

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592956

研究課題名(和文) 器官移植再生医療に向けた移植母床再生のオン・デマンド制御

研究課題名(英文) On demand regulation of tissue regenerative environment at the recipient site of transplantation therapy and dental implant

研究代表者

野崎 剛徳 (Nozaki, Takenori)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30263304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、移植医療やインプラント治療に必要な移植母床の良好な再生を目的として実施された。まずビーグル犬に裂開型骨欠損モデルおよび高度水平性骨欠損モデルを作成し、高強度コラーゲンを基材に用い FGF-2 を含浸した移植材を移植したところ、裂開型欠損ではやや良好な再生が得られたが、高度水平性欠損モデルでは移植片の滑脱が生じ、良好な治癒が得られなかった。次に、初期固定が得られない条件でのインプラント埋入を想定したモデルを作成し、埋入時に FGF-2 を投与したところ、投与群では対照群に比べ早期から骨新生が生じ、オッセオインテグレーションの早期獲得による安定性の向上が得られることが示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to provide good tissue regeneration to the recipient site of transplantation therapy and dental implant by on-demand regulation of regenerative environment. At the first, cleft model or severe horizontal bone defect model was prepared in beagle dogs. Grafting material made from high strength collagen was formed to fit to the bone defect. Subsequently, it was soaked to the solution containing FGF-2, and was placed into the defect. As the result, the grafting material provided good healing in cleft model, whereas it had fallen out from the defect due to the problem on strength in the horizontal defect model. Then, the dental implant was placed with/without FGF-2 application. As the result, it was revealed that FGF-2 promotes osteogenesis, and enhances the osseointegration even in the low primary stability condition. These results suggest that FGF-2 is a signaling molecule suitable for on-demand regulation to promote tissue regeneration.

研究分野：歯周病学

キーワード：組織再生 FGF-2 インプラント

1. 研究開始当初の背景

再生医学研究は急速な進歩を遂げ、臓器・器官の再生をも視野に入れた研究が行われており、近年では人為的に作成した再生歯胚から再生歯ユニットを作成し、これを移植することで機能的な歯と歯周組織を再生する可能性が示唆されるまでに至っている。しかし、現実には顎口腔領域において移植やインプラント治療のために組織再生が必要となるケースを鑑みると、レシピエント側に広範な実質欠損を生じている場合が多いことから、良好な環境で移植再生治療を行うためには、移植母床の三次元的な組織再生が必要となる。これまで幹細胞や歯周組織由来細胞を単独で、もしくは足場材との組み合わせで組織再生に用いる試みが行われているが、三次元的な組織再生はほとんど得られないことが多い。このように組織再生の確実性が向上しない一因として、再生に必要な微小環境の構築が困難であることがあげられる。このような背景から、移植再生医療を臨床応用可能なものにするためには、安定的な母床組織の再生に向けて移植医療の臨床的手技を簡便化するとともに、再生プロセスの制御を行うことが肝要であるとの発想に至り、再生医療に向けた移植母床再生のオン・デマンド制御を試みることにした。

2. 研究の目的

本研究では、移植器官やインプラントを收容する母床の再生に必要な細胞群、足場材、シグナル分子を生体外で構成した移植材を作製するとともに、移植後の組織再生プロセスをオン・デマンド制御することで、確実に安全な移植母床再生を実現することを目的として研究を行う。ただし、系の単純化を図る必要から器官移植は行わず、インプラントのオンセオインテグレーション獲得をもって、オン・デマンド制御の効果を評価することとする。

3. 研究の方法

上記の研究目的を達成するために、以下の研究を実施した。

1) 三次元的形態を備えた足場材とシグナル分子の相互効果の検討

ビーグル犬に高度水平性組織欠損モデルおよび、裂開型骨欠損モデルを作成した。そしてシグナル分子の徐放と生体内吸収速度調節を行うために、生体同様の線維構造や密度を持ちながら細胞が浸潤可能な隙間を有する高強度コラーゲンブロックを用いて、欠損形態に適合する形状の移植足場材を作成した。この足場材を 0.3% の FGF-2 を含む溶液に含浸した後に欠損部に埋入し、術後 6 週で μ CT を撮影して硬組織形成量を測定し、足場材とシグナル分子の相互効果を検討した。

2) 移植した細胞によって放出されるシグナル分子が、歯周組織構成細胞の分化および硬組織形成に与える影響の検討

本研究では幹細胞として脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞 (ADMPC) の利用を考えていることから、ADMPC が産生する液性因子に焦点をあて、これらの因子が培養ヒト歯根膜細胞 (HPDL) に及ぼす影響について解析を行った。まず皮下組織より脂肪組織を採取して ADMPC を単離した後、10%FCS 含有 D-MEM にて培養を行って培養上清 (ADMPC-CM) を回収し、この上清中に含まれる液性因子を Human Growth Factor Array[®] を用いて検出した。さらに ADMPC-CM 存在下で、HPDL を石灰化誘導培地にて培養し、硬組織関連遺伝子の発現とアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を検出し、移植した細胞から放出されるシグナル分子が、歯周組織構成細胞の分化および硬組織形成に与える影響を検討した。

3) インプラントのオンセオインテグレーション獲得に対する、組織再生プロセスのオン・デマンド制御の効果の検討

実験に先立ってビーグル犬の下顎両側第 3、第 4 前臼歯を抜歯し、約 3 ヶ月後に抜歯窩が治癒して骨レベルが低下したことを確認して、以下の実験を行った。まず計測用陥凹構造を備えた長さ 6mm のカスタムフィックスチャに適合する埋入窩を片側あたり 2 カ所に形成し、さらにテーパードリルを用いて同埋入窩の皮質骨部を 4mm の深さまでフレア状に拡大し、初期固定不良モデルを作成した。そしてその一侧に 0.3% FGF-2 (HPC 基剤) を、また反対側には基材のみを注入した後、フィックスチャを静置埋入した。実験 1 では、フィックスチャは完全埋入とし、埋入 4 週間以降にオステル ISQ を用いて経時的にインプラント安定指数 (ISQ 値) を計測して、安定性を評価した。一方、実験 2 では埋入時にフィックスチャに ISQ 値測定用ペグを連結し (即時荷重に相当)、経時的に ISQ 値を計測して安定性を評価した。いずれの実験においても術後 4 週、8 週、16 週のいずれかの時点で μ CT 撮影および組織学的検討を行って、インプラントの骨性結合獲得に対する組織再生プロセスのオン・デマンド制御の効果を検討した。

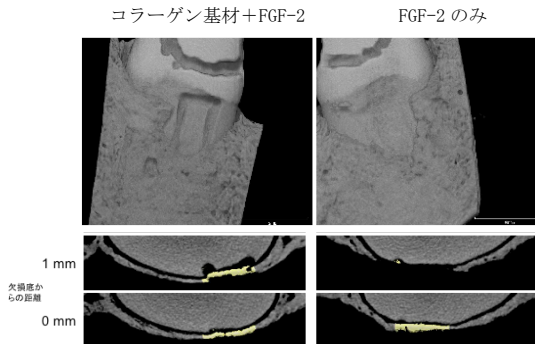
4. 研究成果

1) 三次元的形態を備えた足場材とシグナル分子の相互効果の検討

シグナル分子の徐放と生体内吸収速度調節を行うために、高強度コラーゲンを基材として用い FGF-2 を含浸した移植材を作成し、ビーグル犬に作成した高度水平性組織欠損モデルおよび、裂開モデルに埋入した。その結果、高度水平性組織欠損モデルでは、埋入後 1 週間で全例に移植材の滑脱が生じ、組織の良好な治癒は得られなかった。その理由として、イヌは咀嚼に際して頬粘膜を強く緊張させるが、この圧によって埋入後に膨潤・軟化した移植材に変形が生じたものと推測された。一方、開窓モデルにおいては、マイクロ CT による再生骨量解析の結果、統計学的

