

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10930

研究課題名（和文）骨形成能を有したフィルム材の創成と実用化への展開

研究課題名（英文）Development and evaluation for practical use of phosphorylated-pullulan film with osteogenic capacity

研究代表者

田中 雅人（TANAKA, Masato）

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：20379754

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）：申請者らが開発したリン酸化プルランは、生体硬組織の無機成分であるアパタイトに対して強固に接着する機能性多糖誘導体である。今回、生体接着剤及びドラッグデリバリーのキャリアとして期待できるフィルム形状リン酸化プルランを開発し、BMPを組み合わせ、安全かつ低コストである骨癒合促進剤を開発することを目的とした。ラット脊椎後側方固定モデルを用いて、骨形成能について検討したところ、BMP-2添加リン酸化プルランフィルム群において、良好な骨形成を認めた。本研究において、リン酸化プルランは骨形成において細胞毒性は極めて少ないと考えられ、安全に臨床応用できる可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎外科領域では近年、低侵襲手術が多く行われるようになってきており、高齢患者に対する脊椎手術の適応は急速に拡大している。今回、リン酸化プルランをフィルム化することで、狭い術野においてもフィルムを術者が形成して至適位置に設置することが可能となる。また、フィルム状にすることで薬剤や成長因子の効果的な含有・徐放が可能となり、医療コストの低減につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The phosphorylated pullulan developed by the applicants is a functional polysaccharide derivative that firmly adheres to apatite, which is an inorganic component of living hard tissue. We aimed to develop a film-shaped phosphorylated pullulan that can be expected as a bioadhesive and a carrier for drug delivery, and to combine it with BMP to develop a safe and low-cost bone fusion promoter. The bone formation ability of the rat posterior lateral fixation model was examined, and good bone formation was observed in the BMP-2-added phosphorylated pullulan film group. In this study, phosphorylated pullulan was considered to have extremely low cytotoxicity in bone formation, and could be safely applied clinically.

研究分野：整形外科

キーワード：生体材料 リン酸化プルラン 骨形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らが開発したリン酸化プルランは、生体硬組織の無機成分であるアパタイトに対して強固に接着する機能性多糖誘導体である。これまで、殺菌剤デリバリー型の口腔ケア製品、接着性を有する生体吸収性(骨置換型)の骨補填材、接着性と硬組織誘導能を有する歯内療法用材料、埋植型医療機器に薬剤を融合したコンビネーションプロダクト、薬剤の徐放を精密制御できるドラッグデリバリーシステムなど様々な用途展開を行ってきた。当初、リン酸化プルランは歯科領域での適応を目指して開発されたが、今後は、市場規模が大きく、これからも拡大が見込まれる整形外科用途において高い国際競争力を得ることが重要であり、リン酸化プルランは整形外科領域にも十分に応用可能と考えられる。

整形外科の脊椎領域で行われる脊椎固定術は多くの疾患で行う手術法であり、高齢者の増加や手術法の進歩、それに伴う手術適応の拡大などにより手術数は増加傾向にある。しかし、高齢の患者や、骨粗鬆症や関節リウマチ等を合併した症例では術後に十分に骨癒合が得られず治療成績が不良となる症例が存在する。また、骨欠損の大きな症例や固定範囲が広範囲になる症例、再手術例等では患者の腸骨等から骨を採取して移植する自家骨移植が行われるが、採取できる骨量には限界があり、また採骨部の痛みや骨折、神経損傷などさまざまな問題が存在する。このような症例に対し応用できるよう、リン酸化プルランを成形し、加えてより強力な骨形成能を付与するべく本研究を企画するに至った。

2. 研究の目的

脊椎外科領域では近年、低侵襲手術が多く行われるようになってきており、高齢患者に対する脊椎手術の適応は急速に拡大している。しかし、侵襲が小さくなる反面、術野は狭くなるため、人工骨及び自家骨移植を併用する際には術野を拡大して骨を設置するスペースを新たに確保する必要があり、低侵襲手術のメリットが失われる場合がある。今回、リン酸化プルランをフィルム化することで、狭い術野においてもフィルムを術者が形成して至適位置に設置することが可能となる。また、フィルム状にすることで薬剤や成長因子の効果的な含有・徐放が可能となり、医療コストの低減につながると考えられる。

