

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861944

研究課題名(和文)多孔質セラミックスにおける骨形成メカニズムの解明と臨床応用への基礎的研究

研究課題名(英文)The Bone Regenerative effect of Osteoblasts on Novel Hydroxyapatite Ceramics and Basic Study for Clinical application

研究代表者

多田 美里(平岡美里)(TADA, MISATO)

広島大学・大学病院・歯科診療医

研究者番号：40572326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：連通気孔を有する多孔体HAセラミックス骨補填材IP-CHAは、骨芽細胞の足場の担体として有効に機能し、またIP-CHA/骨芽細胞複合体は生体親和性および骨伝導能を有し、早期の骨組織再生を促進することをこれまで報告してきた。今回さらにIP-CHA/骨芽細胞/TGF- β 1(Transforming growth factor- β 1)複合体では早期に新生骨形成を認め、バイオマテリアルと骨芽細胞複合体による骨形成分子機構を明らかにすることで、より理想的な骨再生材料の開発と臨床応用へと発展する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：IP-CHA (Interconnected Porous Calcium Hydroxyapatite) is an excellent ceramic for use in bone tissue engineering because of its fully interconnected porous structure, which allows osteoblasts dispersion and supports their osteogenic differentiation. This study provided biochemical evidence that the IP-CHA/osteoblasts composite and IP-CHA/osteoblasts/TGF- β 1 (Transforming growth factor- β 1) composite could enhance osteogenic potential. It was strongly suggested that IP-CHA was a useful biomaterial for bone tissue regeneration.

研究分野：口腔外科学

キーワード：多孔質セラミックス ハイドロキシアパタイト 骨芽細胞 骨再生材料

1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域における顎骨疾患の治療に伴う骨欠損部の再建、また高度に萎縮した顎堤症例に対するインプラント治療における骨造成に対し、これまで自家骨移植が確実な方法として最も多く行われてきたが、二次的な骨採取手術の必要性、採取骨量の制限、術後の移植骨の吸収などの問題点があり、近年自家骨移植に代わる各種生体材料の開発がなされている。

連通気孔を有する多孔体 HA セラミックス骨補填材 (Interconnected Porous Calcium Hydroxyapatite; 以下 IP-CHA と略記する) は、平均気孔径 150 μ m、平均連通孔径 40 μ m、平均気孔率 75% で、その連通多孔構造により気孔内深部まで細胞が速やかに侵入することができ、従来の多孔体 HA に比べ優れた骨伝導能を示す。また最近では、組織再生の主要因子である scaffold や細胞ならびに成長因子を応用し、tissue engineering による培養人工骨による骨再生の研究が盛んに行われ、自家骨移植に代わる骨再生法として期待されている。

IP-CHA は整形外科領域において既に臨床応用されており、また、歯科領域においても 2010 年 1 月国内で唯一のインプラント埋入時を含む骨補填材として厚生労働省の薬事承認を得ており、本材料と骨原性細胞複合体に関する研究は活発に行われている。しかし、そのほとんどは症例報告であり、基礎的研究においても組織学的評価にとどまり、その優れた骨伝導性や骨形成に関する分子メカニズムの解明や多孔質セラミックスにおける細胞挙動、骨芽細胞分化を制御するシグナル因子群に関する詳細な研究は、国内外でほとんどなされておらず、その治療過程における細胞動態の詳細については未だ明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

自家骨移植に代わる骨再生法として、これまで我々は多孔質セラミックス (IP-CHA) と骨芽細胞の培養人工骨が有用であること、また培養人工骨における成長因子 TGF- β 1 の骨形成促進作用を報告してきた。

今回、IP-CHA におけるヒト骨芽細胞の増殖・分化・基質合成メカニズムを遺伝子レベルで解明し、またシグナル伝達系の解析により IP-CHA におけるヒト骨芽細胞による骨形成過程での細胞動態の詳細を明らかにするとともに、各種成長因子の骨代謝における作用を検討する。培養人工骨/成長因子複合体による骨形成分子機構を明らかにし、臨床応用における基礎的な裏付けを行い、より理想的な骨再建材料および骨再生誘導法の開発を本研究の目的とした。