有意差は得られなかったものの、移植材使用群でやや良好な組織再生が得られる傾向が示された (図1)。

図1：裂開状骨欠損における足場材とシグナル分子の相互効果



2) 移植した細胞によって放出されるシグナル分子が、歯周組織構成細胞の分化および硬組織形成に与える影響の検討

ADMPC を培養した際の培養上清 (ADMPC-CM) に含まれる液性因子を Array にて解析した結果、ADMPC は複数の細胞増殖因子を分泌することが明らかとなった。また、HPDL を ADMPC-CM 存在下で培養すると、硬組織形成に関与する遺伝子の有意な発現上昇と ALP 活性の上昇を認めた。さらに、ADMPC が分泌する因子の一つとして検出された IGFBP6 の発現を siRNA にて抑制した結果、ALP 活性上昇が有意に低下した。これらの結果より、ADMPC に由来する液性因子が HPDL の硬組織形成細胞への分化を促進的に制御し、その効果に IGFBP が関与していることが示唆された。すなわち、ADMPC を歯周組織欠損部位に移植することにより、同細胞が歯周組織構成細胞に分化することで直接的に組織再生を促進するのみならず、その再生過程において種々の液性因子を産生することにより、歯周組織再生の過程を活性化しているものと推察された。

3) インプラントのオッセオインテグレーション獲得に対する、組織再生プロセスのオン・デマンド制御の効果の検討 [実験1]

FGF-2 投与群は全例でオッセオインテグレーションが獲得されたが、対照群では6例中1例で、埋入したインプラントの早期脱落が生じた。このインプラントの脱落が生じた例では、ISQ 値が埋入後4週までは上昇したが、その後6週にかけて急激に低下し、その後に脱落した。この両群の ISQ 値の変動を比較すると、FGF-2 投与群では ISQ 値が埋入後4週まで急速に上昇し、その後も12週まで緩徐に上昇を続けたのに対し、対照群では ISQ 値が4週までは上昇したものの、その後の上昇はみられなかった。また両群の ISQ 値を比較すると、埋入後4週以降は FGF-2 投与群が対

照群よりも常にやや高い傾向を示し、8週以降は FGF-2 投与群が有意に高い値を示した。さらに、16週経過後に撮影したマイクロCTの中央断面画像から歯槽骨とインプラントの接する長さ (結合面長) を計測して ISQ 値との関係を調べたところ、両者の間には相関関係が認められた ($R^2=0.73$)。またマイクロCTの中央断面画像を用いて、埋入深さに対する骨吸収量の比率を算出し、これを骨吸収度として両群間で比較した結果、FGF-2 投与群では対照群に比べて骨吸収度が小さい傾向が認められた。この結果から、FGF-2 が埋入後早期にフィックスチャ周囲の骨新生を促進し、骨性結合獲得量の増大に有効に作用することが示唆された。

図2：インプラント埋入モデルにおける FGF-2投与時のISQ値の経時変化

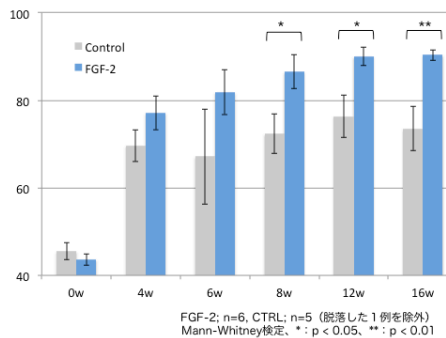
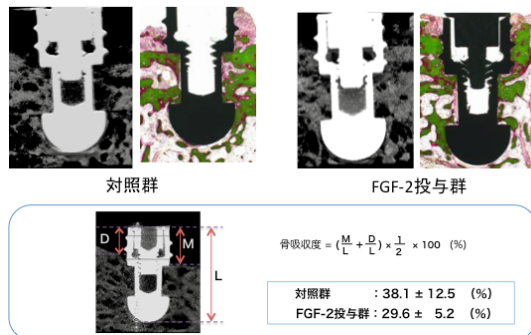


