

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463059

研究課題名(和文) ナノアパタイトとナノコラーゲンによる生体極似骨梁構造を持つ人工骨の開発

研究課題名(英文) Development of the artificial bone having a living body resemblance trabecula structure with nanoapatite and the nanocollagen

研究代表者

八上 公利 (Yagami, Kimitoshi)

松本歯科大学・歯学部附属病院・准教授

研究者番号：00210211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病や骨粗鬆症などによる歯槽骨吸収の重症化した患者に対する骨再生療法の開発を目的として、糖尿病や骨粗鬆症モデル動物において、幾何構造を持つDDS-HB37Hにナノ・アテロコラーゲンをコートし、標的薬剤を付与した間葉系幹細胞を培養付着させ骨形成における血管成長とコラーゲンとの関係の評価を行った。その結果、DDS-HB37Hは骨形成促進因子であるOsterixやALPとともにVEGFmRNAの発現を増強させた。また、骨組織形成が進行する部位のVEGFの発現が増加し豊富な血管の形成された。したがって、DDS-HB37Hは糖尿病や骨粗鬆症患者に対する骨再生療法として有効と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of development of the bone regeneration therapy for the aggravated alveolar bone resorption due to diabetes mellitus or the osteoporosis, we used nano-atelocollagen with diabetes mellitus / osteoporosis model animal in DDS-HB37H which had a geometry structure and culture attached the mesenchymal cells which gave target medicine and evaluated blood vessel growth in the bone formation and relations with the collagen. As a result, DDS-HB37H made expression of VEGFmRNA reinforced with osterix and the ALP which were osteo-induction factor. Also, VEGF expression increased in bone formation region, and blood vessel was formed in richness. Therefore, DDS-HB37H is thought effective bone regeneration material for diabetes mellitus and the osteoporotic patients.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨再生 糖尿病 骨粗鬆症 ナノコラーゲン TCP 人工骨 VEGF ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症患者において骨梁は極めて乏しく、仮に糖尿病が改善し自家骨移植や骨補填材により骨再生を行いインプラント治療を行っても、骨代謝の低下により良好な結果が得られない。したがって、骨再生を行う際には生体の骨代謝回転を阻害しないことが必要である。

これまでの骨再生療法の問題点として、

骨補填材の構造は、リン酸カルシウム結晶や型コラーゲンを混合したもので、生体の骨基質とは掛け離れた構造である、ES細胞やiPS細胞などは倫理的問題や遺伝子の危険性の問題など難題が多い、骨髄間葉系幹細胞は実用化はされているが採取量の限界や外科的侵襲のリスクにより患者の負担が大きい、高度に結晶化されたハイドロキシアパタイト単体は正常な骨に比べて吸収能力が低く骨への置換がされにくい、構造体として再生後の骨の維持のためのコラーゲンなどの基質タンパク材の局所維持が困難である、等があげられる。

そこで、糖尿病や骨粗鬆症などにより歯周病の重症化した患者に対する骨再生療法を考える上で、ナノレベルからの骨形成を促進する一方で、骨の形成因子と抑制因子をコントロールするシステムを開発することは、安全性の高い骨再生療法を提供するために必須と考えた。

2. 研究の目的

これまでに我々は、BMP-2を徐放する幾何学的構造による骨再生能を誘導するアパタイト多孔体を開発し、顎骨など大きな骨欠損の早期再生に有効であることを証明してきた(JBMME, 21:291-306, 2012)。

しかし、埋入されたアパタイトが吸収されて宿主の骨と置換して、生理的な機能を十分に回復するまでには時間を要する。また、広範な骨欠損や骨粗鬆症および糖尿病など

による重度の歯周病等のリスクをもつ患者に対しての適応には難しい実情がある。そこで我々は、生体の骨梁構造と同様な基質組成と骨梁構造をからなる人工骨を開発することを目的として、糖尿病性骨粗鬆症合併症モデル動物を用いて、骨再生部位局所における骨再生に必要な因子を解析し、ナノマテリアルを用いたドラッグデリバリーシステムを検討した。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病性骨粗鬆症動物の作成

糖尿病発症の高齢ウサギ(3歳前後、雌)を糖尿病高脂肪低カルシウム飼料で飼育作成した。

(2) DDSのための骨芽細胞分化遺伝子の解析

骨髄細胞の採取と骨芽細胞・破骨細胞共存培養系において、ドラッグデリバリーシステム(DDS)に必要な因子の決定のため骨芽細胞分化度とBMP-2、IGF-1、TNF α 、IL-1、RANKL、PTHのmRNA発現とタンパクの産生について解析を行った。