IP-CHA における骨芽細胞に特異的かつ普遍的に作用するシグナル伝達物質を含めた

因子の発見・解析は骨再生医療を考察する上で重要であり、より優れた骨再建材料の開発により臨床歯学、医学への貢献は極めて大きいものとなり得る。また、培養骨における骨代謝に関する成長因子の役割の解析は、骨疾患の病態解明や治療にも貢献し、患者の QOL の向上にも大いに寄与できると考えた。

3. 研究の方法

多孔質セラミックス (IP-CHA) におけるヒト骨芽細胞の骨形成発現メカニズムおよび細胞内シグナル伝達系の解析

・骨芽細胞増殖・分化および基質形成マーカー遺伝子の発現解析

IP-CHA に当科にて継代培養を行っているヒト顎骨由来正常骨芽細胞を播種し、デキサメタゾンを含む石灰化誘導培地 (2mM β -グリセロリン酸および 50 μ g/ml アスコルビン酸を含む α -MEM 培地) で培養後、mRNA を抽出し、Runx2, Osteonix, Msx2, Dlx5, Twist, AP-1 などの転写因子の発現を real-time PCR 法にて検討した。また、IP-CHA に当科にて継代培養を行っているヒト顎骨骨芽細胞を播種し、デキサメタゾンを含む石灰化誘導培地で培養後、各種サイトカイン (TGF- β 1, TGF- β 2, BMP-2, FGF-2) を単独あるいは同時添加し、TGF- β 1 により活性化される Smad2, 3 や BMP で活性化される Smad5, 8 のリン酸化の調節について検討した。

培養人工骨移植による局所的骨形成メカニズムおよび骨形成制御分子の解析

・培養人工骨/サイトカイン複合体による骨形成の検討

IP-CHA にラット骨芽細胞を播種し、TGF- β 1, TGF- β 2, BMP-2, FGF-2 を単独あるいは複数添加した石灰化誘導培地で培養、分化させ、培養人工骨/成長因子複合体を作製後、それぞれ相互のラット皮下に移植を行った。移植後 2, 4, 8 週後に試料を摘出し、免疫組織学的検討を行った。また、骨分化マーカー遺伝子発現を real-time PCR 法にて検討した。また、形成された新生骨の機械的強さを小型万能試験機で行った。また、試料の一部を用いて ALP 活性の測定、カルシウム含有量の測定、OCN 産生量の測定を行い、生化学的に評価を行った。

4. 研究成果

これまで IP-CHA がヒト顎骨骨芽細胞に及ぼす影響を細胞生物学的に検討し、IP-CHA の表面性状は、ヒト顎骨骨芽細胞の接着、増殖に適していること、IP-CHA の連通多孔構造は骨芽細胞の増殖、分化を支持すること、IP-CHA は骨芽細胞の足場の担体として有効に機能することを報告してきた (Hiraoka M. et al: Arch of Asian

BioCeramics Res, 2007)。

今回さらにIP-CHAと骨芽細胞による培養人工骨の臨床応用を目的として、IP-CHAとラット骨芽細胞複合体を作製し、IP-CHA/骨芽細胞複合体は優れた生体親和性および骨伝導能を有し、早期の骨組織再生を促進することが明らかとなった。また、ラット皮下埋入実験によりIP-CHA/骨芽細胞複合体の異所性骨形成能を確認し、さらにIP-CHA/骨芽細胞/TGF-β1複合体では早期に新生骨形成を認め、TGF-β1などの成長因子は、ヒト顎骨骨芽細胞の培養初期の増殖・分化を促進し、*in vivo*においても培養骨芽細胞による骨形成に影響を及ぼすことが明らかとなった。

