と内部の海綿骨によって構成されている。皮質骨はヒトをはじめとする大型哺乳類で発達が目覚しく、躯体の支持、筋力の伝達、外力からの防御などといった力学的な機能の本質的な部分は皮質骨が担っていると考えられる。さらに、ヒトをはじめとする大型哺乳類の皮質骨には、小型哺乳類やそれ以外の脊椎動物で見られない、オステオン構造が見られる。オステオンは、脈管系が長軸方向に貫通するハバース管と、それを中心に同心円状にとりまく骨細胞によって構成される。近年、骨細胞は骨の維持や代謝に重要な役割を果たすことが明らかになってきたが[Tatsumi et al Cell Metab 2007]、オステオンはこのような骨細胞を豊富にふくみ、かつ骨細胞が整然と同心円状に配列された構造をとっている。したがって、生理的な3次元形状の再現に加え、このオステオン構造を含有する成熟した皮質骨の再生が、歯の力学的支持、咀嚼、発声、構音などといった口腔外科の臨床ニーズを適えるために不可欠な条件であると申請者らは考えた。

### 2. 研究の目的

口腔周囲には複雑な形状を持った骨が多数存在し、顔面の形状保持、歯の力学的支持、その他、咀嚼、発声、構音などに重要な役割を果たす。これらの骨は癌や腫瘍の手術侵襲、外傷、先天性形態異常や歯周病といった疾患で欠損を生じるが、欠損に対する治療として多岐にわたる機能を再建するためには、オステオン構造を含有する成熟皮質骨の再生が不可欠である。本研究では、従来ほとんど検討されていなかったオステオンの形成・再生機構を解析し、この知見を応用した新規の生体材料技術を用いて、オステオンを含有する皮質形成を生体内で再現する。本研究の目的は従来なしえなかった成熟骨基質形成を誘導する in situ 骨再生技術を確認することである。

### 3. 研究の方法

1. セラミック/ポリマーコンポジットメッシュの条件設定

セラミック/ポリマーコンポジットをメッシュとして使用するための条件設定を行った。まず、TCPとPLGCの混合比や混合方法など、成分条件を変えた数種類の素材を作製し、これらの素材を用いて厚さ、開口形状、開口率など、材型条件の異なる数種類のメッシュを作製した。それらのメッシュに対し、力学的強度、生分解性、分解産物のpHならびに成分などを評価し、顎顔面組織の形態保持に必要な成分条件、材型条件を設定した。

### 2. 海綿骨細片(PCBM)を用いたビーグル骨区域欠損に対する移植実験

ビーグル下顎骨欠損モデルの作製をおこなった。ビーグル(1歳齢)の下顎に骨区域欠損を作製する。PCBMは、切除した下顎および新たに採取した腸骨から作製した。1で検討したセラミック/ポリマーコンポジットメッシュを移植時に熱変形させて、欠損部と同等の形状を付与した。メッシュで作ったトレーにPCBMを充填してin situ再生骨組織を作製し、下顎欠損部に移植し、移植後摘出し、骨再生の評価をおこなった。評価にはマイクロCTによる画像評価や組織学的評価、などを行い、オステオン構造を有する成熟した皮質骨の形成を観察するほか、組織の一部を採取し生化学評価をおこなった。

### 3. 皮質骨再生における成長因子ならびにサイトカインの分泌変化の評価

2における顎骨修復過程は、皮質骨再生モデルとして、オステオンの再建、再生の分子機構を解析することが可能である。移植後摘出した再生組織から蛋白や遺伝子を採取し、成長因子ならびにサイトカインを計測した。

### 4. 徐放化した成長因子・サイトカインを含有した硫酸カルシウム顆粒の作製

PCBMの代替となる生体材料の検討を行う。この生体材料は、骨伝導能と骨誘導能の両者を具備する必要がある。そのため、薬剤の徐放化が可能で、生体吸収性を調整できる硫酸カルシウム系素材を用いた。3項で変動が認められた成長因子あるいはサイトカインの経時的変化を再現するよう、因子の濃度ならびに硫酸カルシウム系素材の製造条件を検討し、素材は顆粒状に加工した。顆粒状素材を細胞外液に浸漬し、顆粒径、力学的強度、溶出ミネラル濃度、溶出因子濃度、などの経時的変化を評価し、これらの結果から、徐放化した成長因子・サイトカインを含有した硫酸カルシウム顆粒の作製条件を最適化し、皮質骨誘導型人工骨の確立をおこなった。

### 5. ラットを用いた皮質骨誘導型人工骨による骨形成実験

Fisher344ラット(7週齢オス)に、4項で検討した皮質骨誘導型人工骨を移植した。硫酸カルシウム系素材の形状は5X2mmとし、ラットの背部に移植した。移植後、組織を摘