(3) 糖尿病性骨粗鬆症合併症動物での Nano-Col-DDSHB37H による骨再生実験

糖尿病性骨粗鬆症合併症動物への Nano-Col-DDSHB37H による骨再生のため、全身麻酔無痛下に下顎両側小白歯を3本抜去して骨欠損を形成する欠損部を満たすようにHB37Hにより顎骨を形成した。カルセインにより骨形成状態を経日的にラベルした。

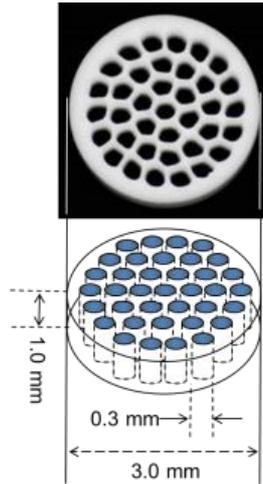
(4) Nano-DDS-HB37H による骨造成の評価

術後1、3、6か月に全身麻酔安楽死下に、下顎骨をホルマリンにて灌流固定した。次いで、3次元CTにて骨形態計測を行い、骨梁構造の変化を比較した。試料をポリエステル樹脂に包埋し、非脱灰切片を作成して免疫組織化学分析、in situ ハイブリダイゼーションによる遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

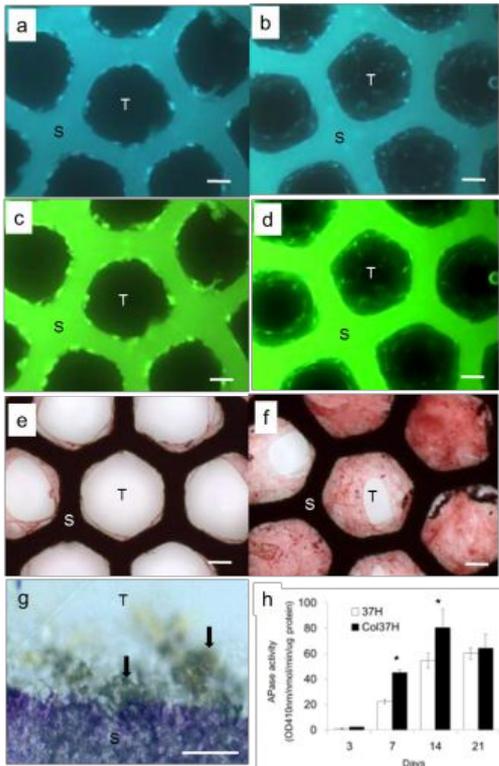
(1)作成した Nano-HB37H

円盤状
直径 3.0 mm x
厚さ 1.0 mm
管空数：37、
平行連通孔
管空直径：
0.3 mm
形成後焼成



ナノ表面構造を
持つ焼成 TCP
にナノアテロコラーゲンをコートした。

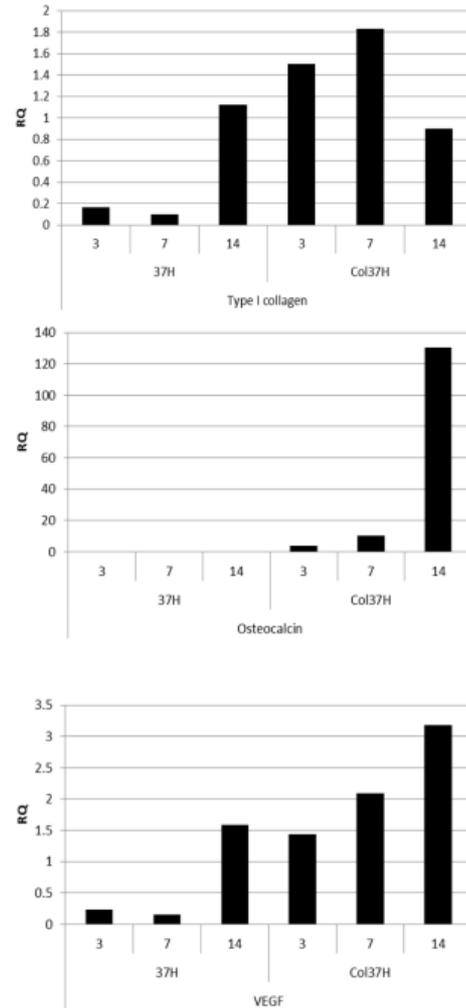
(2)Nano-HB37H へのアテロコラーゲンの付与による間葉系幹細胞の骨芽細胞分化と VEGF の発現



