

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463056

研究課題名(和文)血管誘導法による垂直方向への骨再生の効果

研究課題名(英文)The effect of angiogenesis induction on vertical bone augmentation

研究代表者

佐藤 秀一 (SATO, Shuichi)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：50225942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨再生が困難な垂直方向への骨再生を効果的に行うために重要な血管新生を誘導・制御することを着目し、以下の検討を行った。

まず、FGF-2をラット内側性骨欠損に作用し、新生血管を誘導しマイクロCTで観察した。その結果、FGF-2は早期に血管新生を促進させ骨再生を誘導した。つぎに、ラットGBAモデルを用いて垂直方向の骨再生時の血管新生を観察したところ、血管新生は、脳動脈から分岐し骨髄穿通部に達し、そこから骨外向に分布領域が拡大していった。さらに、PDGFの垂直方向の骨再生について検討したところ、PDGFはラットに対する垂直方向の骨再生に効果的であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of these studies were investigated the effect of angiogenesis induction on vertical bone augmentation. First study showed basic fibroblast growth factor(FGF-2) promoted angiogenesis earlier on rat non-critical and critical bone defects. The second study evaluated angiogenesis and bone augmentation with rat calvaria guided bone augmentation (GBA) model using micro-CT. The results showed angiogenesis began at sites from brain arteries and gradually increased at bone marrow penetration to vertical direction. The bone augmentation enhanced angiogenesis in rat calvaria GBA model. The third study investigated effect of platelet-derived growth factor (PDGF) on rat calvarial GBA model. The results showed 0.03% PDGF in collagen sponge and chitosan sponge enhanced vertical bone formation on rat calvarium.

研究分野：再生治療

キーワード：血管新生 骨再生 垂直方向 ラット

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病で失われた顎骨を再生させるためには細胞、足場および増殖因子の適切な作用が必要である。研究者は、再生困難な垂直方向の骨再生を検討することを目的とし、動物モデルを用いて、各種再生因子の作用について検討してきた。しかし、常に十分な量と質の再生骨の獲得は困難であった。申請者は再生組織に栄養や再生因子を供給している新生血管に着目し、骨再生との関係について検討した。その結果、内側性骨欠損の自然閉鎖可能な骨欠損では骨膜や既存骨から新生してきた血管が伸展し、互いに癒合し欠損部が完全に新生血管で完全に覆われると骨欠損が閉鎖した。しかし、自然閉鎖不可能な骨欠損部では新生血管の伸展と吻合が不十分となり欠損部が閉鎖しなかった。そこで、新生血管を誘導・制御に着目し、骨再生が困難な垂直方向の骨再生時の新生血管の動態観察および新生血管誘導作用の高い2つの成長因子の影響について検討した。

## 2. 研究の目的

垂直方向の骨再生における新生血管の誘導・制御について検討することを目的にラット骨欠損および guided bone augmentation (GBA) モデルを用いて、以下の検討を行った。

- (1)内側性骨欠損に対する FGF-2 の影響
- (2)垂直方向の骨再生における新生血管の動態
- (3)垂直方向の骨再生に対する PDGF の影響

## 3. 研究の方法

### (1) 実験材料

#### 実験動物

7 週齢の雄性 Fischer ラットを用いた。ラットは恒温恒湿の適切な環境下で飼育した。また、2 週間の予備飼育を行い、全身状態が健康であることを確認してから実験を行った。

### 造影剤

造影剤は、非イオン性造影剤であるイオパミドールを使用した。

### (2) ラット骨欠損および GBA モデルの作製 麻酔

ラット腹腔内に全身麻酔を施し、手術野の頭頂骨相当部を剃毛し、同部に局所麻酔を行った。

### 骨欠損の作製

矢状縫合に沿う切開を施し、筋層および骨膜を剥離した。左右の頭頂骨を露出させ、正中縫合を避けて、右側に直径 5.0 mm の臨界骨欠損と左側に直径 2.7 mm の非臨界骨欠損をトレファインバーで形成した。骨欠損部に 0.1 あるいは 0.3% の割合で FGF-2 を含浸させた吸収性コラーゲンスポンジ (absorbable collagen sponge; ACS) を設置し、骨再生および新生血管の観察を行った。

