

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893083

研究課題名(和文)多血小板フィブリンによるヒト培養骨膜シートの骨再生促進効果の検討

研究課題名(英文) Synergistic effects of the combined use of human cultured periosteal sheet and platelet-rich fibrin on bone regeneration

研究代表者

堀水 慎 (HORIMIZU, Makoto)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：00736598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroではPRF内部に骨膜シート由来のALP陽性細胞が侵入し、細胞周囲のコラーゲン沈着と石灰化物形成の増加がみられた。骨欠損部では、複合体移植部周囲のPCNA陽性細胞と血管数が増加し、骨膜シート単独移植と比較して骨新生の促進が認められた。この結果から、PRFの増殖因子と細胞接着性が骨膜シートの細胞増殖・分化を促進し、骨再生機能の向上に寄与することが示唆された。本研究は、骨再生における培養骨膜シートとPRFの併用に関する初めての報告である。PRFとヒト培養骨膜シートの複合化は、歯周組織の骨再生療法における優秀な移植材料となることが期待された。

研究成果の概要(英文)：PRF consisted of highly condensed fibrin fibers. Periosteal cells showed outgrowth from the periosteal segment and were attached on the fibrin fiber mesh of the PRF. ALP-positive cells were observed in the surface region of the hCP (human cultured periosteal) sheet and hCP-PRF complex, as well as in the interface and the deep migrated regions into the hCP and PRF complex. The amount of mineral deposition was significantly more developed in the hCP and PRF complex than in hCP alone.

Implantation of the hCP sheet and PRF into the calvarial bone defects was performed to evaluate the effects of the complex in a typical clinical environment, such as bone tissue metabolism. PRF promoted the osteogenic ability of hCP sheets with implantation into animal calvarial defects. In the present study, the synergistic effects of PRF in combined use with a tissue engineering cultured human periosteal sheet on bone regeneration were demonstrated for the first time.

研究分野：歯周病学

キーワード：ヒト培養骨膜シート Platelet-rich fibrin 骨再生療法

### 1. 研究開始当初の背景

これまで我々は、下顎歯槽骨から採取した骨膜より、組織片培養によってヒト培養骨膜シートを作製し、自家移植による歯周組織再生療法や歯槽骨増生術での良好な治療成績を報告してきた。この際に、増殖因子による生物学的作用を期待して Platelet-rich Plasma, PRP を併用して(引用文献参照)。

しかし PRP は二回の遠心操作が必要で、安定した品質を得るには熟練が必要であり、さらに液状であるために操作性におと、局所的な停留には添加物を使用したゲル化が必要だった。

一方、フランスの研究者らによって開発された、platelet-rich Fibrin, PRF は、採血後13分間遠心するだけと調製が非常に簡便であり、即時性と安全性に優れる。

さらに PRF は豊富な血小板由来の増殖因子を含むほか、架橋したフィブリンゲルで構成されているため、細胞接着配列を持つフィブリンがスキャホールドとしてはたらくことが期待できる。分散細胞を播種した PRF 表面の SEM 像では、細胞の接着遊走に有効であることが分かった(図1)。

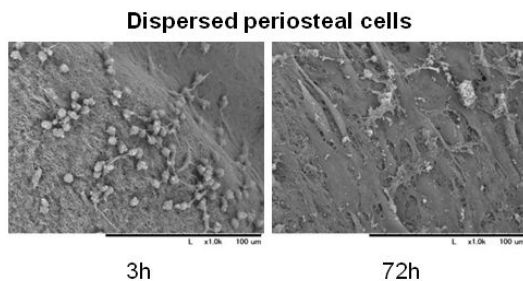


図1 PRF 表面の SEM 像

そこで、PRP に代わり、PRF を骨膜シートと複合化し、再生医療のための移植材料として利用することを着想した。

### 2. 研究の目的

PRF はヒト osteoblast の培養足場として好ましいとの報告もある。in vivo で幹細胞と併用した場合の PRF の効果については、ほとんど報告されていない。

この研究では、ヒト培養骨膜シートを PRF と複合化し、in vitro および in vivo での骨再生に対する影響を評価する。

### 3. 研究の方法

#### (1) hCP シートと PRF の複合化

ヒト骨膜組織片を臼後部頬側から無菌的に分離し、M199 培地で組織片培養を行った。遠心分離により得た PRF を 1x8x8mm にトリミングした。培養 14 日目の hCP シートをトリミングした PRF の上でさらに 14 日間培養した。