Col137H では 37H に比べて、培養 2 週間にお

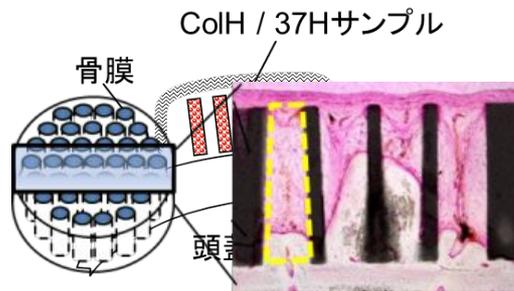
いて VEGF を高率に発現していた。そして、APase 活性の上昇が見られた。

(3)Col137H と 37H における骨型遺伝子発現解析



骨型遺伝子と VEGF 遺伝子の発現の変化 RT-PCR の値は RQ (respiratory quotient) min/最大信頼度 95%で、37H の 3 日目を基準とし GAPDH レベルで調整した。Type I collagen、 osteocalcin および VEGF とともに Col137H において培養初期より高値を示した。

(4)ラット頭蓋骨上移植実験による非脱灰硬組織所見



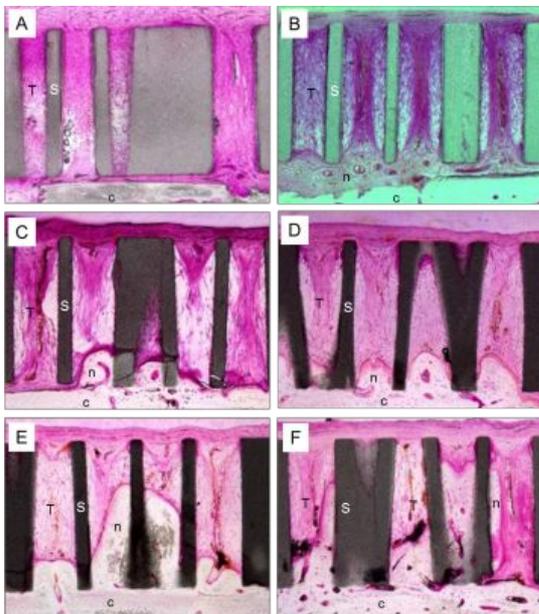
埋入期間： 1 ~ 6 週間

組織標識： 埋入翌日;カルセイン(2mg/kg)
 摘出前日;アリザリン(2mg/kg)

静脈内投与

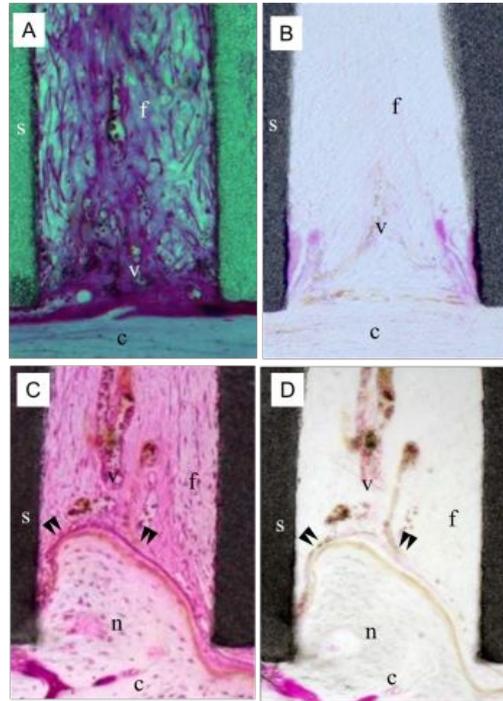
評価方法：非脱灰硬組織切片

Villanueva osteochrome bone stain



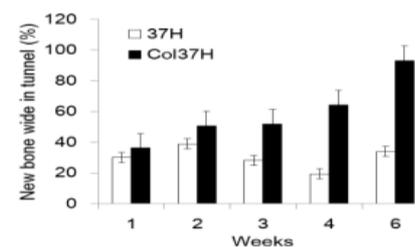
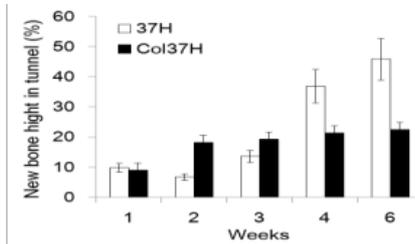
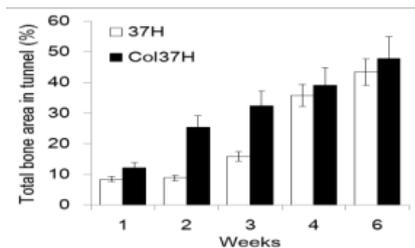
Col37H は 37H に比べて、1 週後において既存骨膜側骨表面からの太い血管侵入が多く見られた。血管は、管空壁周辺よりも管空の中央に集まるように形成され、時間とともに癒合して太くなっていた。太くなった血管により導かれるように新生骨が管空内を満たしていた。Col37H では骨表面からのみならず、管空壁内面にも直接成熟した骨が形成されていた

