

令和元年5月30日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11665

研究課題名(和文) ナノアパタイトとショートコラーゲンによるドラッグデリバリーシステム人工骨の開発

研究課題名(英文) Development of drug delivery system artificial bone with nano-apatite and short collagen

研究代表者

八上 公利 (Yagami, Kimitoshi)

松本歯科大学・歯学部附属病院・教授

研究者番号：00210211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：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、ショートコラーゲンによる骨補填材を開発した。Nano-DDS-CoIHB37H・BMP-2では、陽性対照として用いたHB37H・BMP-2と比べて、糖尿病動物における未分化間葉系細胞を、VEGFの発現を上昇させることにより骨芽細胞分化を促進し、骨形成能を飛躍的に向上させることが分かった。

このことよりNano-DDS-CoIHB37H・BMP-2は、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有効な骨補填材になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、骨芽細胞分化を促進するショートコラーゲンをを用いたDDSによる骨再生療法開発を行い、Nano-DDS-CoIHB37H・BMP-2が骨補填材として有効であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In order to develop an artificial bone consisting of trabecular bone structure similar to the trabecular bone structure of a living body, a bone graft material with short collagen was developed using diabetic osteoporosis complication animal models. Nano-DDS-CoIHB37H/BMP-2 promotes osteoblast differentiation by raising the expression of VEGF in undifferentiated mesenchymal cells in diabetic animals compared to HB37H/BMP-2 used as a positive control. It has been found that the bone formation ability is dramatically improved. From this, Nano-DDS-CoIHB37H.BMP-2 is considered to be an effective bone substitute for patients at risk such as extensive bone loss and severe periodontal disease due to osteoporosis and diabetes.

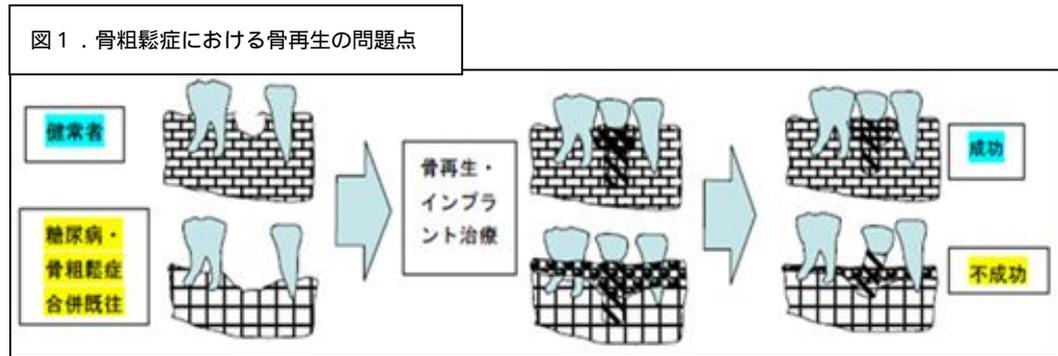
研究分野：医工学

キーワード：ナノ コラーゲン アパタイト 骨再生 VEGF 骨芽細胞 破骨細胞 ドラッグデリバリー

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

1. 研究開始当初の背景

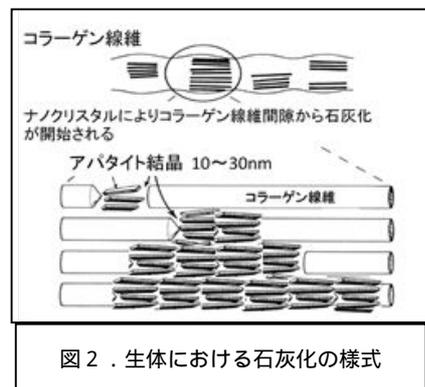
これまでに我々は、BMP-2 を徐放する幾何学的構造による骨再生能を誘導するアパタイト多孔体を開発し、顎骨など大きな骨欠損の早期再生に有効であることを証明してきた(JBMM, 21:291-306,2012)。しかし、埋入されたアパタイトが吸収されて宿主の骨と置換して、生理的な機能を十分に回復するまでには時間を要する。また、広範な骨欠損や骨粗鬆症および糖尿病などによる重度の歯周病等のリスクをもつ患者に対しての適応には難しい実情がある。そこで我々は、生体の骨梁構造と同様な基質組成と骨梁構造をからなる人工骨を開発することを目的



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、骨芽細胞文化を促進するショートコラーゲンをを用いたドラッグデリバリーシステムによる骨再生療法開発を企画した。

研究の学術的背景

1. 骨粗鬆症における骨再生の問題点：骨粗鬆症は、「日本糖尿病学会のガイドライン」の6大合併症に1つに含まれその原因として相互にIL-1などの起炎物質により悪化することが報告されている(Diabetes, Res. Clin. Pract., 2009, 30, in print)。また、インスリンの不足は血糖値を上昇させるだけでなく、骨芽細胞の活性の低下や活性型ビタミンDの腎臓での産生を低下させて骨量を減少させることも言われている。(Oral Health Prev. Dent. 7:107-127, 2009)。そのような骨粗鬆症患者の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の上で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(図1)。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。



2. 現在の骨再生療法の問題点：これまでの骨再生療法の問題点として以下の克服が課題である。1) 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、近年になり、材料内部の気孔性の向上から血管や細胞の深達性は向上されたが、生体の骨基質(図2)とは掛け離れた構造である。したがって、破骨細胞による吸収や骨芽細胞による骨形成が阻害され、正常な骨への置換が遅れる。2) 低侵襲な再生治療を期待してES細胞やiPS細胞などの技術応用も研究されているが、倫理的問題や遺伝子の危険性の問題など難題が多い。3) 骨髄間葉系幹細胞を利用した再生療法は、骨髄移植として顎裂形成術や肝臓再生、血管再生などの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。

3. 本研究立案の経緯：1) 最近、臨床的に応用されている骨粗鬆症の治療薬でビタミンD3剤による治療が見直されつつある。このVitD3投与は骨芽細胞と破骨細胞による骨の添加と吸収とのバランスをとることにより、顎骨壊死などの危険性も少なく、骨代謝を人工的に正常な状態へ導くことにより効果がある(JBMR. 21:1350-1380, 2006)。

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(JBMM, 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、骨芽細胞文化を促進するショートコラーゲンをを用いたドラッグデリバリーシステムによる骨再生療法開発を企画した。

3. 研究の方法

1. H28年度：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

料で飼育した。対象として、健康な高齢ウサギ（3歳前後、雌）を通常飼料で飼育した。作成された糖尿病性骨粗鬆症モデル動物の下顎の臼歯部を抜歯して同部の骨を採取し、BMP-2、IGF-1、TNF α 、IL-1、RANKL、PTHの発現を定量した。

2. H29年度:28年度のデータを基に促進もしくは阻害に必要な標的因子のリコンビナント（RP）と抗体を作成し、疾患モデルの骨髄細胞より骨芽細胞・破骨細胞共存培養系を樹立し、ショートコラーゲンを付与した nano-Col1HB37H 上で培養し骨形成とアパタイトの吸収について効果を確認した。

3. H30年度: nano-Col1/BMP-2 をドラッグデリバリーシステムとして付与した nano-DDS-Col1HB37H により糖尿病性骨粗鬆症モデル動物の骨欠損部の再生を行い、骨形態計測法および組織遺伝子学的解析により VEGF, PECAM1, ENG, NGF の mRNA の発現と効果を判定した。(図3)

4. 研究成果

1. 糖尿病発症の高齢ウサギ（3歳前後、雌）は、血糖値 200~250mg/dl、HbA1c 8~10%、骨代謝マーカーとして血中オステオカルシン量の減少、血中I型コラーゲン量の増加が確認された。