### GBA モデルの作製

骨欠損の作製と同様に矢状縫合に沿う切開を施し、筋層および骨膜を剥離した。左右の頭頂骨を露出させ、正中縫合を避けて、右側に直径 5.0 mm の溝を形成した。左側は、#2 のラウンドバーを使用し 7 カ所骨髄穿通した 7M 群、右側は直径 2.7 mm のトレファインバーを用いて中心部に 1 カ所骨髄穿通した 1S 群とした。その後、外周溝にプラスチックキャップを装着し 2 種類の GBA モデルを作製し、骨再生および新生血管の観察を行った

同様に、GBA モデルを用いて 0.01%、0.03% の PDGF 20  $\mu$ l を含浸させた ACS、対照群には生理食塩水 20  $\mu$ l を含浸させた ACS をそれぞれキャップ内へ填入し、骨再生および新生血管の観察を行った

### (3) マイクロ CT による撮影

ラットに全身麻酔を施し、0、7、14、21 および 28 日に実験動物用 3D マイクロ CT (マイクロ CT) を用いて骨再生および新生血管を観察した。

### (4) 新生血管の観察のための血管造影

施術後 7, 14, 21 および 28 日まで 1 週間に 1 回, ラットに全身麻酔を施した後, 腹腔内に局所麻酔を施し, 還流固定法に準じた方法により脱血した後, 10% 中性緩衝ホルマリン液を用いて全身を固定した。その後, 造影剤 20 ml を 2 ml/min の速度で自動注入器 (シリンジポンプ) で心臓から注入し, その後 4°C の冷暗所で 12 時間保管した。

#### (5) マイクロ CT 断層像の観察と解析

術後の骨再生と血管新生についての定量的評価を i-VIEW (モリタ) によって, 3 軸方向, とくに, 矢状方向と前頭方向の断層像を分析した。骨体積計測ソフト (北千住ラジスト歯科) を用いて, 術後の骨再生と血管新生についての定量的評価を行った。

定量的評価は血管造影前後の CT データ (差分) をもとに算出し, 骨再生量と血管新生量の割合を算出した。

#### (6) 組織標本の作製

術後 14 日および 28 日のイオパミドール造影はマイクロ CT 撮影後に, 周囲組織を含む頭頂部組織を採取し, 同固定液に 3 週間浸漬した。そして, Morse の脱灰液で 24 時間の脱灰を行った後に通法に従ってパラフィン包埋し, 矢状縫合に平行で厚さ約 5  $\mu$ m の切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色した。

組織形態計測は, 光学顕微鏡下で撮影した組織像を用いて, 新生骨様組織の占有率と新生骨様組織の高さ (%) とを求めた。

#### (7) 統計学的分析

骨再生率および血管占有率の比較には Mann-Whitney *U* 検定を用いてそれぞれ危険率 5% 未満を有意差として統計処理を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 内側性骨欠損に対する FGF-2 の影響

非臨界骨欠損部では, 新生血管が術後 7 日に, 新生骨様組織が術後 14 日に欠損辺縁から生じ, 術後 28 日では欠損部のほぼ

全体を満たすに至ったが, 対照群では, 術後 28 日においても新生血管と新生骨様組織は欠損部約 1/2 程度を占めたに過ぎなかった。欠損部での新生血管の占有率 (BVV) と新生骨様組織の占有率 (BV) は経日的に増加し, 術後 14 日以降では, 対照群, 0.1 あるいは 0.3% FGF-2 投与群の 3 群間で有意差を認めた。組織学的には, 実験群の新生血管は対照群より豊富で, 0.3% FGF-2 投与群の新生血管は 0.1% 群より豊富であった。また, FGF-2 投与群における骨芽細胞様細胞数および破骨細胞様細胞数は対照群よりも有意に多かった。

