

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861702

研究課題名(和文)骨・骨膜間空隙の拡大による骨増量法の確立

研究課題名(英文)Osteogenesis by gradually expanding the interface between bone surface and periosteum

研究代表者

佐藤 光一郎(SATO, KOICHIRO)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：20728125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、骨・骨膜間の空隙を拡大することにより、生体が本来備えている骨修復能を賦活し、骨表面に必要なだけの骨再生を誘導する研究を行っている。本研究では組織延長術を用い骨・骨膜間空隙を拡大することにより、細胞の足場の形成が促進されていることに着目し、骨髄由来間葉系幹細胞と自己フィブリンゲルを注入することにより、臨床応用可能な骨増生法の開発を行った。新たに開発した骨膜延長装置と組み合わせて、間葉系幹細胞+フィブリンゲルを注入する実験を継続したが、骨表面に新生骨を認めるが、骨膜延長群、細胞注入群に比較して骨・骨膜間空隙の全体として骨形成を大きく促進させるまでには至らなかった。

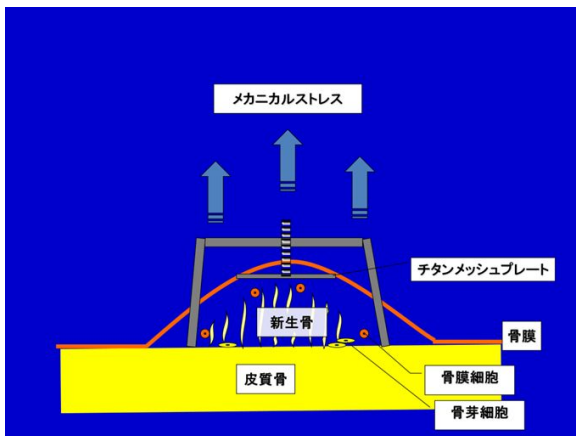
研究成果の概要(英文)：We are investigating to regenerate bone by osteogenesis by gradually expanding the interface between bone surface and periosteum. In this study we developed the new bone argmentation to obtain alternative strategies for periosteal distraction to induce effective bone formation that will lead to a reduction of the treatment period and to obtain functional bone capable of withstanding occlusal force. The experimental group of fibrin gel and MSC showed significantly increased volume in newly formed bone tissues compared with the control group at critical size defect. However micro-CT and histological analysis demonstrated that the effects of periosteal distraction were not enhanced by administration of bone marrow stem cells and fibrin gel.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨再生 骨膜

1. 研究開始当初の背景

顎骨の腫瘍や歯周病などに罹患することで生じた骨欠損を補うための骨増量法として、現在は骨移植術や骨延長術が行われているが、患者の侵襲が高いという欠点がある。最近では、骨・骨膜間の空隙を拡大することにより、骨再生を誘導する手法が研究されている。このような背景のもとに研究代表者はこれまでに歯槽部での骨の増生を想定し、筋組織が比較的少ない家兔の頭頂部を選択し骨・骨膜間の空隙を徐々に拡大することにより骨再生が誘導されていることを明らかにした。骨膜は、骨芽細胞への分化能を持つ細胞からなり、また周囲軟組織の進入を防ぐ遮断膜として働き、骨と骨膜間の間に骨誘導反応をひきおこす。研究代表者は、骨・骨膜間の空隙を拡大することにより、生体が本来備えている骨修復能を賦活し、骨表面に必要なだけの骨再生が可能であるという仮説のもとに研究を行っている。臨床応用ができるようにするには、安全性・確実性等について研究をさらに進められることが求められる。



2. 研究の目的

顎骨の腫瘍や歯周病などに罹患することで骨欠損を招き、著しく生活の質を損なう場合が多数認められる。本研究では、骨・骨膜間の空隙を拡大することにより、生体が本来備えている骨修復能を賦活し、骨表面に骨再生を誘導する安全で低侵襲の骨再生法を確立し、臨床応用を目指すことである。従来の骨移植術や仮骨延長術より侵襲の少ない骨増生手法としての応用が期待されるが、最近の研究では、仮骨延長術に比べ形成される骨の量・質が劣ることが示唆されている。組織延長術を用い、骨・骨膜間空隙の拡大により、細胞の足場が形成されていることに着目し、拡大された空隙に間葉系幹細胞を注入し、骨・骨膜間空隙に拡大による骨増生法が促進されるか検討を行った。