2. 骨髄細胞の採取と骨芽細胞・破骨細胞共存培養による骨形成実験

作製した糖尿病動物より、骨髄細胞を還流法にて採取した BMSC より、骨芽細胞および破骨細胞の共存培養を行い骨形成および骨吸収の機能を定量的に検証した。(図4)

Nano-DDS-Col1HB37H による骨造成のドラッグデリバリーシステム (DDS) に必要な因子として VEGF, PECAM1, ENG, NGF の mRNA 発現は、VEGF, PCAM1 は7日目までに既に発現していたが、以降減少した。Endoglin (ENG:CD105) は14日目でピークを迎えその後減少した。

また、結果、ALP 活性、オステオカルシン発現の減少と、象牙質吸収窩形成、アクチンリング形成の増加が観察された。そこで、Vit D を添加した Nano-DDS-Col1HB37H に、この糖尿病性骨粗鬆症モデルウサギの骨髄細胞より得られた細胞を付与して培養した。その結果、BMP-2、IGF-1、RANKL mRNA 発現の上昇が見られた。また、破骨細胞のトラップマークの増加が確認された。以上より、Nano-DDS-Col1HB37H は骨芽細胞と破骨細胞の機能を損なうことなく、正常な骨代謝基盤担体として使用可能なことが確認された。そこで、Nano-DDS-Col1HB37H による骨造成の効果を糖尿病性骨粗鬆症モデルウサギの大腿骨に埋入して観察した。術後13か月後では骨梁構造の増加が確認された。また、非脱灰切片による免疫組織化学分析では、I型コラーゲンの増加と早期の新生骨形成、Nano-DDS-Col1HB37H 孔内への豊富な血管新生が確認された。

以上の結果より、糖尿病動物由来骨髄細胞は、名のアパタイトコラーゲンハニカム上の培養において、培養開始7日目までに血管形成が促進され、血管内皮の形成がされつつあることが考えられた。一方、NGF は7日目から21日目まで経時的に増加した。(図5)

