

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792143

研究課題名(和文) bFGF・poly(P)・IP-CHA複合体を用いた新しい骨増生材料の創製

研究課題名(英文) Development of novel biomaterial using poly(P) and bFGF onto porous hydroxyl apatite

研究代表者

林 和彦 (Hayashi, Kazuhiko)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：90444687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：水平的骨増生などの骨再生が困難な部位では確実な骨増背は望めない。それゆえ骨形成を促進させるハイブリッド生体材料の開発が強く望まれ、骨分化誘導促進作用を有するポリリン酸と組織形成促進作用を持つbFGFをハイブリッドさせた新規人工骨の開発を行った。細胞実験において、ポリリン酸とbFGFの相互作用の確認および動物実験において、骨形成促進効果を確認した。これにより、骨形成を確実にする新規生体材料の開発を達成した。

研究成果の概要(英文)：In difficult situation of bone augmentation such as horizontal bone regeneration, development of newly hybridized biomaterials with bone formation promoting effective is demanded. we determined the optimum chain length of poly(P) binding to bFGF, we developed a composite of poly(P) and bFGF with IP-CHA as an innovative artificial bone for predictable bone regeneration. that in vitro study, poly(P) and bFGF promote osteoblast activities as interaction efforts. Also in vivo study, poly(P) and bFGF combined onto IP-CHA were established promoted bone formation.

研究分野：歯科医用工学・再生歯学

科研費の分科・細目：歯学，歯科医用工学・再生歯学

キーワード：bFGF 多孔性アパタイト ポリリン酸

1. 研究開始当初の背景

歯の喪失に対する補綴治療法として、インプラント補綴は広く認知され、その需要の高まりは増加傾向にある。良好なインプラント治療の達成には、埋入される部位の良好な骨量および骨質が必要となる。骨量が不足する場合、インプラントの骨支持が不良となることやフィクスチャーの露出による審美障害をきたす原因となり、有効な対処治療が必要となる。

骨量が不足する場合には骨移植材を用いた骨増生法を適応することで骨欠損部の骨再生を行う。現在、自家骨が最も優れた移植材として認知されているものの、その適応には供給能の限度ならび供給床への外科的侵襲などの問題が残されており、それに代替する生体材料の開発、適応が行われている。

骨の再生は、周囲骨および血管からの間葉系幹細胞の凝集、増殖が起こり、骨形成タンパク(BMP)などによる骨分化誘導により骨芽細胞へ分化されることにより骨組織の形成が行われる。この骨形成のメカニズムは、幹細胞の存在や成長因子および栄養供給が重要であり、それらは主に骨組織の骨髓や周囲血管からの供給により支持される。しかしながら、大規模な骨欠損や水平性の骨吸収に対する骨増生では移植床からの血管栄養供給が乏しくなることから、生体材料を用いた確実な骨増生の達成はいまだ困難であり、この問題を解決するため、成長因子などを応用したハイブリッド生体材料の開発が望まれる。

繊維芽細胞成長因子(bFGF)は細胞増殖作用および血管新生促進効果を有しており、創傷の治癒起点に重要な役割を担っている。

一方、生体高分子であるポリリン酸はその鎖長構造により様々な生理活性効果を示すことが報告されており、その鎖長構造を60前後とした中鎖型ポリリン酸は、bFGF受容体に接合することによりbFGFの作用を安定化させその効果を増強させることが知られている。また骨芽細胞にポリリン酸を作用させることでその石灰化が促進される効果も実証されている。

そこで、bFGFと中鎖型ポリリン酸を組み合わせることで相互活性作用が期待できるのではないかと考え、骨伝導能に優れた連通多孔性ハイドロキシアパタイトに導入することで、優れた骨形成促進効果を持つハイブリッド生体材料の開発に着想した。

2. 研究の目的

bFGFとポリリン酸を組み合わせたハイブリッド人工骨を開発し、*in vitro*において骨芽細胞用細胞への増殖および骨分化誘導に及ぼすメカニズムを明らかとし、*in vivo*においてその骨形成促進効果を明らかとすることで、新規ハイブリッド生体材料としての有効性を明らかとすることとした。

3. 研究の方法

本研究計画では平成24年度は細胞実験による検証を行い、平成25年度では動物実験による検証を行い、これらを統括し研究課題の有効性を明らかとした。

平成24年度；細胞実験

評価に用いる細胞はマウス骨芽細胞(MC3T3-E1細胞)を用いた。添加成長因子として中鎖型ポリリン酸(平均鎖長60)、bFGF-2を準備した。これらにより細胞増殖および骨分化誘導促進効果の評価を行った。