臨界骨欠損部では, 新生血管が術後 14 日に欠損辺縁から生じ, 術後 28 日では欠損部約 2/3 を占めるに至ったが, 新生骨様組織は欠損辺縁にわずかに認められるに過ぎなかった。対照群の新生血管は, 術後 21 日に観察されたが, 術後 28 日でも欠損部の約 1/3 に留まる程度で, 新生骨様組織についてはほとんど観察されなかった (図 1)。BVV と BV の経日的増加は, 術後 21 日以降で 3 群間の有意差を認めた。組織学的には, 実験群の新生血管は対照群より豊富で, 0.3% FGF-2 投与群の新生血管は 0.1% 群より豊富であったが, 新生骨様組織の形成は認められたものの骨欠損閉鎖率は小さかった。なお, FGF-2 投与群における骨芽細胞様細胞数および破骨細胞様細胞数は対照群よりも有意に多かった。

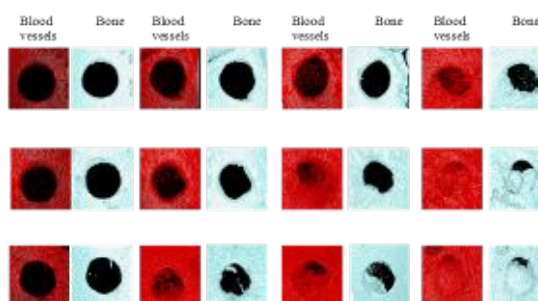


図 1 非臨界骨欠損における新生血管および骨再生のマイクロ CT 観察

## (2)垂直方向の骨再生における新生血管の動態の検討

ラット GBA モデルにおける 1S , 7M 群の垂直方向の骨増生時の血管新生は , 脳動脈から分岐し骨髄穿通部に達し , そこから骨外側方向に分布領域が拡大していた( 図 2 )。

骨髄穿通率が同じ場合 , 1S 群は 7M 群と比較して術後 14 日で血管新生量が有意に増加し , 術後 28 日で増生骨量が有意に増加した。

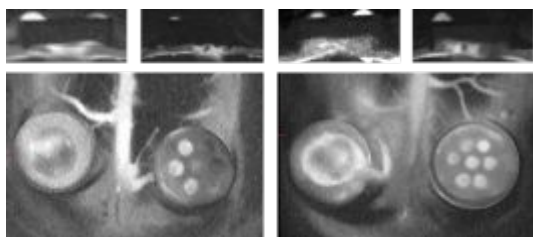


図 2 ラット GBA モデルにおける血管新生のマイクロ CT 観察

## (3)垂直方向の骨再生に対する PDGF の影響

ラット頭頂骨の骨外側方向の骨増生において PDGF は効果的であった ( 図 3 )。

骨増生を促進させる増殖因子に PDGF を用いる場合の足場として , ACS および吸収性キトサンスポンジの局所適用は有効であった。



図 3 PDGF の垂直方向に対する骨再生の組織観察

## 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 12 件 )

Shino H, Hasuike A, Arai Y, Honda M, Isokawa K, Sato S (2015) Melatonin enhances vertical bone augmentation in rat calvaria secluded spaces, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 査読あり, 21, e122-e126, doi:10.4317/medoral.20904

Tsunori K, Sato S, Hasuike A, Manaka S, Shino H, Sato N, Kubota T, Arai Y, Ito K, Miyazaki M (2015) Effects of intermittent administration on parathyroid hormone on bone augmentation in rat calvarium, *Implant Dent*, 査読あり, 24, 142-148, doi: 10.1097/ID.0000000000000228

Yoshimaki T, Sato S, Kigami R, Tsuchiya N, Oka S, Arai Y, Ito K (2014) Bone regeneration by lactoferrin in non-critical-sized rat calvarial bone defects. *J Med Bio Eng*, 査読あり, 34, 256-260

Tsuchiya N, Sato S, Kigami R, Kawano E, Takane M, Arai Y, Ito K, Ogiso B (2014) Effects of platelet-derived growth factor applied via a chitosan sponge on enhanced bone augmentation beyond the skeletal envelope within a plastic cap in rat calvarium. *J Oral Sci*, 査読あり, 56, 23-28, doi.org/10.2334/josnusd.56.23