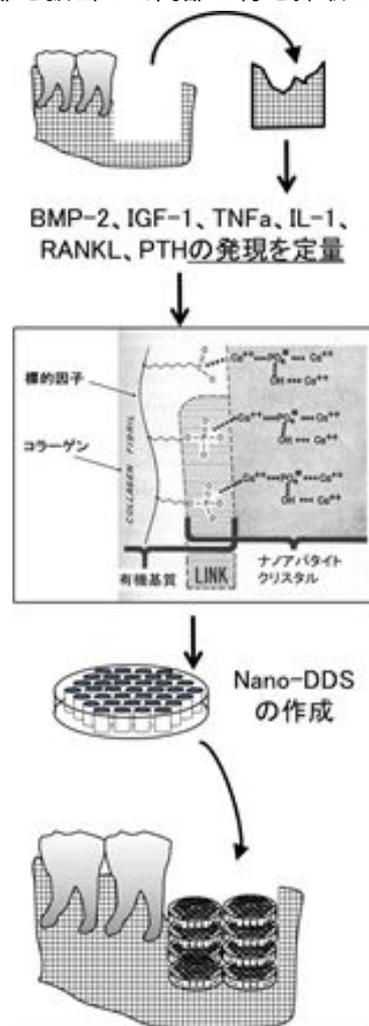


図3. 研究の概要

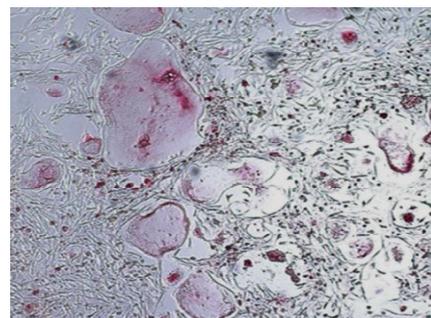


図4 骨芽細胞・破骨細胞共存培養

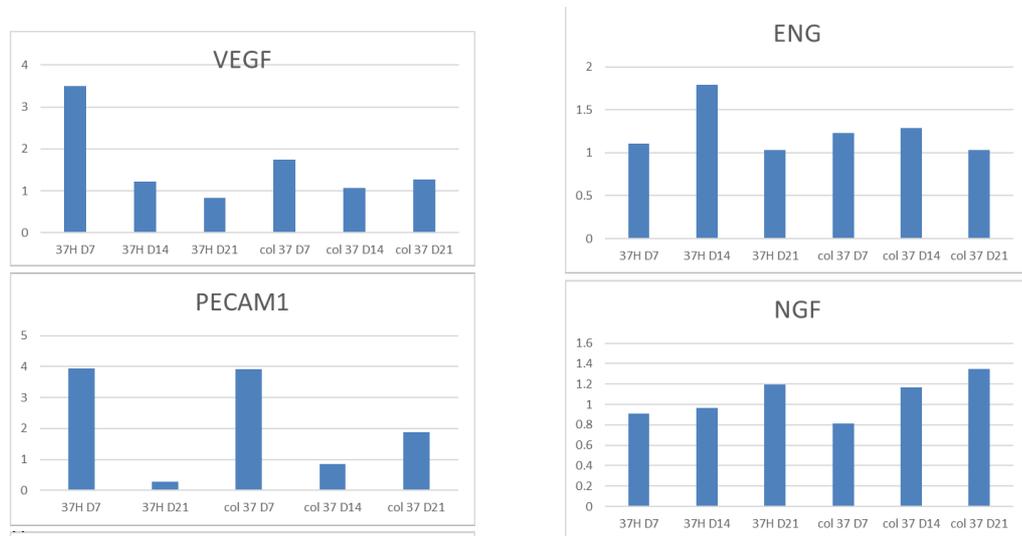
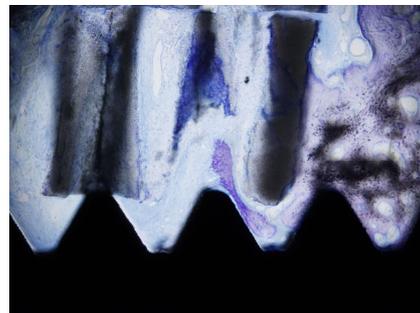


図5. Nano-DDS-CoIHB37H・DDSにおけるVEGF, PECAM1, ENG, NGFの各mRNA発現

Nano-DDS-CoIHB37H・BMP-2では、陽性対照として用いたHB37H・BMP-2と比べて、培養7日目より管腔形成が観察され、細胞の付着と増殖が増加して、培養21では細胞の密度は37孔内に充足して見られた。(図6)

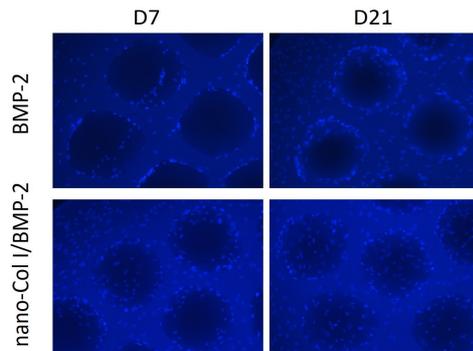
アルカリフォスファターゼ染色では、Nano-DDS-CoIHB37H・BMP-2は、陽性対照として用いたHB37H・BMP-2と比べて、培養7日目より陽性を示し(図7)、培養21では37孔内のほとんどが石灰化して見られた。(図8)



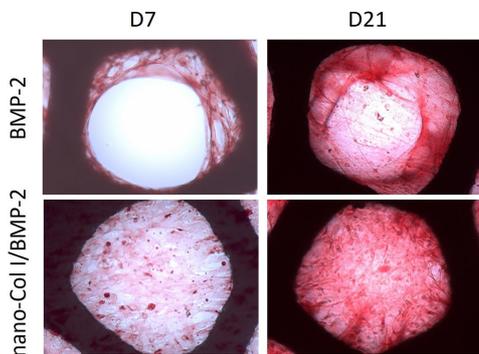
まとめ

以上の結果より、Nano-DDS-CoIHB37H・BMP-2では、陽性対照として用いたHB37H・BMP-2と比べて、糖尿病動物における未分化間葉系細胞を、VEGFの発現を上昇させることにより骨芽細胞分化を促進し、骨形成能を飛躍的に向上させることが分かった。