培養培地は、 α -MEM培地にウシ胎児血清10%、抗生剤(ストレプトマイシン)の基礎培地内に規定に従いアスコルビン酸、グリセロール、デキサメタゾンを追加した骨分化誘導培地を準備した。培養条件は下記の通りに設定した。

実験条件

ポリリン酸群；ポリリン酸 10 μ g/ml 添加
bFGF群；bFGF 30 μ g/ml 添加
ポリリン酸+bFGF群；それぞれ添加
control群；リン酸緩衝液 10 μ g/ml 添加

分離した細胞を各デッシュに播種(5000/ml)し、3日毎にPBSによる洗浄(3times)を行い、培地交換の際に各条件の成長因子の添加を行った。細胞増殖の測定はMTT分析法にて1, 3, 5, 7日培養期間において、細胞増殖促進効果を評価した。骨分化誘導の測定は3, 7, 14日培養期間においてアルカリフォスファターゼ活性測定ならび21, 28日培養期間においてアリザリンレッドS染色にて石灰化度の評価を行った。

以上の方法により *in vitro* でのポリリン酸とbFGFの骨芽細胞に及ぼす細胞増殖ならび骨分化誘導・石灰化促進効果の有効性ならびメカニズムを検証した。

平成25年度；動物実験

実験動物には雄性ニュージージーランドホワイトラビット(17週齢)を用いた。担体には円柱状連通多孔性ハイドロキシアパタイト(IP-CHA；気孔率75%、焼結温度1200 $^{\circ}$ C、圧縮強度12Mpa)をカスタムメイドにて準備した。この円柱状IP-CHAをポリリン酸溶液およびbFGF溶液に単独浸漬および混合浸漬させることで成長因子を含浸させたハイブリッド生体材料を準備した。埋入条件は各条件の溶液に浸漬させ下記のとおりとした。

ポリリン酸群(10 μ g/ml溶液に浸漬)
bFGF群(30 μ g/ml溶液に浸漬)
bFGF+ポリリン酸群
IP-CHA群(control, 生理食塩水に浸漬)

大腿骨での検討；

全身麻酔化においてラビット大腿骨内に骨窩(直径：3mm、深さ5mm)を形成し、準備した各移植材をそれぞれ埋入した。埋入後は吸収性糸にて筋膜および粘膜での縫合を行い、感染予防のため抗菌剤を筋肉注射にて投

与した。埋入から2週後に動物から移植材を含む骨ブロックを採取し、通法にしたがい脱灰薄切標本を製作し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。組織学的評価として光学顕微鏡による観察および組織形態計測評価を行った。組織学的評価は下記の算定式により求めた。

新生骨骨面積率 = IP-CHA 気孔内骨組織面積 / 気孔内総組織面積

頭頂骨での検討；

埋入条件は下記のとおりとした。

ポリリン酸群 (10 μ g/ml 溶液に浸漬)

bFGF 群 (30 μ g/ml 溶液に浸漬)

bFGF+ポリリン酸群

IP-CHA 群 (control, 生理食塩水に浸漬)

全身麻酔化においてラット頭頂骨を露出させ骨窩 (直径: 3mm, 深さ 1mm) を形成し、準備した各移植材を設置 (アンレータイプ) した。設置時、血管栄養の確保のため移植床底面位骨線骨を2カ所行った。その後吸収性系にて粘膜での縫合を行い、感染予防のため抗菌剤を筋肉注射にて投与した。観察期間中は移植材料の動揺が行わないように留意した。埋入から6週後に動物から移植材を含む骨ブロックを採取し、通法にしたがい脱灰薄切標本を製作し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。組織学的評価として光学顕微鏡による観察を行った。

4. 研究成果

細胞実験結果：

細胞増殖試験の結果では bFGF 群および bFGF + ポリリン酸群は有意に高い細胞増殖促進効果を示した。骨分化誘導試験の結果では ALP 活性およびアリザリンレッド S 染色において、ポリリン酸群および bFGF + ポリリン酸群は有意に高い値を示し、濃染した石灰化を確認した。これらの結果は、bFGF 単独では細胞増殖促進効果、ポリリン酸単独では骨分化誘導促進効果を示し、これらの相互作用を期待しポリリン酸と bFGF を併用させることで細胞増殖促進機能ならびに骨分化誘導促進機能を付与させるメカニズムが明らかとなった。以上より、ポリリン酸と bFGF を併用することで、細胞増殖促進効果ならびに骨分化誘導促進効果が骨形成部で達成されることにより、骨欠損部での骨再生が確実なものとなること示唆された。