Kigami R, Sato S, Tsuchiya N, Sato N, Suzuki D, Arai Y, Ito K, Ogiso B (2014) Basic fibroblast growth factor angiogenesis in bone regeneration within non-critical-sized bone defects in rat calvaria. *J Oral Sci*, 査読あり, 56, 17-22, doi.org/10.2334/josnusd.56.17

Yoshimaki T, Sato S, Tsunori K, Shino H, Iguchi S, Arai Y, Ito K, Ogiso B (2013) Bone regeneration with systemic administration of lactoferrin in non-critical-sized rat calvarial bone defect. *J Oral Sci*, 査読あり, 55, 343-348, doi.org/10.2334/josnusd.55.343

Kigami R, Sato S, Tsuchiya N, Yoshimaki T, Arai Y, Ito K (2013) FGF-2 angiogenesis in bone regeneration within critical-sized bone defects in rat calvaria. *Implant Dent*, 査読あり, 22, 422-427, doi:10.1097/ID.0b013e31829d19f0.

Tsuchiya N, Sato S, Kigami R, Yoshimaki T,

Arai Y, Ito K (2013) Effects of platelet-derived growth factor on enhanced bone augmentation beyond the skeletal envelope within a plastic cap in the rat calvarium. J Hard Tissue Biol, 査読あり, 22, 221-226

佐藤秀一, 伊藤公一 (2013) 歯周組織再生および骨再生における骨移植材の現状  
どの移植材が最も効果的か?, 査読なし, 日歯周誌, 55, 300-311

吉巻友裕, 佐藤秀一, 新井嘉則, 伊藤公一 (2013) ラット内側性骨欠損に対するラクトフェリンの影響, ラクトフェリン 2013, 査読なし, 日本医学館, 35-40

[学会発表](計 18 件)

鈴木大悟, 秋田大輔, 井口慎也, 河野英輔, 森谷良智, 鳥海 拓, 磯川桂太郎, 新井嘉則, 本田雅規, 佐藤秀一, ラット水平性骨欠損モデルに対する脱分化脂肪細胞を用いた歯周組織再生治療の検討, 第58回秋季日本歯周病学会学術大会, アクトシティ浜松(静岡県, 浜松市), 2015年9月12日

井口慎也, 鈴木大悟, 篠弘道, 秋山浩教, 鳥海 拓, 磯川桂太郎, 新井嘉則, 本田雅規, 佐藤秀一, マウス歯周炎モデルに対する骨髄間質細胞を用いた歯周炎の抑制, 第58回秋季日本歯周病学会学術大会, アクトシティ浜松(静岡県, 浜松市), 2015年9月12日

河野英輔, 鳥海 拓, 鶴町仁奈, 井口慎也, 鈴木大悟, 磯川桂太郎, 佐藤秀一, 本田雅規, ヒトiPS細胞から神経堤細胞への分化誘導. 第58回春季日本歯周病学会学術大会, 幕張メッセ(千葉県, 幕張市), 2015年5月15日

佐藤暢亮, 菅井健二, 江田昌弘, 西田哲也, 山田 豊, 吉沼直人, 菅野直之, 佐藤秀一, 新井嘉則, ラットGBAモデルにおける血管新生の動態. 第58回春季日本

歯周病学会学術大会, 幕張メッセ(千葉県, 幕張市), 2015年5月15日

Sato S, Saito Y, Mizumura Y, Masuda H, Nishida T, Sugano N, Arai Y, Ito K, Effects of various dosage of nicotine on guided bone augmentation, 100<sup>th</sup> American Academy of Periodontology. San Francisco, USA, 2014年9月20日

Tsunori K, Sato S, Shino H, Takano M, Akutagawa H, Ito K, Effect of systematic parathyroid hormone (1-34) on augmented bone using a rat calvarium model. 100<sup>th</sup> American Academy of Periodontology, San Francisco, USA, 2014年9月20日