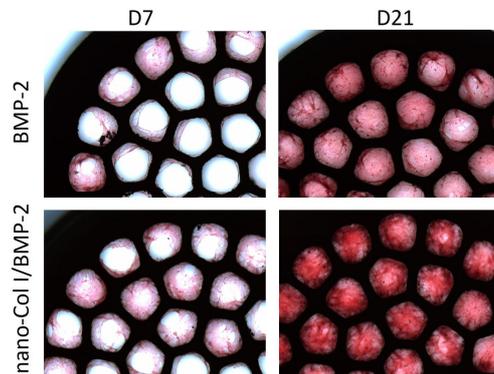
このことよりNano-DDS-CoIHB37H・BMP-2は、広範な骨欠損や骨粗鬆症および糖尿病などによる重度の歯周病等のリスクをもつ患者に対して有効な骨補填材になると考えられる。



(図6 DAPI)



(図7 ALP)



(図8 alizarin red)

5. 主な発表論文等

1. Kimitoshi Yagami, Sunao Sadaoka, Hiroshi Nakamura, Saho Komatsu, Jun Onodera, Masahiko Suzuki and Yoshinori Kuboki (2016) Atelocollagen Enhanced Osteogenesis in a Geometric Structured Beta-TCP Scaffold by VEGF Induction. J Tissue Sci Eng. 7:162.

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Tsuneo Wakabayashi, Kimitoshi Yagami, Sunao Sadaoka, Kozue Mori, Saho Komatsu, Sakae Nagasawa, Nobuyuki Udagawa. (2018) CO2 Laser Irradiation Restores Collagen and VEGF Expressions of HPdLF on LPS Contaminated Titanium Surface. J Hard Tissue Biology. 27(2): 121-130.

2. Granar J. Thirukonda, Shynsuke Uehara, Takashi Nakayama, T. Yamashita, Yukio Nakamura, Toshihide Mizoguchi, Naoyuki Takahashi, Kimitoshi Yagami, Nobuyuki Udagawa, Yoshinori Kobayashi (2016) The dynamin inhibitor dynasore inhibits bone resorption by rapidly disrupting actin rings of osteoclasts. J Bone Miner Metab. 34:395-405.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 小松佐保, 八上公利, 山本昭夫, 吉成伸夫, 宇田川信之. ヒト CD14 陽性単核細胞を用いた Siglec-15 抗体の破骨細胞の分化・延命に対する影響. 第 13 回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会, 2018 年 11 月 23 日.

2. 久保木芳徳, 古澤利武, 寺田□中石典子, 八上公利. インプラント蛋白の発見の意義と臨床応用 チタンはリン蛋白以外にコラーゲンとも結合する, 公益社団法人日本口腔インプラント学会 第 38 回東北・北海道支部学術大会, 2018 年 10 月 27 日

3. 古澤利武, 久保木芳徳, 寺田□中石典子, 八上公利. インプラント蛋白の発見の意義と臨床応用 骨タンパク質の簡易抽出法とその活性, 公益社団法人日本口腔インプラント学会 第 38 回東北・北海道支部学術大会, 2018 年 10 月 27 日.

〔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:
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: 中村 浩志

ローマ字氏名: Nakamura Hiroshi

所属研究機関名: 松本歯科大学

部局名：歯学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00278178

研究分担者氏名：川原 一郎

ローマ字氏名：Kawahara Ichiro

所属研究機関名：松本歯科大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：20319114

研究分担者氏名：定岡 直

ローマ字氏名：Sadaoka Sunao

所属研究機関名：松本歯科大学

部局名：歯学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：80459395

(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。