図3：FGF-2投与群と対照群の骨吸収度の比較

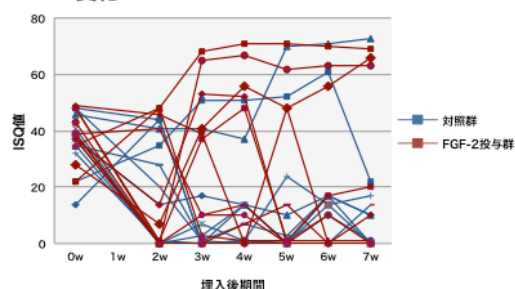


[実験2]

埋入時にフィックスチャに ISQ 値測定用ペグを連結した即時負荷モデルで骨性結合が得られた例数は、対照群が1例 (8.3%)、FGF-2 投与群が3例 (25%) であった。また、そのほぼ全例において、ISQ 値は埋入後4週までのいずれかの時点で、埋入直後よりも低下した。そして骨性結合が得られた例では、埋入後2週～5週までの間に、ISQ 値の急激な上昇がみられたが、骨性結合が得られなかった例の多くでは、埋入後3週までに、急激な ISQ 値の低下が認められた。また組織学的観察を行った結果、骨性結合が得られなかった例では、骨とフィックスチャの間隙に軟組織の介在が確認された。この結果から、埋入時に初期固定力が不十分と判断されたケースにおいては、フィックスチャへの即時負荷を回避

して FGF-2 の投与を行うことで、埋入後早期から骨新生が促進され、インプラントの早期安定性が向上することが示唆された。

図4：即時負荷モデルにおけるISQ値の経時的变化



これらの結果から、結論として、初期固定力が不十分なインプラントに対しては、即時負荷を回避して FGF-2 を投与することで、オッセオインテグレーションの獲得が促進され、埋入後早期の安定性が向上することが示唆された。

すなわち本研究の結果として、組織再生プロセスの制御因子として FGF-2 を応用することで、より良好な移植母床再生が得られることが示唆された。

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)

[学会発表] (計3件)

① K Sawada, M Takedachi, M Ozasa, T Iwayama, T Nozaki, K Miki, M Iyama, S Yamamoto, C Morimoto, M Kitamura, S Murakami, Analysis of periodontal tissue regeneration by transplantation of the ADMPCs: 2nd Meeting of the International Association for Dental Research – Asia Pacific Region、2013年8月21日、Bangkok, Thailand (Plaza Athenee)

② 沢田啓吾、竹立匡秀、山本智美、森本千晶、小笹匡雄、野崎剛徳、北村正博、村上伸也、ADMPC由来液性因子のヒト歯根膜細胞へ及ぼす影響、第56回秋季日本歯周病学会学術大会、2013年9月22日、群馬県前橋市(前橋市民文化会館)

③ 野崎剛徳、田中利江、沢田啓吾、小笹匡

雄、三木康史、池上久仁子、阪下裕美、山本智美、宮内静香、北垣次郎太、山下元三、山田 聡、白石紀子、安齋 純、北村正博、村上伸也、初期固定力の不十分なインプラントに対する FGF-2 の安定性獲得促進効果、第57回秋季日本歯周病学会学術大会、2014年10月19日、兵庫県神戸市(神戸国際展示場)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野崎 剛徳 (NOZAKI TAKENORI)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：30263304

(2) 研究分担者

山田 聡 (YAMADA SATORU)

大阪大学・大学院歯学部附属病院・講師

研究者番号：40359849

山下 元三 (YAMASHITA MOTOZO)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：90524984

北垣 次郎太 (KITAGAKI JIROTA)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：90570292