篠 弘道, 佐藤秀一, 蓮池 聡, 津徳亮成, 佐藤暢亮, 井口慎也, 新井嘉則, 伊藤公一, 小木曾文内, ラットの骨増生におけるメラトニンの効果. 第140回日本歯科保存学会春季学術大会, 滋賀県立琵琶湖ホール(滋賀県, 大津市), 2014年6月19日

津徳亮成, 佐藤秀一, 佐藤暢亮, 吉巻友裕, 蓮池 聡, 山田 豊, 新井嘉則, 伊藤公一, PTH (1-34) の間歇投与によるラットGBAモデルにおける骨増生の影響. 第57回春季日本歯周病学会学術大会, 長良川国際会議場(岐阜県, 岐阜市), 2014年5月23日

吉巻友裕, 佐藤秀一, 津徳亮成, 篠 弘道, 新井嘉則, 伊藤公一, ラクトフェリンの全身投与はラット頭頂骨内側性骨欠損の骨再生を促進する. 第57回春季日本歯周病学会学術大会, 長良川国際会議場(岐阜県, 岐阜市), 2014年5月23日

篠 弘道, 佐藤秀一, 蓮池 聡, 佐藤暢亮, 新井嘉則, 小木曾文内, ラット頭頂骨の骨増生におけるメラトニンの効果. 第66回日本大学歯学会学術大会, 日本大学歯学部大講堂(東京, 千代田区), 2014年5月18日

佐藤暢亮, 佐藤秀一, 長嶋麻美, 新井嘉則, 小木曾文内, 骨外側方向の骨増生における血管新生のエックス線・組織学的観察. 第66回日本大学歯学会学術大会, 日本大学歯学部大講堂(東京, 千代田区), 2014年5月18日

佐藤秀一, 佐藤暢亮, 篠 弘道, 井口慎也, 鈴木大悟, 河野英輔, 本田雅規, 骨外側方向における骨再生に関する研究と今後の展望. 第8回日本大学先端バイオフォーラム, 日本大学会館大講堂(東京都, 千代田区), 2013年11月27日

佐藤暢亮, 佐藤秀一, 宇田川麻美, 篠 弘道, 新井嘉則, 伊藤公一, 小木曾文内, ラットGBAモデルにおける血管新生のマイクロCT による観察. 第8回日本大学先端バイオフォーラム, 日本大学会館大講堂(東京都, 千代田区), 2013年11月27日  
Tsuchiya N, Sato S, Kigami R, Yoshimaki T, Arai Y, Ito K, The effect of platelet derived growth factor for guided bone augmentation in rat. 22<sup>nd</sup> European Association for Osseointegration, Dublin, Ireland, 2013年10月18日

Kigami R, Sato S, Tsuchiya N, Yoshimaki T, Arai N, Ito K, Effects of FGF-2 guided bone augmentation beyond the skeletal envelope within a plastic cap in the rat calvarium. 22<sup>nd</sup> European Association for Osseointegration, Dublin, Ireland, 2013年10月18日

佐藤暢亮, 佐藤秀一, 宇田川麻美, 江澤庸博, 新井義則, 小木曾文内, ラットGBAモデルにおける血管新生のマイクロCTによる観察. 第139回日本歯科保存学会秋季学術大会, 秋田県総合生活文化会館(秋田県, 秋田市), 2013年10月17日

木上理沙, 佐藤秀一, 宇田川麻美, 土屋紀子, 津徳亮成, 伊藤公一, bFGFの非臨界骨欠損における血管新生および骨再生のエックス線学的検討. 第138回日本歯科

保存学会春季学術大会, 福岡国際会議場(福岡県, 福岡市), 2013年6月27日  
津徳亮成, 佐藤秀一, 吉巻友裕, 蓮池 聡, 山田 豊, 伊藤公一, ラット頭頂骨に作製した骨欠損に対するPTHの間欠投与. 第138回日本歯科保存学会春季学術大会, 福岡国際会議場(福岡県, 福岡市), 2013年6月27日

〔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

佐藤 秀一 (SATO SHUICHI)  
日本大学・歯学部・教授  
研究者番号: 50225942