今回、リン酸化プルランフィルムに骨形成能を持たせるために添加する成長因子としては BMP(Bone morphogenetic protein)を用いている。欧米では骨形成蛋白である BMP が脊椎領域において広く臨床使用されており、極めて強力な骨形成・骨癒合促進作用が実証されている。しかし高濃度の BMP の使用は炎症反応や浮腫、異所性骨化などの合併症が存在し安全性が担保されておらず、本邦では臨床使用は認可されていない。また、BMP は非常に高価であるため BMP を低容量で使用でき、なおかつ投与部位に長く留めて効果を持続させることは、異所性骨化の予防、医療費の抑制に繋がると考えられる。生体接着剤及びドラッグデリバリーのキャリアとして期待できるフィルム形状リン酸化プルランと BMP を組み合わせ、安全かつ低コストである骨癒合促進剤を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

1)リン酸化プルランフィルム作成:医療用薬品カプセルなどに使用されている多糖類であるプルランにリン酸基を結合させることでリン酸化プルランを作成した。粉状のリン酸化プルランをフィルム状に形成し、リン酸化プルランフィルムを作成した。

(2)リン酸化プルランフィルムの細胞適合性の検討:ラット骨髄間質細胞を用い、リン酸化プルラン存在下に骨分化誘導を行い、アリザリンレッド染色及び RT-PCR 法を用いて骨分化への影響を検討した。

(3)ラット生体内における BMP-2 の留置能について:傍脊柱筋上に低濃度 BMP を含有させたリン酸化プルランフィルムを留置し、経時的に組織を摘出、蛍光免疫染色を行い、BMP の留置能を検討した。BMP は、欧米で骨形成を目的として既に臨床応用されている BMP-2 を用いた。

(4)ラット脊椎固定モデルにおける BMP-2 添加リン酸化プルランの骨形成能の検討:脊椎外科領域における一般的な手術法の一つである脊椎後側方固定術を再現したラット脊椎固定モデルを用い、BMP-2 添加リン酸化プルランフィルムをラット腰椎部に留置、マイクロ CT および組織学的に骨形成能を検討した。

4. 研究成果

(1) 上記の方法によりリン酸化プルランフィルムを作成した(図1, 2)

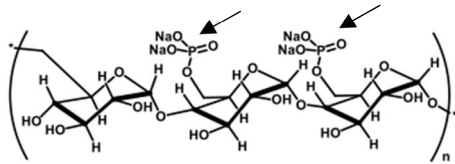


図1: リン酸化プルランの構造式を示す。矢印箇所はリン酸基により、歯や骨との結合能を持つ。



図2: リン酸化プルランフィルム。リン酸化プルランをフィルム状に形成することで、用途に応じて自由に形成可能である。

(2) ラット骨髄間質細胞を用いた骨分化誘導の検討では、アリザリンレッド染色において、リン酸化プルランの有無に関わらず、同等の石灰化(骨誘導)を認めた(図3)。RT-PCR法においても骨形成マーカーは同等の結果であった(図4)。リン酸化プルランは骨形成において細胞毒性は極めて少ないと考えられる。

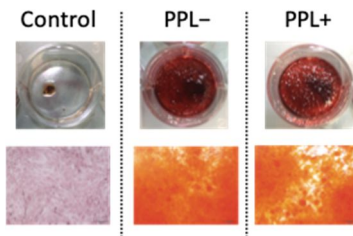


図3: アリザリンレッド染色。右の2列はラット骨髄間質細胞に骨分化誘導を行った、リン酸化プルラン(PPL)の有無に関わらず同等に染色されており、旺盛な骨分化(石灰化)を示した。

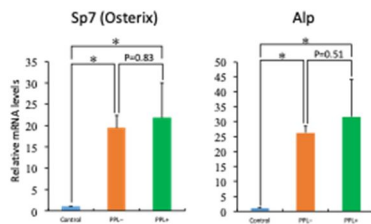


図4: 骨髄間質細胞における骨分化誘導後のRT-PCRにおいて、骨形成マーカーであるSp7(Osterix)とアルカリフォスファターゼ(Alp)はリン酸化プルランの有無に関わらず同等の結果を示した。