3. 研究の方法

新たな骨膜延長装置の開発：
研究室で作成した従来の延長装置では安定

性と確実性に難があったため、チタン製のメッシュの形態の調整を行った。

細胞投与のための足場材料の作成：

間葉系幹細胞の投与に際して、投与された部位に細胞が生着することが必要である。骨・骨膜間空隙に確実に細胞移植を行うために、自己フィブリンゲルを作成し、検討対象とした。

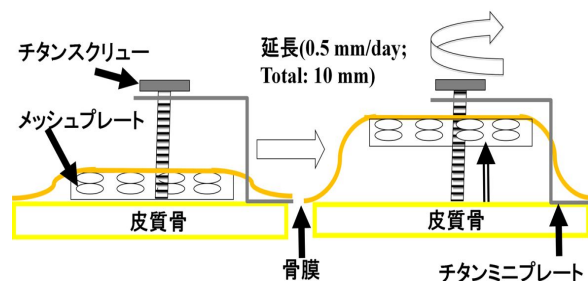
実験方法：

New Zealand White Rabbit の頭頂部の骨膜を剥離し、骨表面と骨膜間に自作の拡大装置を装着し、緩徐に 7mm の拡大を行い、拡大部分の骨修復機構の変化を μ CT 撮影と光学顕微鏡による組織学的観察で検討する。拡大終了後に 4 週間、8 週間の硬化期間を経て、 μ CT 撮影により形成された新生骨の体積および骨密度の計測を行う。計測後、各試料を 10% EDTA 溶液にて脱灰する。脱灰完了後、通常に従ってパラフィン包埋し、厚さ 4 μ m の連続切片を作成し、HE 染色、免疫染色を行い、骨表面と骨膜間との間に形成された組織の全てを組織学的に観察した。

4. 研究成果

研究代表者は、組織延長術を用い骨・骨膜間空隙を拡大することにより、細胞の足場の形成が促進されていることに着目し、拡大空隙に形成された足場に骨髄由来間葉系幹細胞を注入することにより新生骨の体積、高さ、骨密度、骨塩量に有意な増加がみられることを見出し、報告してきた (Sato et al. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010)。しかし、臨床応用を目指し、より確実な骨増生法の確立のためにはさらなる研究を進める必要がある。

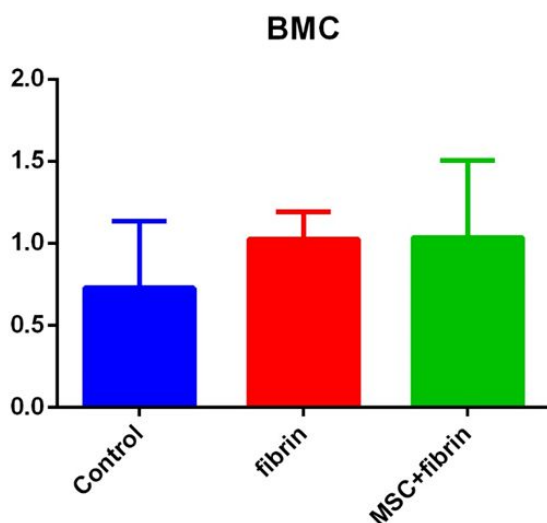
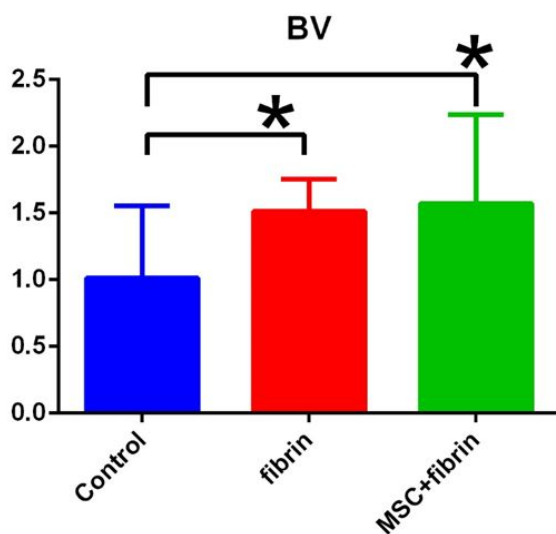
従来の延長装置を改良し、複数の延長装置を試作し、家兔の頭頂部に埋入試験を行った。新たな拡大装置にて安定して骨・骨膜間空隙の拡大が行われることを確認した。また、頭頂骨表面に新生骨が誘導されていることを確認した。