#### (2) 動物移植

ヌードマウス頭蓋骨に外径 4mm のトレフィンバーで骨欠損を形成し骨膜シートと即時調整した

PRF の移植を行った。

#### (3) マイクロ CT 分析

石灰化物沈着量と新生骨を定量するために、培養あるいは移植埋入された骨膜シートと頭蓋骨をマイクロ CT で撮影した。

#### (4) 組織学的解析

ディッシュ上で培養、あるいは動物移植した骨膜シートと PRF を摘出後、脱灰固定、パラフィンに包埋した。各サンプルのヘマトキシリン-エオジン(HE)染色、マツソトリクローム(MT)染色を行った。一部のサンプルは凍結切片を作製し、アルカリフォスファターゼ(ALP)酵素活性染色、TRAP 染色、抗オステオポンチン(OPN)、抗 PCNA、抗 SMA 免疫染色を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 骨膜シート PRF 複合化培養の組織学的所見

骨膜片からのびた細胞シート状構造は、中心部にいくにつれて 10-20 層の厚みになり、内部にコラーゲンの蓄積が見られる。PRF との複合化により、本来の骨膜片と PRF との界面部に細胞が密に集積し、PRF 内部への遊走と細胞周囲の豊富なコラーゲン沈着が見られた(図2)。

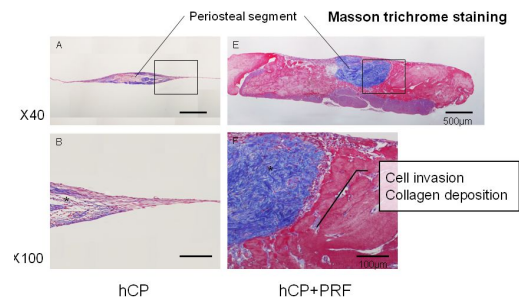


図2 骨膜シート PRF 複合化による細胞遊走 (MT 染色)

凍結標本において Osteoblast マーカーであるアルカリフォスファターゼとオステオポンチンの局在の評価を行った。骨膜シートでは、表層の少ない細胞にのみアルカリフォスファターゼの発現が見られたが、PRF 複合化により、PRF 界面部とフィブリンゲルに遊走した広い範囲の細胞に発現していた。分化初期の Osteoblast が分泌する骨基質のひとつであるオステオポンチンは、骨膜シートでは骨膜片の中心部に一部発現するのみであったが、PRF 複合化により、細胞の集積した領域に近接して強い発現が見られた。

#### (2) 骨膜シート PRF 複合化培養による石灰化評価

マイクロ CT 撮影により石灰化物を描出し、計測した。骨膜シートは骨膜組織片の内部からのみ石灰化がみられたが、PRF 複合化により、PRF の表層から石灰化領域が拡大しており、石灰化物の体積に、2 - 3 倍の有意な差が見られた(図3)。

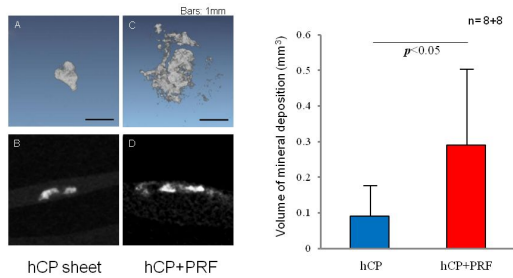


図3 骨膜シート PRF 複合化培養による石灰化体積の比較

(3) 動物実験の組織学的所見および骨再生の評価

骨膜シートは28日間培養し、PRF複合化と同時に、ヌードマウス頭蓋骨に移植を行った。移植したマウスは28日後に摘出固定後、組織学的評価を行った。マイクロCTでは骨膜シートを移植した中央部に骨形成がみられるが、PRFとの複合化群では中心部の骨形成がさらに促進されている。新生骨の体積は骨膜シート単独と比較し、骨膜シートPRF複合化移植群で有意な増加がみられた(図4)。

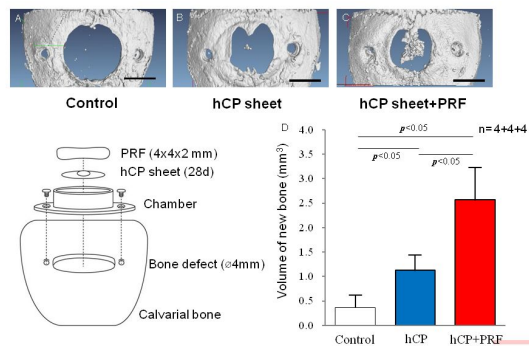


図4 頭蓋骨欠損移植による骨再生の比較

骨欠損の骨断端に注目すると、骨膜シートのみでは既存骨から厚みの薄い骨が形成されているだけですがPRF複合化により、断端部から厚みのあるリム状の骨形成が起こっているのが特徴的であった。