動物実験の結果；

大腿骨での検討

組織所見において bFGF 群、ポリリン酸群および bFGF+ポリリン酸群の気孔内は多くの新生骨組織の形成が認められた (図 1)。骨面積率の測定結果では bFGF 群、ポリリン酸群が bFGF 群、ポリリン酸群および control 群に対して有意に高い値を示した ($P < 0.05$, 図 2)

頭頂骨での検討

FGF+ポリリン酸群の気孔内は底部から上部に向けての新生骨組織の形成が認められた。一方、bFGF 群およびポリリン酸群では骨形成は下方部にのみ認められ、水平性骨増生は不確実であった。IP-CHA 群の気孔内は繊維性結合組織で占められ骨形成は認められなかった。

以上より、骨再生における bFGF とポリリン酸の相互活性作用を明らかとし (図 3)、骨形成が不確実な水平的骨増生の症例において、これらを用いたハイブリッド生体材料を適応することで、血管新生、細胞増殖および分化誘導の促進効果が達成でき予知性の高い骨形成を可能とする新規人工骨の開発が行えることが明らかとなった。

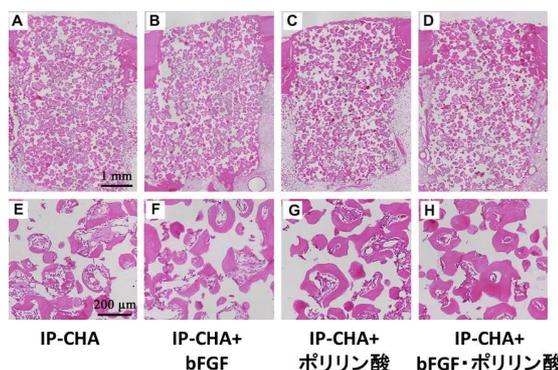


図 1 組織学的観察

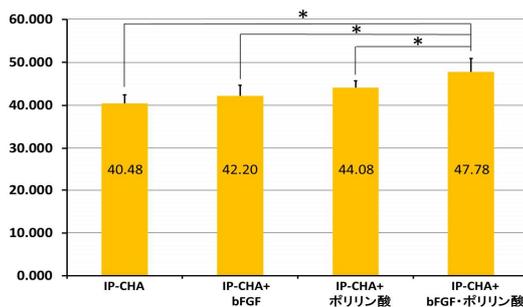


図 2 新生骨骨面積率

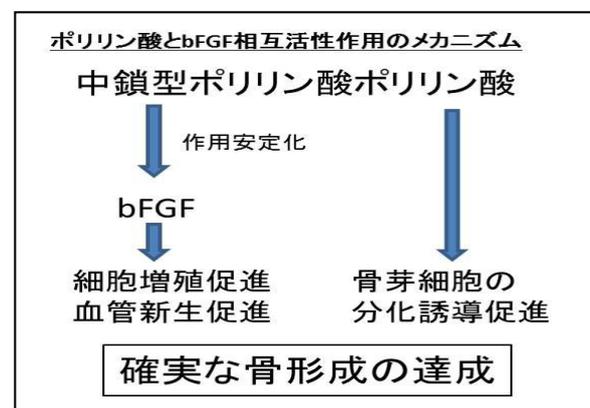


図 3 明らかとなった骨再生に及ぼすポリリン酸と bFGF の相互活性作用

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Morita K, Doi K, Oue H, Kajihara S, Hayashi K, Akagawa Y.

Br J Oral Maxillofac Surg. 2013 Sep;51(6):550-4.doi:10.1016/j.bjoms.2012.08.009.

Influence of formalin fixation on the implant stability quotient and mechanical characteristics of bone.

〔学会発表〕(計 1件)

Morita K, Doi k, Oue H, Kajihara S, Makihara Y, Hayashi K, Harada K, Matsuura A, Kubo T, Akagawa Y.

Influence of formalin fixation on implant stability quotient and bone mechanical characteristics.

The 20th meeting of European Association For Osseointegration, 2012,10,11. (Copenhagen, Denmark)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

林 和彦 (Hayashi Kazuhiko)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：90444687