

令和 2 年 6 月 4 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：17K11750

研究課題名(和文) BMP-2含有人工骨膜の難治性骨疾患・骨癒合不全治療への応用

研究課題名(英文) Application of artificial periosteum containing BMP-2 to the treatment of refractory bone disease and bone nonunion.

研究代表者

大野 彩(木村彩)(Kimura-Ono, Aya)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：20584626

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)：本研究では、BMP-2含有PLGAメンブレン(BMP-2含有人工骨膜)の臨床応用に向け、イヌインプラント周囲炎骨欠損モデルでの有用性を検討した。イヌインプラント周囲炎モデルのインプラント周囲骨欠損部に自家骨を移植したが、十分な骨再生は認められなかった。次に、本モデルの骨欠損部に、BMP-2含有-TCPを移植し、その周囲をBMP-2含有人工骨膜にて被覆した。対照群にはBMP-2含有-TCPのみを移植した。その結果、BMP-2含有人工骨膜被覆群では、対照群と比較し骨再生が促された。以上の結果より、BMP-2含有人工骨膜は、インプラント周囲炎などの難治症例において有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請研究において、未だ治療に苦慮しているインプラント周囲炎に対して、BMP-2含有PLGAメンブレン(BMP-2含有人工骨膜)を応用した新規治療法を提案することが可能な大変有意義な結果が得られた。また超高齢社会に伴い、骨折による高齢者の機能低下や死亡が問題となっている。例えば、代表的な寝たきり原因である大腿骨頸部骨折の25～40%に発生する難治性骨折・骨癒合不全は、長期に渡って患者を苦痛と機能障害で苦しめるのみならず、医療・介護費の増大につながるため、予後改善が臨床的・医療経済学的に喫緊の課題とされており、本研究の発展が患者のみならず、医療経済学的にも大変有意義な成果に繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：Recently, we successfully regenerated the cortical bone-like bone, which is important to maintain the long-term stability of regenerated bone, using Escherichia coli-derived rhBMP-2 (E-rhBMP-2) adsorbed in PLGA membrane in rat model. The purpose of this study was to evaluate the E-rhBMP-2/PLGA membrane using peri-implantitis canine model. First, we generated the peri-implantitis model using beagle dogs and transplanted the autogenous bone to evaluate this animal model. Interestingly, autogenous bone graft could not recover the bone defect caused by peri-implantitis. Next, we transplanted the -TCP containing E-rhBMP-2 in bone defects and covered with PLGA membrane containing E-rhBMP-2. Only -TCP containing E-rhBMP-2 was transplanted as control group. As a result, PLGA membrane containing E-rhBMP-2 induced bone formation compared with control group. In conclusion, the PLGA membrane containing E-rhBMP-2 was efficient in bone formation in a peri-implantitis model in beagle dogs.

研究分野：骨再生治療

キーワード：BMP-2 骨再生 難治性疾患

1. 研究開始当初の背景

骨造成のゴールドスタンダードとされる自家骨移植に代わる有望な次世代骨組織再生材料として骨形成を強力に誘導する骨形成タンパク質(BMP)-2 が期待されている。すでにアメリカではチャイニーズハムスター由来の細胞から精製したリコンビナントヒト BMP-2 (rhBMP-2) をアテロコラーゲンと複合化させた骨補填材 (INFUSE[®], Medtronic, USA) が FDA により認可され、歯科領域で臨床応用も開始されている。しかし、Infuse に代表されるすでに臨床応用されている BMP-2 は動物細胞由来であるため、品質管理、大量生産が困難であり、生産コストが非常に高くなるため、一般に広く普及するには至っていない。我々は共同研究者と共に BMP-2 を大腸菌発現系で、比較的安価にかつ大量に作製することに成功し、安定した品質での供給を可能にした。そして、口腔インプラント体周囲の骨造成を目的に研究を進め、大型動物において BMP-2 と β -TCP の組み合わせで、確実にインプラント体周囲に骨を再生することが可能であることを報告し (Ono *et al.*, 2014)、現在医師主導型治療向け準備を進めている。しかし、BMP-2 と β -TCP の組み合わせで再生される骨は海綿骨が中心であり、再生骨量の維持およびインプラント体のオッセオインテグレーション獲得に有利と考えられている皮質骨を効率よく再生するには至っていない。