出し、骨再生を評価した。評価にはマイクロCTによる画像評価、または組織学的評価、などを行った。

#### 6.皮質骨誘導型人工骨を用いた in situ 再生骨組織のビーグル移植実験

2項と同様のビーグル下顎骨欠損モデルを作製した。ビーグルの下顎に骨区域欠損を作製する。1で検討したセラミック/ポリマーコンジットメッシュに欠損部と同等の形状を付与し、4項で検討した皮質骨誘導型人工骨を充填して in situ 再生骨組織を作製し、下顎欠損部に移植しチタンスクリュースクリューで固定し、移植後2週、1ヵ月、2ヶ月でX線撮影をし、骨再生を評価するとともに、移植後2ヵ月で移植組織を摘出し、マイクロCT撮影、組織学的評価、などを行い、成熟した皮質骨の形成を観察した。

#### 4.研究成果

研究初年度の成果として、研究計画、方法の1および2項のセラミック/合成ポリマーメッシュの条件設定を行った。-TCPとPLGCの混合比率の設定、メッシュの厚さ、気孔径の設定を行い、力学的強度、生分解性を評価した。これにより、セラミック/合成ポリマーメッシュの製造条件を決定した。

ついで、本研究において非常に重要な成長因子の徐放化システムについて検討を行った。代表的な骨形成性成長因子の一つであるFGF-2を用いて、吸収性材料に内包し、成長因子含有顆粒を作製した。顆粒作製に関しては、成長因子溶液を固層化する方法を検討し、作製に成功した。また、成長因子活性を維持するために、保護剤としてさまざまな生体材料の検討を行った。それぞれの生体材料を、固層化に用いられる有機溶剤に対しての成長因子活性の影響を検討したところ、ヘパリン、BSAなどといった生体材料を保護剤として使用することにより有機溶剤の影響はほとんどなく、成長因子活性も多保持することができ、成長因子含有顆粒の作製方法に重要な知見を得ることができた。また、これらの製造法によって作製された顆粒から抽出した液性成分から、成長因子の濃度を測定したところ、ヘパリンを用いた製造で作製された顆粒が最も成長因子含有率が高かった。加えて、細胞増殖を検討するため、ヒト軟骨細胞を  $4 \times 10^4$  cells/6well plate, 2000 cells/96well plate で播種し、顆粒抽出溶液を段階希釈で培養液に添加し、1週間培養を行った結果、抽出液添加により効果的な増殖が認められ、細胞生存率も基礎培地よりも有意に高かったことから、これらの成長因子の経時的な徐放を検討するために、in vitro の実験系で4週までの成長因子の徐放量をELISAで測定したところ、経時的な徐放が認められた。

さらに、設定したセラミック/合成ポリマーメッシュを用いて動物実験を行った。

Fisher344ラットに、セラミック/合成ポリマーメッシュをもちいた皮質骨誘導型人工骨の移植を行った。対照として成長因子・サイトカインを含有しない素材のみを移植した。移植後、骨再生の評価をマイクロCTによる画像評価、組織学的評価などを行ったところ、対照群と比較して良好な骨形成が認められた。ビーグルで骨欠損を作製し、同様な実験をおこなったところ、皮質骨誘導型人工骨の移植を行なった群で、良好な骨形成が認められた。

#### 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15件)

Saijo H, Kanno Y, Mori Y, Suzuki S, Ohkubo K, Chikazu D, Yonehara Y, Chung UI, Takato T. A novel method for designing and fabricating custom-made artificial bones. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011 Sep;40(9):955-60.

Mori Y, Susami T, Haga N, Tamura K, Kanno Y, Saijo H, Takato T. Extraction of 6 molars under general anesthesia in patient with fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011 Jul;69(7):1905-10.

Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Macrophage-inducing fasl on chondrocytes forms immune privilege in cartilage tissue engineering, enhancing in vivo regeneration. *Stem Cells.*(in press)

Hoshi K, Fujihara Y, Asawa Y, Nishizawa S, Kanazawa S, Sakamoto T, Watanabe M, Ogasawara T, H S, Mori Y, Takato T. Recent trends of cartilage regenerative medicine and its application to the oral and maxillofacial surgery. *Oral Sci Int.* (in press)

Yonenaga K, Nishizawa S, Fujihara Y, Asawa Y, Kanazawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K. Application of floating cells for improved harvest in human chondrocyte culture. *Biomed Res.* 2012;33(5):281-9.

Tanaka Y, Saijo Y, Fujihara Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Nagata S, Ogasawara T, Asawa Y, Takato T, Hoshi K. Evaluation of the implant type tissue-engineered cartilage by scanning acoustic microscopy. *J Biosci Bioeng.* 2012 Feb;113(2):252-7.

Ko EC, Fujihara Y, Ogasawara T, Asawa Y, Nishizawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K.

BMP-2 embedded atelocollagen scaffold for tissue-engineered cartilage cultured in the medium containing insulin and triiodothyronine--a new protocol for three-dimensional in vitro culture of human chondrocytes. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012 May;18(5):374-86.