本研究でIP-CHA/骨芽細胞/成長因子複合体による培養人工骨の骨形成メカニズムを細胞レベルで解明し、培養骨芽細胞のみならず既存骨内の細胞の骨形成促進制御分子や骨形成への関与について検索することで、高機能性生体材料の作製と臨床応用へ基礎的な裏付けがなされ、今後より効果的、理想的な骨誘導法による生体材料設計にも大きく寄与すると考えられる。

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 3 件)

1. Minami M, Takechi M, Ohta K, Ohta A, Takamoto M, Ninomiya Y, Takamoto M, Fukui A, Tada M, and Kamata N. Bone formation and osseointegration with titanium implant using granular-and block-type porous hydroxyapatite ceramics.: *Dental Materials Journal*. 32(5): 753-760, 2013. (査読有)
2. Takamoto M, Takechi M, Ohta K, Ninomiya Y, Ono S, Shigeishi H, Tada M, Kamata N. Risk of bacterial contamination of bone harvesting devices used for autogenous bone graft in implant surgery.: *Head Face Med*. 11:3-9, 2013. (査読有)
3. 山本一博, 二宮嘉昭, 重石英生, 多田美里, 高本 愛, 安部倉仁, 武知正晃. スプリットクレスト法に連通多孔体ハイドロキシアパタイトを使用したインプラント同時埋入の1例. *広大歯誌* 45(2), 124-127, 2013. (査読有)

[学会発表](計 6 件)

1. 多田美里, 二宮嘉昭, 太田耕司, 小野重弘, 中川貴之, 武知正晃.: 連通多孔体ハイドロキシアパタイト (NEOBONE®) を使用した上顎洞底挙上術症例と移植部骨量の臨床的検討. 第34回日本口腔インプラント学会中国・四国支部学術大会. (2014.11.30 山口県健康づくりセンタ

ー, 山口)

2. 植月 亮, 太田耕司, 二宮嘉昭, 小野重弘, 多田美里, 佐々木和起, 武知正晃.: 外傷による上顎前歯欠損部のインプラント治療にIP-CHA骨補填材を用いた骨造成を行った2例. 第16回日本口腔顎顔面外傷学会総会(2014.7.19 米子コンベンションセンター, 鳥取)
3. 植月 亮, 太田耕司, 二宮嘉昭, 小野重弘, 多田美里, 佐々木和起, 武知正晃.: 水平的骨吸収症例に連通多孔体ハイドロキシアパタイト骨補填材による骨造成術を行った2例. 第62回NPO法人日本口腔科学会中国・四国地方部会(2014.10.25 徳島大学歯学部, 徳島)
4. 多田美里, 武知正晃, 太田耕司, 二宮嘉昭, 奥井 岳, 鎌田伸之.: 連通多孔性ハイドロキシアパタイトブロックによる水平的骨造成を用いてインプラント治療を行った1症例.: 第52回広島県歯科医学会併催第97回広島大学歯学会(2013.11.10 広島大学広仁会館, 広島)
5. 山本一博, 二宮嘉昭, 平岡美里, 重石英生, 武知正晃.: 連通多孔体ハイドロキシアパタイトを用いて歯槽分割術とインプラント同時埋入を行った1症例.: 第43回日本口腔インプラント学会・学術大会(2013.9.15 福岡国際会議場, 福岡)
6. 太田耕司, 平岡美里, 二宮嘉昭, 奥井 岳, 武知正晃.: 連通多孔性ハイドロキシアパタイトブロックを用いてインプラント治療における水平的骨造成術を行った1症例.: 第43回日本口腔インプラント学会・学術大会(2013.9.15 福岡国際会議場, 福岡)

[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:
出願年月日:
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

多田 美里 (平岡 美里)

(TADA MISATO (HIRAOKA MISATO))

広島大学病院, 歯科診療医

研究者番号: 40572326

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: