

令和元年6月10日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11624

研究課題名(和文) 大腸菌発現系由来rhBMP-2含有 β -TCP製人工骨を用いた再生療法の開発研究課題名(英文) Bone regenerative therapy using Escherichia coli-derived rhBMP-2 adsorbed in β -TCP.

研究代表者

縄稚 久美子 (NAWACHI, Kumiko)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：10379787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：BMP-2を用いた骨再生療法は、自家骨移植に代わる最も有望な治療法として欧米を中心に実施されているが、未だ日本で承認されたBMP-2製剤は存在しない。我々は、大腸菌発現系を用いて生理活性を有したBMP-2タンパク質を作製することに成功した。そして、本申請研究では、イヌソケットプリザベーションモデルにおいて我々の開発品であるBMP-2/ β -TCPが強力に骨形成を誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発品が日本において承認されれば、十分な骨量がないためにインプラント治療をあきらめていた多くの患者に福音となることは間違いない。将来的にはMRONJ、インプラント周囲炎、口蓋裂、腫瘍摘出後の顎骨再建など、歯科領域だけでも多様な用途が考えられる。さらに、難治性骨折など整形外科領域での応用にも繋がる大変有意義な成果となることに疑う余地はなく、本申請の技術が世界に向けて発信されれば、日本発の創薬として、大きなインパクトがあると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Bone regeneration using BMP-2 is expected to have the highest therapeutic effect, but there is no BMP-2 product approved in Japan. We succeeded to develop the BMP-2 using E. coli system and it was clarified that the combination of E. coli-BMP-2 and the already approved biodegradable artificial bone, β -tricalcium phosphate (β -TCP), strongly induces bone formation in socket preservation model in dog.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：BMP-2 骨再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

4人に1人が高齢者となった昨今、加齢による歯の欠損には可撤性床義歯が主に用いられているが、患者の Quality of Life の改善に十分成功しているとは言いがたい。義歯に代わる機能回復法としてインプラント治療があり、年間約30万件以上のインプラント外科手術が実施されている。しかし、患者の約半数においては加齢及び歯の喪失に伴う骨の菲薄化が原因で、インプラント治療を受ける際、もしくは受ける前に自家骨移植に代表される増骨術が必要である。しかし、自家骨移植がドナーサイトの問題から制限される場合などは、ハイドロキシアパタイトに代表される人工骨が使用されるが、自家骨のような骨形成活性がなく、自家骨に代わる材料には至っていない。

TGF-スーパーファミリーに属し、生理的な骨発生・再生に関わる骨形成タンパク質(Bone Morphogenetic Protein, BMP)を用いた骨再生医療は、最も骨再生能力が高い治療法と期待されてきたが、日本において承認されたBMP製品はなく、米国で医療機器として承認された製品(商品名・Infuse, Medotronic Sofamor Danek社)は、1)哺乳動物細胞(CHO細胞)発現系により生産されたrhBMP-2を用いており、糖鎖修飾やプロテアーゼによる前駆体からのプロセッシングが伴うことにより不均一な分子集団からなるため、品質管理難度が高く、生産コストも高いため、経済合理性に難がある。さらに、2)組み合わせるスキャホールドがウシ由来I型コラーゲンのため、異種由来タンパク質によるアレルギー反応や未知・既知の感染症のリスクが排除し難いとともに、メカニカルストレスに対応するため物理的強度が必要な適応や手術部位には不向きである。従って、生産コストを下げること、また、適切なスキャホールドを選択・調製し、大動物における再生骨の質的評価を行なうこと、それに次いでヒトへの安全性・有効性を確認することが製品化への重要課題といえる。岡山大学と共同研究を進めてきた(株)オステオファーマは、これまで大腸菌発現系では困難とされてきた正しい立体構造と活性を有するrhBMP-2を工業スケールでの生産にも耐える製造プロトコルの最適化に成功し、非臨床GLPレベルでの生産が可能となった。これにより既存品よりも短期間で安価に高品質のrhBMP-2製剤を提供することが可能となった。そして、申請者らは、既承認の生体吸収性セラミック製人工骨であるβ-リン酸三カルシウム(β-TCP)とこのrhBMP-2の組み合わせが、自家骨と同等以上に口腔インプラント体周囲に骨形成を誘導することが可能であること(次項図, Ono et.al., 2014), また先行製品であるInfuseと同等の効果があることを大型動物であるブタやイヌを用いて明らかとしてきた。