(3) BMP-2留置能の検討では、BMP-2免疫染色において、低用量BMP-2含有リン酸化プルランフィルムでは、生体内で留置後3日目まで残存していた(図5)。

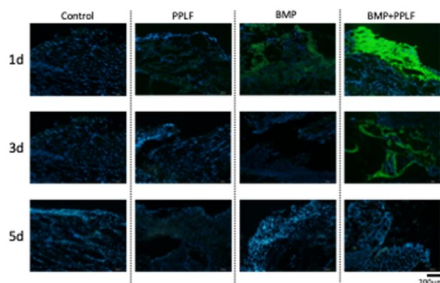


図5: 蛍光免疫染色によるBMP-2留置能の検討。ラット生体内に低用量BMP-2のみを留置した群では留置後3日目には消失していたが、リン酸化プルランフィルム(PPLF)併用群では3日目でも残留を認めた。

(4) ラット脊椎後側方固定モデルを用いた骨癒合の検討において、3D-CTではBMP-2とリン酸

化プルランフィルム併用群で良好な骨癒合を認めた(図6)。組織学的検討においても、BMP-2とリン酸化プルランフィルム併用群で、良好な骨形成を認めた(図7)。

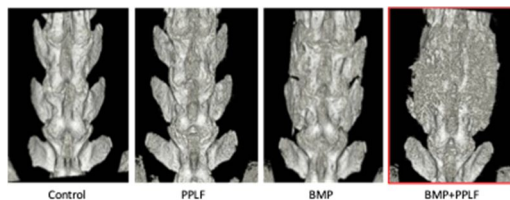


図6：ラット脊椎後側方固定モデルにおける3D-CTを用いた検討。BMPとリン酸化プルラン併用(BMP+PPLF)群では、他群と比較して良好な骨癒合が得られた。BMP単独(BMP)群でも骨形成はある程度認められるが、椎体間の癒合という面では不十分であった。

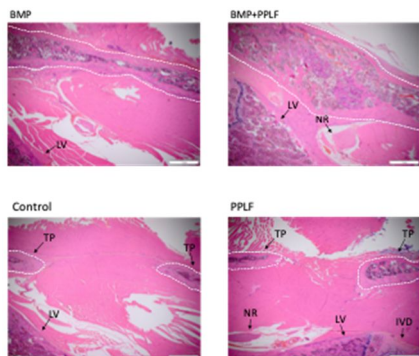


図7：ラット脊椎後側方固定モデルにおける脊椎の組織学的評価(HE染色)。BMP-2とリン酸化プルランフィルム併用(BMP+PPLF)群では、横突起(TP)間に良好な骨形成がみられた。

本研究において、リン酸化プルランは骨形成において細胞毒性は極めて少ないと考えられ、安全に臨床応用できる可能性があると考えられた。また、BMP-2免疫染色では、BMP-2はリン酸化プルランフィルムに含有させることで、生体内で3日ほどで消退しており、他のドラッグデリバリーシステムと比較し短時間であるといえる。しかし、ラット脊椎後側方固定モデルにおいては良好な骨形成を認めており、同様のモデルおよびBMP-2を用いた他の報告と比較し遜色のない結果であった。これは、リン酸化プルランフィルムが骨に結合しやすい特徴により、BMP-2が極めて効率的に骨内に吸収されたと考えられる。BMP-2の本邦での臨床応用の問題点として、異所性骨化などの安全性の点があり、リン酸化プルランはその解決策となる可能性がある。

今後は、臨床応用を進めるため、より大型の動物を使ったin-vivoでの実験などを検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 宇川諒
2. 発表標題 A Novel Phosphorylated-Pullulan Film as a Carrier for Bone Morphogenetic Protein-2 Enhances Bone Union in Rat Spinal Fusion Model
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇川諒
2. 発表標題 Usefulness of Phosphorylated-Pullulan Film with Bone Morphogenetic Protein-2 on Spinal Fusion in Rats
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	沖原 巧 (OKIHARA Takumi) (70243491)	岡山大学・自然科学研究科・講師 (15301)	
研究分担者	松川 昭博 (MATSUKAWA Akihiro) (90264283)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宇川 諒 (UGAWA Ryo) (30756656)	岡山大学・大学病院・医員 (15301)	
研究分担者	塩崎 泰之 (SHIOZAKI Yasuyuki) (00596041)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	