anti-VEGF antibody stain



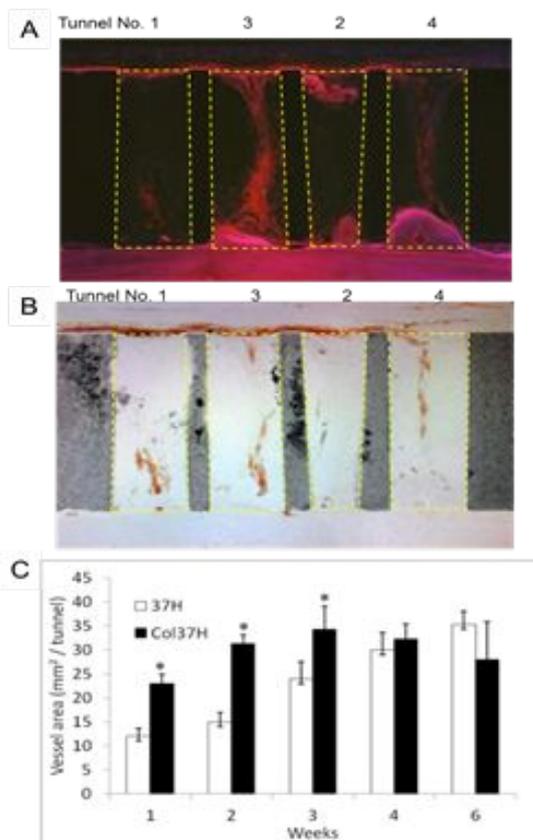
Col37H は、6 週後において既存骨膜側骨表面からの太くて豊富な血管の形成が見られた。骨表面からのみならず、管空壁内面にも直接成熟した骨が形成されていた。

(5) 骨形態計測法 (面積率) qCT 骨密度測定法



骨新形成領域は、埋入期間に比例して

Col137H と 37H とともに増大した。管空内の骨の形成の量は、37H に比べ Col137H において最初の週から増加が見られた。管空内への骨の形成誘導の距離は、37H では 4-6 週以降で増加していた。管空内で形成される骨の幅は、37H より Col137H の 3 週以降で増加していた。



【まとめ】

(1) Type I collagen、osteocalcin および VEGF とともに Col137H において培養初期より高値を示した。

(2) 37H-β-TCP (37H) およびアテロコラーゲンコート 37H-β-TCP (Col137H) は、何れの管空内においても継時的に新生骨組織形成が確認された。

(3) 37H に比べ Col137H では、管空内部への新生骨形成が増加していた。

(4) 何れの TCP においても、血管に導かれるように骨形成されていた。

(5) 血管新生は、時間の経過とともに増加し、Col137H において多く形成されていた。

(6) VEGF の発現は 37H に比べ Col137H において初期から増加が見られた。

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 1 件)

(1) Atelocollagen Enhanced Osteogenesis in a Geometric Structured Beta-TCP Scaffold by VEGF Induction. Kimitoshi Yagami, Sunao Sadaoka, Hiroshi Nakamura, Saho Komatsu, Jun Onodera, Masahiko Suzuki and Yoshinori Kuboki. J Tissue Sci Eng 2016, 7:1, 1-8.

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 骨形成は担体の構造とコラーゲンによりどのように促進されるか - 幾何構造とコラーゲンとの効果について - 八上 公利、定岡 直、久保木 芳徳、小野寺 純、松永 未知男、木村 満利子、鈴木 正彦。第 33 回日本骨代謝学会学術集会。2015 年 7 月、京王プラザホテル、東京。

(2) Evaluation of bone formation ability with the collagen coat β-TCP having angiogenesis by geometry structure.

Kimitoshi Yagami, Sunao Sadaoka, Hiroshi Nakamura, Saho Komatsu, Jun Onodera, Masahiko Suzuki and Yoshinori Kuboki. 国際骨代謝学会 (IBMS)・第 31 回日本骨代謝学会 (JSBMR) 第 2 回合同国際会議、大阪国際会議場、大阪。

〔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

<http://www.mdu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八上公利 (YAGAMI, Kimitoshi)
松本歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：00210211

(2) 研究分担者

中村浩志 (NAKAMURA, Hiroshi)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：0027817

牧 茂 (MAKI, Shigeru)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：20134942

定岡 直 (SADAOKA, Sunao)
松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：80549395

川原一郎 (KAWAHARA, Ichiroh)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：20319114

(3) 連携研究者

宇田川 信之 (UDAGAWA, Nobuyuki)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：70245801

久保木芳徳 (KUBOKI, Yoshinori)
北海道大学・歯学部・教授
研究者番号：00014001