つまり、この大腸菌発現系で生産されるrhBMP-2は自家骨以上の骨形成能力が期待できるため、日本での使用が承認されれば、従来型人工骨と同等の使用の簡便さや、自家骨採取を要しない非侵襲的手術が可能になることから、口腔インプラント患者に対する医療機器として爆発的に普及すると推測される。そして、これまで(株)オステオファーマでは、大腸菌発現系由来rhBMP-2含有β-TCP製人工骨を整形外科領域で医薬品として開発するために独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)の対面助言(薬機審長発第0513004号)を受け、治験申請用非臨床試験項目を実施し、安全性薬理試験、薬物動態試験、毒性試験など様々な安全性試験において、生体において毒性が極めて低いことが確認されてきた。そして、これまでに、歯科・口腔外科領域での医師主導型臨床治験に向け、PMDAと相談し準備を進めてきた。

2. 研究の目的

そこで本申請研究は、大腸菌発現系由来rhBMP-2含有β-TCP製人工骨の歯科・口腔外科領域での臨床応用へ向け、大型動物疾患モデルを構築し、大腸菌発現系由来rhBMP-2含有β-TCP製人工骨の有効性を確認することを目的とした。

3. 研究の方法

これまで、欧米において、BMP-2の適応症例の一つが抜歯後の歯槽骨吸収抑制を目的に行われるソケットプリザベーションである。そのため、はじめにイヌソケットプリザベーションモデルを構築した。具体的には、全身・局所麻酔下にて、イヌ上顎第3小臼歯を抜歯後、抜歯窩の頬側骨を約4.5mm(mild model)もしくは9.0mm(severe model)削除し、骨欠損を作製した。骨欠損部にE-BMP-2を含浸させたβ-TCPを充填し、ガーゼ型サージセルにて被覆、フラップを緊密に縫合した。対照群は、骨欠損部をガーゼ型サージセルのみで被覆した群とした。4週後、8週後に組織を回収し、micro-CT解析を実施した。そして、歯槽骨の高径、幅径、面積を測定した。何も移植しない群を対照群とした。

4. 研究成果

Mild model において、移植 4 週間には、対照群と比較し、BMP-2 群において歯槽骨の高径、幅径、面積共に増加傾向を示した(n=2, 図 1) .しかし、移植 8 週間には、対照群と比較し、BMP-2 群において歯槽骨の高径、幅径、面積共に差を認めなかった(n=2, 図 2) .