組織標本を観察すると、PRF複合化群の中心部において骨形成像が確認でき、TRAP陽性のOsteoclastが多くみられ骨膜シート単独移植群と比較し、骨代謝の活性化がみられた(図5)。

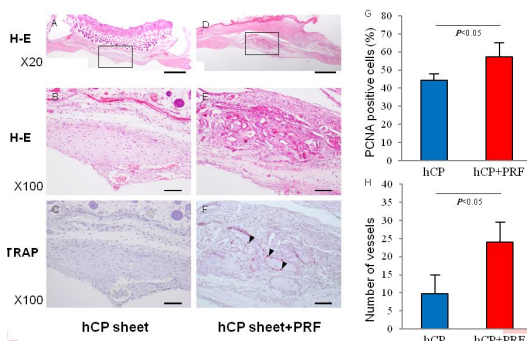


図5 頭蓋骨欠損移植における組織学的評価

さらに移植部において、細胞増殖マーカーであるPCNA陽性細胞、SMA染色による血管数の計測を行うと、細胞増殖、血管数ともにPRF複合化群で有意な増加がみられた(図5)。

(4) 移植部における細胞局在の評価

移植した骨膜細胞の局在を調べるため、蛍光追跡を行うと、移植細胞は新生骨の表面、骨髄内部に存在していた。また血管豊富な周囲結合組織内にも多数確認され、移植部への定着が確認できた(図6)。

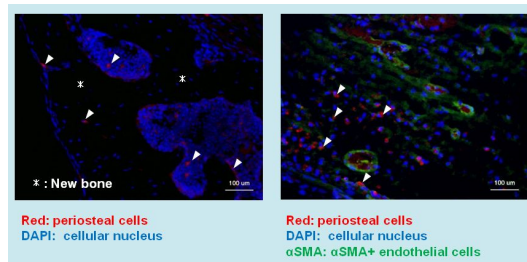


図6 骨膜細胞の蛍光追跡染色

骨膜細胞シートは、自立したOsteoblastへの分化と石灰化により、移植部での骨形成能を示す。このとき、PRFとの複合化は、フィブリンゲルに増殖遊走した細胞にPRFの増殖因子が作用し、Osteoblastへの分化を促進することで、移植部での骨形成量が増加すると考えられる。さらに、骨断端部からの新生骨量が増加していることから、PRFと、分化した細胞から放出される増殖因子が、既存骨のpreOsteoblastの分化誘導を刺激することで、移植部における骨誘導能も上昇していると考えられる。間接的には血管新生の誘導が組織再生の促進に作用していることも推察される。

本研究はヒト培養骨膜シートとPRFの複合化が相乗的に骨再生を促進することを初めて報告した。その効果は歯周組織再生療法の移植材料として将来的な応用に有望であると考えられる。

<引用文献>

Okuda K, Yamamiya K, Kawase T, Mizuno H, Ueda M, Yoshie H. Treatment of human infrabony periodontal defects by grafting human cultured periosteum sheets combined with platelet-rich plasma and porous hydroxyapatite granules: case series. *Journal of the International Academy of Periodontology* 2009;11:206-213.

Nagata M, Hoshina H, Li M, et al. A clinical study of alveolar bone tissue engineering with cultured autogenous periosteal cells: coordinated activation of bone formation and resorption. *Bone* 2012;50:1123-1129.

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 2 件)

堀水 慎、Platelet-rich fibrin(PRF)とヒト培養骨膜シートの複合化による相乗的骨再生促進効果、第 58 回秋季日本歯周病学会学術大会、2015 年 9 月 12 日、「アクトシティ浜松 (静岡県、浜松市)」

堀水 慎, Synergistic effects of the combined use of human cultured periosteal sheet and platelet-rich fibrin on bone regeneration. EuroPerio8, 2015 年 6 月 3-6 日、「ExCel London (London, UK)」

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀水 慎 (HORIMIZU, Makoto)  
新潟大学・医歯学総合病院・医員  
研究者番号: 00736598