

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：17102
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：2365902
研究課題名（和文） ティッシュエンジニアリングの三要素から見た補綴前処置としての テーラーメイド骨再生
研究課題名（英文） Tailor-made bone regeneration as a pre-prosthetic treatment based on the concept of tissue engineering triad
研究代表者 鮎川 保則（AYUKAWA YASUNORI） 九州大学・大学病院・講師 研究者番号：50304697

研究成果の概要（和文）：

ティッシュエンジニアリングの三要素においては、細胞、活性物質、足場物質・担体の三者の併存が必須とされている。この視点から骨再生を見た場合、増生したい部位において供給すべき要素は常に同一とは限らないと考えられることから、本研究を企画した。その結果、骨芽細胞分化促進因子を投与すると石灰化度が高い骨の新生が観察され、同部に骨芽細胞増殖促進因子を投与しても新生骨が同量形成されたが、石灰化度はBMP-2の場合より低いことが明らかになった。また、骨形成促進因子を投与するとSmadシグナリングパスウェイの活性化が見られた。

研究成果の概要（英文）：

According to the principle of tissue engineering triad, cells, bioactive molecules, and scaffold are thought to be essential for regeneration. From this point, it is supposed that not every site expected to augment bone tissue requires same element.

From the results of our experiments, the local application of both osteoblast-differentiation factor and osteoblast-proliferation factor could induce bone formation. But the bone induced by the former represented more mineralized bone than that induced by the latter. In addition, osteoblast-differentiation factor stimulated the Smad-signaling pathway in the osteoblast-like cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：歯科補綴学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：骨再生、テーラーメイド医療、ティッシュエンジニアリング、補綴前処置

1. 研究開始当初の背景
補綴領域では、より高い審美性を有したポン

ティックの作製、安定した義歯、インプラントの初期固定や長期予後など、補綴治療のす

べてが歯槽骨・顎骨と非常に強く関連している。現在のところ骨増生は、骨を増加させたい部位には自家骨をはじめとする何らかの移植材を応用するしか方法はなく、何を移植するかについては明確な基準はない。骨誘導物質に関しては今後の発展が待たれる状態である。この状況は過去20年以上変化がないように感じられるが、これまでと異なったアプローチで問題を捕らえない限り、この先も変化がないのではないだろうか？近年これらの研究はさらに発展しているが、①：新しい骨移植材、②：新しい骨誘導物質、③：新しい手術法、④：①～③の組み合わせのどれかに大別可能である。これらの研究は、上記のような現在の状況を前進させる候補を提供できても、実際に前進させることはできないと思われる。

2. 研究の目的

本研究では、骨再生に対する新たなアプローチを提唱する。ティッシュエンジニアリングの三要素においては、細胞、活性物質、足場物質・担体の三者の併存が必須とされている。この視点から骨再生を見た場合、増生したい部位において供給すべき要素は常に同一とは限らないと考えられる。たとえば、細胞が少ない部位に骨誘導物質を投与しても効果は期待できない。また、骨再生に先立って血管の新生が重要であることは論を待たないが、血管組織が少ない部位には血管誘導能が高い生体活性物質を用いる、あるいは大幅なスペースメイキングが必要な状況においては、細胞が侵入し定着するための効果的な足場物質を応用するなど、いわゆる部位特性に応じたテーラーメイドアプローチが必要であると考えられる。本研究において得られた結果は、実際の臨床の場においてティッシュエンジニアリングの三要素のどの要素を供給すればよいかについての重要な示唆となる。そのことにより、例えばあえてドナーサイトを作製して自家骨を採取する必要がなく、人工骨補填材の応用で十分にもかかわらず無駄に患者に侵襲を加えたり、細胞成分がほとんどない箇所細胞の分化促進因子をくわえたりといった、いわゆる「効果が薄い治療」を避けることができる。このことは、これまでこの領域で行われてきた骨再生の基礎研究の蓄積を臨床にフィードバックし、役立てる点でも大きな役割を有していると考えられる。また、前述のようにこのようなアプローチはこれまで皆無であり、非常に独創的な研究であると考えた。

3. 研究の方法

<臨床における骨再生を要する状況のモデル化>
臨床において骨再生が必要とされる状況は

多数あるが、それらは常に同一の環境ではなく、種々の部位特性を有していると考えられる。つまり、

- ① 血管はあるが骨の細胞やその前駆細胞の数が少ない
 - ② 骨の細胞やその前駆細胞および血管は存在するが、骨基質を分泌する分化状態にない
 - ③ 血管が少なく、十分な数の細胞の分化増殖を栄養できない
 - ④ 細胞の足場が少なく、細胞が骨再生部位に広がるのに時間を要する
 - ⑤ ①～④の複合
- のような状況が考えられる。それぞれを実際の臨床に当てはめてみると、

- ① 脂肪髄となった骨髓腔、加齢
 - ② 抜歯後長期間経過した歯槽骨上の骨膜の細胞
 - ③ インプラント治療における、いわゆるタイプIの骨
 - ④ 嚢胞摘出後の骨
- などが当てはまると考えられる。ここではこれらのモデルをラットにおいて作成する。実際には、

1. 老齢ラットや老化促進マウス (SAMマウス) の骨
 2. 頭蓋骨を被覆する骨膜
 3. 頭蓋骨 (下図のようにラット頭蓋骨には骨髓腔がほとんどない：下図)
 4. 頭蓋骨に形成したクリティカルサイズディフェクト
- がモデルとして考えられる。

本実験では、モデル1～4が実際に①～④の状態を反映しているかどうかについて調査する。具体的には各モデルの組織標本を作製し、細胞数およびオステオカルシンを指標とした分化度によりスクリーニングを行う。

<各モデルにおいて必要な要素の適用による骨形成実験>

前述の①～④について、ティッシュエンジニアリングの三要素のうち不足している要素の適用により、十分な骨形成が可能であるか検討する。つまり、

- ① 骨の細胞やその前駆細胞の数が少ない→細胞増殖因子の投与
- ② 骨基質を分泌する分化状態にない→細胞分化因子の投与
- ③ 血管が少ない→血管誘導能を有する因子の投与
- ④ 細胞の足場が少ない→骨芽細胞の足場となる物質の応用

となる。具体的には、細胞増殖因子としては、既に火傷の治療促進剤として臨床応用されており、骨再生にも臨床研究がすすんでいるbFGFを用いる。骨芽細胞の分化促進因子としてはスタチン系薬剤を用いる。ここでは本来

BMP-2 がスタンダードであるが、成長因子が高価であるため、臨床への応用を考えた場合安全性が高く安価な材料が好ましいことと、スタチン系薬剤の骨誘導に対する効果に関しては我々に多くの蓄積があることより選択した。血管誘導能を有する因子としては、VEGF を用いる。足場物質としては、市販のリン酸カルシウム系骨補填材の中から選択して用いる。これは生体由来材料より安全かつ安価であり、かつ骨芽細胞への接着能を有しているためである。実際の実験では、例えば上記①に対して細胞分化因子を投与する、あるいは②に対して血管誘導因子を投与するなど、適切でない投与方法を行い、比較する。

<種々の状況における骨再生メカニズムの検討>

前述と同様のモデル実験を改めて行い、RT-PCR Array 法 (RT² Profiler™ PCR Array System osteogenesis kit (Qiagen, USA)) を用いて、骨形成/吸収に関わる遺伝子の発現、あるいはターゲットとした因子の発現 (例えば増殖因子を投与した場合、増殖に係わる遺伝子が生体内・局所で実際に促進されているか) を網羅的に検討する。

4. 研究成果

<臨床における骨再生を要する状況のモデル化>

1. 抜歯後長期間経過した歯槽骨上の骨膜の細胞、2. インプラント治療における、いわゆるタイプ I の骨、3. 嚢胞摘出後の骨をモデル化するため、頭蓋骨を用いて、それぞれ

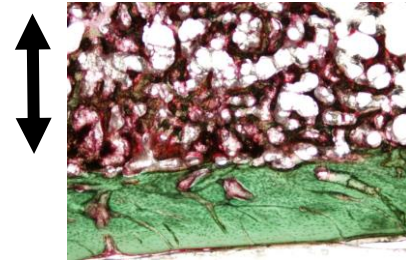
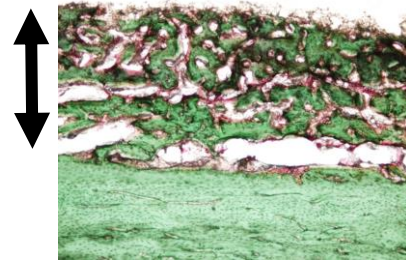
- i. 頭蓋骨を被覆する骨膜
- ii. 頭蓋骨 (ラット頭蓋骨には骨髓腔がほとんどない)
- iii. 頭蓋骨に形成したクリティカルサイズディフェクト

が上記の 1-3 と対応するかについて組織学的検討を行った。その結果、1-3 は i-iii としてモデル化可能な組織学的類似性を有していることが示唆された。次に、実験 2 として各モデルにおいて必要な要素の適用による骨形成実験に着手した。具体的には、分化度合いが低い状態の未分化間葉細胞に BMP-2 あるいはスタチンを投与することにより、分化を促進させることができた。スタチンが未分化間葉細胞を骨芽細胞に分化させるための至適濃度は 10-100nM であった。

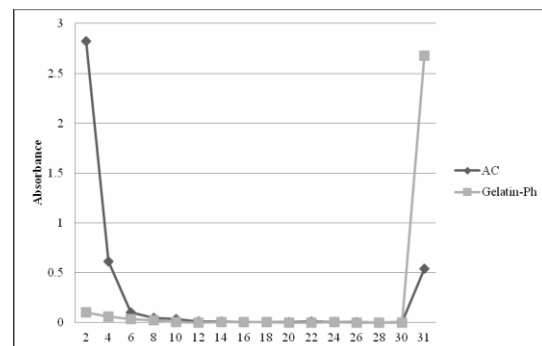
<各モデルにおいて必要な要素の適用による骨形成実験>

まず、ラット頭蓋骨 (海綿骨をほとんど有しない、いわゆるインプラントロジーにおけるタイプ I の骨) に骨芽細胞の分化を促進する因子 (BMP-2) を局所投与すると、石灰化度が高い骨の新生が観察された。一方、同部

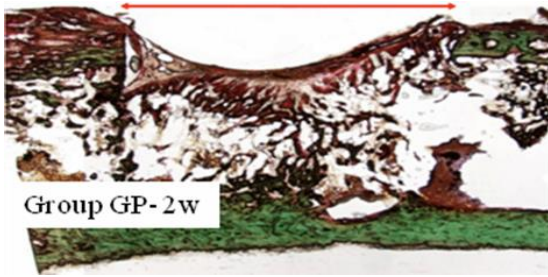
に骨芽細胞の増殖を促進する因子 (PDGF-BB) を局所投与しても新生骨が同じような体積で形成されたが、新生骨の石灰化度は BMP-2 を投与した場合に比較して低かった。



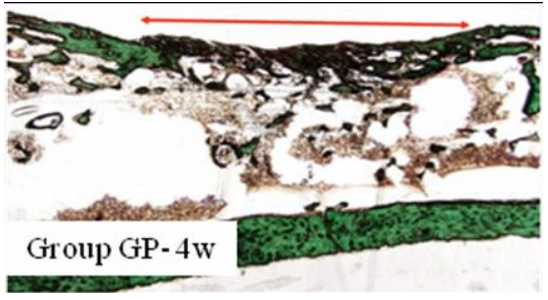
矢印：新生骨。細胞分化促進因子で形成した新生骨は高石灰化を示すが (上)、細胞増殖促進因子で形成した新生骨は、石灰化の度合いが低い (下)。



上記実験で生体活性因子局所投与に用いた、新規開発のゼラチンハイドロゲルキャリアからの PDGF-BB 徐放プロファイル。アテロコラーゲン (AC) をキャリアとして用いた場合は初期に PDGF-BB のほとんどが放出され徐放効果は期待できない。一方新規キャリア (Gelatin-Ph) の場合はゼラチンを分解可能な酵素の非存在化では PDGF-BB はほとんど放出されず、系にパペインを投与すると一気に放出されることより (31 日目)、Gelatin-Ph が PDGF-BB を保持し、生体内のタンパク分解酵素が Gelatin-Ph を分解するに従って PDGF-BB が徐放されることが示唆された。

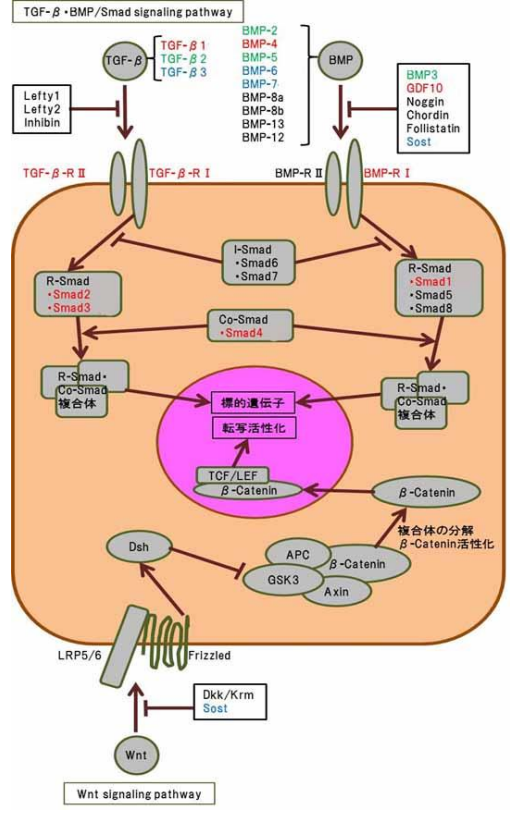


ラット脛骨の人工的に作製した骨欠損に前記キャリアを用いて PDGF-BB を投与し、2 週間後の組織像。新生骨は多量に形成されているが、形成された新生骨の石灰化度は劣ることが推察される。



ラット脛骨の人工的に作製した骨欠損に前記キャリアを用いて PDGF-BB を投与し、4 週間後の組織像。多量に形成された新生骨はその量が減少し、緻密化している。局所投与した PDGF-BB の効果が低下していることが推察される。緻密化した骨の染色度より、新生骨は未だ石灰化の程度が低いと考えられる。

<種々の状況における骨再生メカニズムの検討>
 上記のそれぞれの状況において網羅的解析手法を用いて、骨形成/吸収に関わる遺伝子の発現、あるいはターゲットとした因子の発現（例えば増殖因子を投与した場合、増殖に係わる遺伝子が生体内・局所で実際に促進されているか）を検討することとし、骨形成過程におけるシグナリングパスウェイの解析を行ったところ、Smad シグナリングパスウェイの働きが骨形成に関与しているというこれまでの報告を裏付けるデータが得られた。



Smad シグナリングパスウェイ。スタチン系薬剤の投与により BMP-2 が放出されるため、BMP-2 シグナリングパスウェイを構成する Smad1, 5, 8 のリン酸化が起こる。

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 1 件)
 Kondo D, Ogino Y, Ayukaya Y, Sakai S, Kawakami K, Koyano K. Bone regeneration of rat tibia defects with enzymatically hydrogelation of gelatin derivative and recombinant human platelet-derived growth factor-BB complex, Int J Oral Maxillofac Implants, 2013, in press.

〔学会発表〕(計1件)

近藤大介、荻野洋一郎、鮎川保則、古谷野潔。
酵素硬化型ゼラチン-血小板由来増殖因子
複合体のインジェクション投与は低侵襲な
骨増生に有効である。 第41回日本口腔イ
ンプラント学会学術大会, 2011.9, 名古屋市。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鮎川 保則 (AYUKAWA YASUNORI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：50304697

(2) 研究分担者

古谷野 潔 (KOYANO KIYOSHI)

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号：50195872