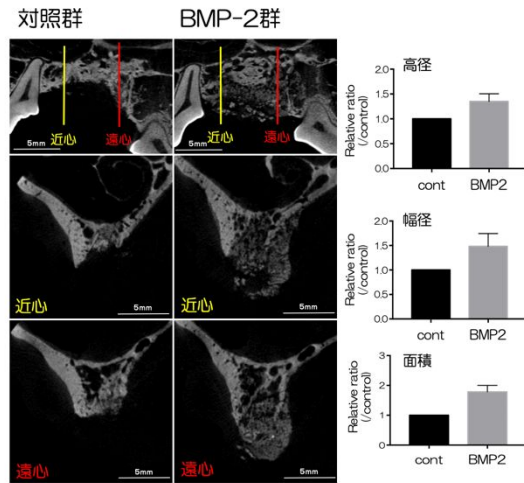


図1. ソケットプリザベーション mild modelにおける移植4週後のmicro-CT解析および定量解析の結果を示す。

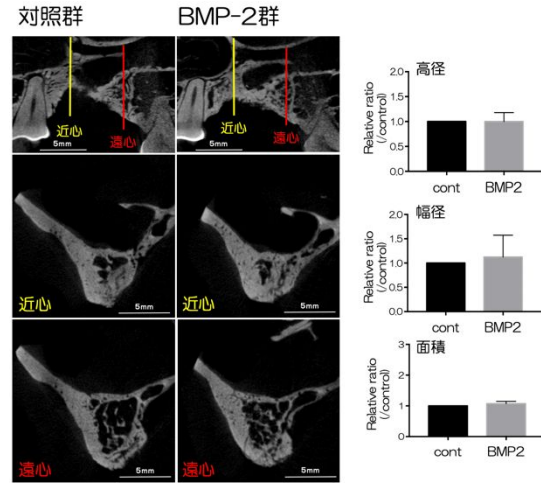


図2. ソケットプリザベーション mild modelにおける移植8週後のmicro-CT解析および定量解析の結果を示す。

Severe model において、移植 4 週間には、対照群と比較し、BMP-2 群において歯槽骨の高径、幅径、面積共に増加傾向を示し (n=2, 図 3), 移植 8 週間には、対照群と比較し、BMP-2 群において歯槽骨の高径および面積が有意に増加していた(n=3, 図 4, unpaired t-test, *p<0.05, **p<0.01 vs control) .

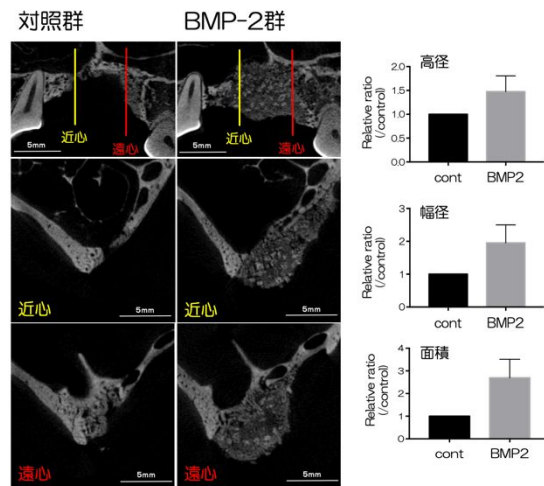


図3. ソケットプリザベーション severe modelにおける移植4週後のmicro-CT解析および定量解析の結果を示す。

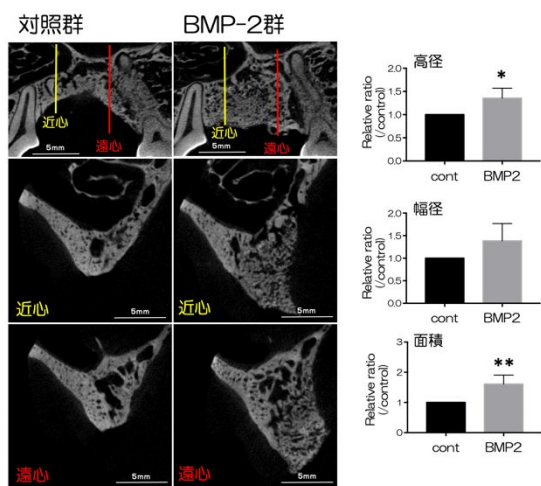


図4. ソケットプリザベーション severe modelにおける移植8週後のmicro-CT解析および定量解析の結果を示す。

また、組織学的検討の結果、E-BMP-2/ -TCP 複合体移植群において、-TCP の顆粒は残存せずに全てが骨に置換されていることが観察された。

以上の結果より、インソケットプリザベーションモデルにおいて、E-BMP-2/ -TCP 複合体が歯槽骨の再生において有用であり、骨欠損のモデルがシビアな時においてより効果的であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6件)