間葉系幹細胞の投与に際して、投与された部位に細胞が生着することが必要である。骨・骨膜間空隙に確実に細胞移植を行うために、細胞単体での投与ではなく、足場材料を組み合わせ合わせた投与が必要であると考え、自己フィ

プリングルを作成した。血液採取を行い、遠心分離などにより自己トロンピンと凝固因子、フィブリノゲンを分離することに成功した。間葉系幹細胞と自己トロンピン、凝固因子、フィブリノゲンを混和することにより細胞を内包したゲルの形成を行った。また、フィブリンに内包された細胞の評価を行うため、プラスミンにてフィブリンを溶解し、細胞数の評価を行い、フィブリンに内包された細胞が再度、培養可能であることを確認した。

ヌードマウス頭頂部において骨欠損を作成し、間葉系幹細胞とフィブリンゲルを注入し、骨形成能を評価した。マイクロCTによる形態評価において骨欠損のみのコントロール群では頭頂骨に骨形成を認めなかったが、フィブリンゲル群、間葉系幹細胞+フィブリンゲル群では有意に骨新生を認めた。しかし、フィブリンゲル群と間葉系幹細胞+フィブリンゲル群との比較では有意差は認めなかったが、間葉系幹細胞+フィブリンゲル群の方が新生骨体積の増加傾向を示した。



新たに開発した骨膜延長装置と組み合わせ、間葉系幹細胞+フィブリンゲルを注入する予備実験を継続したが、骨表面に新生骨を認めるが、骨膜延長群、細胞注入群に比較して骨・骨膜間空隙の全体として骨形成を大きく促進させるまでには至らなかった。そのため、この方法に適した細胞数、フィブリンゲルによる足場の改良、術式等の検討を続けたが、本年度内に、良好な結果を得る事はできなかった。今後もフィブリンゲルの強度の改良や適切な細胞数、装置の改良等の検討を行い、実験を継続していきたいと考えている。

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 2 件)

Oizumi T, Yamaguchi K, Sato K, Takahashi M, Yoshimura G, Otsuru H, Tsuchiya M, Hagiwara Y, Itoi E, Sugawara S, Takahashi T, Endo Y: A Strategy against the Osteonecrosis of the Jaw Associated with Nitrogen-Containing Bisphosphonates (N-BPs): Attempts to Replace N-BPs with the Non-N-BP Etidronate. Biol Pharm Bull. 査読有 39: 1549-54 2016. DOI : 10.1248/bpb.b16-00041.

Kumagai K, Horikawa T, Shigematsu H, Matsubara R, Kitaura K, Eguchi T, Kobayashi H, Nakasone Y, Sato K, Yamada H, Suzuki S, Hamada Y, Suzuki R. Possible Immune Regulation of Natural Killer T Cells in A Murine Model of Metal Ion-Induced Allergic Contact Dermatitis. Int Journal Mol Sci. 査読有 17:E87 2016. DOI : 10.3390/ijms17010087

〔学会発表〕(計 1 件)

佐藤光一郎、中岡一敏、荒井俊明、熊谷賢一、長谷部充彦、馬杉亮彦、園山智生、濱田良樹. 顎変形症術後のヒロサームによる冷電法の抗炎症効果とサイトカインバランスの改善. 2016/11/25-27 第 61 回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会(千葉県千葉市、幕張メッセ)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ccs.tsurumi-u.ac.jp/oms/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 光一郎 (KOICHIRO SATO)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：20728125