Mori Y, Fujihara Y, Misawa M, Inoue H, Inaki R, Suenaga H, Okubo K, Saijo H, Takato T, Hoshi K. Fabrication of Stereotyped Beta-Tricalcium-Phosphate Blocks into a Conjugated Structure using Mesenchymal Stem Cell Sheets Prepared in Temperature-Responsive Culture Dishes. *J of Hard Tissue Biology*. (in press)

Matsuyama M, Fujihara Y, Inaki R, Nishizawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K. Evaluation of in vivo migration of chondrocytes from tissue-engineered cartilage that was subcutaneously transplanted in mouse model. *OJRM* 2(4):93-98. 2013

Mori Y, Hoshi K, Takato T, Takahashi M, Hirano Y, Kanno Y, Ohkubo K, Saijo H. Submucous cleft palate: variations in bony defects of the hard palate. *Br J Oral Maxillofac Surg* 51(8):e220-e223.

Uto S, Nishizawa S, Takasawa Y, Asawa Y, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Bone and cartilage repair by transplantation of induced pluripotent stem cells in murine joint defect model. *Biomed Res* 34(6):281-288. 2013

Mori Y, Kanazawa S, Watanabe M, Suenaga H, Okubo K, Nagata S, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Usefulness of Agarose Mold as a Storage Container for Three-Dimensional Tissue-Engineered Cartilage. *Materials and Sci Applications* 4: 72-78. 2013

Mori Y, Watanabe M, Nakagawa S, Asawa Y, Nishizawa S, Okubo K, Saijo H, Nagata S, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Hollow Fiber Module Applied for Effective Proliferation and Harvest of Cultured Chondrocytes. *Materials Sci and Applications* 4:62-67. 2013

Maeda Y, Suenaga H, Sugiyama M, Saijo H, Hoshi K, Mori Y, Takato T. Clinical presentation of epignathus teratoma with cleft palate; and duplication of cranial base, tongue, mandible, and pituitary gland. *J Craniofac Surg* 24(4):1486-1491. 2013

Komura M, Komura H, Otani Y, Kanamori Y, Iwanaka T, Hoshi K, Tsuyoshi T, Tabata Y. The junction between hyaline cartilage and engineered cartilage in rabbits. *Laryngoscope* 123(6):1547-1551. 2013

Suenaga H, Hoang Tran H, Liao H, Masamune K, Dohi T, Hoshi K, Mori Y, Takato T. Real-time in situ three-dimensional integral videography and surgical navigation using augmented reality: a pilot study. *Int J Oral Sci* 5(2): 98-102. 2013

〔学会発表〕(計 9 件)  
菅野勇樹,西條英人,斎藤健太郎,古賀陽子,杉山 円,安部貴大,瀬戸一郎,森 良之,高戸 毅:片側性唇顎口蓋裂患者に対し,チタンメッシュを併用し,インプラント治療を行った 1 例. 第 15 回 日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会. 2011 年 12 月 3-4 日

Fujihara Y, Takato T, Hoshi K: Chondrocytes suppress tissue reactions in tissue-engineered cartilage through induction of immune privilege. 3rd TERMIS World Congress 2012, September 5-8, 2012, Vienna, Austria, Hofburg Congress Center

星 和人,自己組織化ペプチドを活用した次世代再生軟骨組織の研究開発,第 13 回日本再生医療学会総会,国立京都国際会館,京都, Mar. 4, 2014.

星 和人,軟骨の再生・再建 - 軟骨の生態学的研究 -, 第 27 回日本軟骨代謝学会,京都府医師会館,京都, Mar. 1, 2014.

星 和人,足場素材を導入した 3 次元再生軟骨の研究開発,第 16 回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ,東京, Dec. 26, 2013.

星 和人,生分解性ポリマーを用いた軟骨再生医療の研究開発,第 30 回高分子研究会講座,東京大学生産技術研究所,東京, Nov. 27, 2013.

Kazuto Hoshi, Clinical Application of Tissue-engineered Cartilage in Craniofacial Areas, 21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Palau de Congressos de Catalunya Barcelona, Spain, Oct. 13, 2013.

Kazuto Hoshi, Cartilage Regeneration and Usefulness of Medication, International Cartilage Repair Society 2013, Swissotel Gran Efes, Izmir, Turkey, Sep. 17, 2013.

Kazuto Hoshi, Optimal Combinations of Scaffolds and Growth Factors for Tissue Engineering of Cartilage, Osteoarthritis Research Society International World Congress, Marriott Philadelphia Downtown, Philadelphia, USA, Apr. 20, 2013.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅野 勇樹 (Kanno Yuki)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80451813

### (2) 研究分担者

西條 英人 (Saijo Hideto)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：80372390

### (3) 研究分担者

星 和人 (Hoshi Kazuto)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：30344451

### (4) 研究分担者

藤原 夕子 (Fujihara Yuko)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：50466744

### (5) 研究分担者

菊池 正紀 (Kikuchi Masanori)  
独立行政法人・物質材料機構・リーダー  
研究者番号：00354267