- Fujiwara A, Minakuchi H, Uehara J, Miki H, Inoue-Minakuchi M, Kimura-Ono A, Nawachi K, Maekawa K, Kuboki T. (2019) Loss of oral self-care ability results in higher risk of pneumonia in older inpatients: A prospective cohort study in a Japanese rural hospital. *Gerodontology*, in press, doi: 10.1111/ger.12402. 査読有
- Nguyen HT, Ono M, Oida Y, Hara ES, Komori T, Akiyama K, Nguyen HTT, Aung KT, Pham HT, Tosa I, Takarada T, Matsuo K, Mizoguchi T, Oohashi T, Kuboki T. (2019) Bone marrow cells inhibit BMP-2-induced osteoblast activity in the marrow environment. *J Bone Miner Res*. 3, 327-332, doi: 10.1002/jbmr.3598. 査読有
- Khattab HM, Kubota S, Takigawa M, Kuboki T, Sebald W. (2019) The BMP-2 mutant L51P, a BMP receptor IA binding-deficient inhibitor of noggin. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 37, 199-205, doi:10.3390/molecules23071517. 査読有
- Uchida Y, Irie K, Fukuhara D, Kataoka K, Hattori T, Ono M, Ekuni D, Kubota S, Morita M. (2018) Commensal microbiota enhance both osteoclast and osteoblast activities. *Molecules*., 199-205, doi:10.3390/molecules23071517. 査読有
- Yoshihara-Hirata C, Yamashiro K, Yamamoto T, Aoyagi H, Ideguchi H, Kawamura M, Suzuki R, Ono M, Wake H, Nishibori M, Takashiba S. (2018) Anti-HMGB1 neutralizing antibody attenuates periodontal inflammation and bone resorption in a murine periodontitis model. *Infect Immun*. 86(5), e00111-18. 査読有
- Yoshioka Y, Ono M, Maeda A, Kilts TM, Hara ES, Khattab H, Ueda J, Aoyama E, Oohashi T, Takigawa M, Young MF, Kuboki T. CCN4/WISP-1 positively regulates chondrogenesis by controlling TGF- β 3 function. *Bone*. 83: 162-170, 2016. 査読有

〔学会発表〕(計 6件)

- Nguyen HT, Ono M. Bone regeneration therapy using E-coli derived recombinant human BMP-2 and novel function of BMP-2 in marrow environment. The First International Symposium on Immunology and Tissue Regeneration in Okayama / 12th URA International Symposium. , 2018.11.24, Okayama
- Nguyen HT, Ono M, Oida Y, Hara ES, Komori T, Akiyama K, Nguyen HTT, Aung KT, Pham HT, Oohashi T, Kuboki T. Novel function of BMP-2 to prohibit bone formation in marrow environment. The American Society of Bone and Mineral Research. , 2018.11.24
- 縄稚久美子, ハラエミリオサトシ, 前田あずさ, 窪木拓男. ベトナム北部医療系大学における国際臨床研究デザインワークショップの試み. 第37回日本歯科医学教育学会総会および学術大会. 2018
- Nguyen HT, Ono M, Oida Y, Hara ES, Komori T, Akiyama K, Nguyen HTT, Aung KT, Pham HT, Tosa I, Takarada T, Matsuo T, Mizoguchi T, Oohashi T, Kuboki T. Marrow cells inhibits BMP-2-induced bone formation in the marrow. Conference in Science and Education of OdontoStomatology. 2018
- Nguyen HT, Ono M, Oida Y, Komori T, Akiyama K, Oohashi T, Kuboki T. Marrow cells inhibits BMP-2-induced bone formation in the marrow. 第48回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会 2018

〔図書〕(計 1件)

- 縄稚久美子, 前田あずさ, 窪木拓男. 補綴臨床別冊 保険適用新技術完全マスター! 第4章 口腔内装置 挿管時の歯の保護. 医歯薬出版株式会社; 東京, pp148-152, 2018.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大野 充昭
ローマ字氏名：Ono Mitsuaki
所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）: 60613156

研究分担者氏名：窪木 拓男
ローマ字氏名：Kuboki Takuo
所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）: 00225195

研究分担者氏名：大野 彩
ローマ字氏名：Kimura-Ono Aya
所属研究機関名：岡山大学
部局名：大学病院
職名：助教
研究者番号（8桁）: 20584626

研究分担者氏名：笈田 育尚
ローマ字氏名：Oida Yasutaka
所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）: 50625720

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。