現在、歯科臨床で広く使用されている β -TCP は生体の骨と類似した、リン酸カルリウムが主成分であり、本材料は破骨細胞により代謝され、吸収されることが知られている。一方、BMP-2 は骨芽細胞、破骨細胞の両細胞に作用し、骨代謝のターンオーバーを促進することが知られている。そのため、 β -TCP を BMP-2 と同時に投与すると、 β -TCP の単体投与群と比較し、 β -TCP が早期に吸収されることが推測される。実際、ミニプタ上顎洞底挙上術モデルにおいて、移植 4 週後に、 β -TCP 移植群では、移植部位に β -TCP の残留が確認されたが、 β -TCP/BMP-2 移植群では、すべての β -TCP が吸収され、海綿骨に置き換わっている像が観察された。そこで、皮質骨を効率よく再生させるには、より長期に骨再生のために必要なスペースを確保し、BMP-2 を作用させ骨再生を促す必要があり、そのためには、骨代謝により影響を受けない吸収性生体材料を BMP-2 のキャリアとして応用する必要があると考えた。乳酸・グリコール酸重合体 (PLGA) は既に様々な医療現場で応用されている吸収性生体材料の一つであり、歯科の分野において、骨再生を目的とした GBR 治療の遮断膜として用いられている。この PLGA はエステル主鎖の単純な加水分解により分解され、生体内で吸収されることが知られている。

そこで我々は、この骨代謝の変化により分解速度の影響を受けない PLGA を BMP-2 のキャリアとして用いることで、効率よく皮質骨再生を促すことができるのではないかと考えた。そして、ラット頭蓋骨骨欠損・骨膜欠損モデルにおいて、BMP-2 を含浸させた PLGA メンブレンを応用することで、BMP-2 と β -TCP の組み合わせでは決して達成することのできなかった、骨髄組織をほとんど含まない皮質骨様骨組織が再生されるという大変興味深い結果を得た (Ono *et al.*, 2013)。また、一連の研究の中で、ゼラチンやアテロコラーゲンなどをキャリアに用い実験を実施したが、吸収速度、空間保持能などの問題から、皮質骨の再生には、PLGA メンブレンが BMP-2 の最も優れたキャリアであることを明らかとした。そして本メンブレンは、皮質骨周囲に存在する骨再生能を有する骨膜と類似した機能を有することから、人工骨膜と名付け (以降、BMP-2 含有人工骨膜)、2016 年に本技術の特許を取得した。(『人工骨膜の作成方法』特許第 5924610 号)

しかし、我々が開発を進めてきた BMP-2 含有人工骨膜が、大型動物や骨再生に厳しい条件下にて確実に皮質骨再生が可能なのか、その詳細は明らかでない。実際、インプラント周囲炎や歯周病などにより骨が吸収し、その部位が不良肉芽にて満たされ、慢性の炎症が存在する部位には健全な骨膜が存在しないためか、再生療法がうまくいかないケースがある。このような、疾患に対し我々が開発してきた人工骨膜が有用ではないかと考えた。

2. 研究の目的

本申請研究は、BMP-2 含有人工骨膜の臨床応用に向け、イヌインプラント周囲炎モデルを構築し、BMP-2 含有人工骨膜の有用性を検討する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) BMP-2 含有 PLGA メンブレンの厚みが再生された皮質骨の厚みに与える影響の検討

我々が開発を進めてきた BMP-2 含有人工骨膜 (BMP-2 含有 PLGA メンブレン)の厚みを变化させることで再生する皮質骨の厚みをコントロールすることが可能かを検討するため、BMP-2 含有 PLGA メンブレンを重ねて使用することで厚みを変えて (1 枚, 5 枚), ラットの背部皮下に移植した。移植 16 週後に回収し, micro-CT にて解析を行った。その後, EDTA にて脱灰し, パラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) にて組織学的解析を行った。

(2) 難治性イヌインプラント周囲炎モデルの構築

イヌのインプラント周囲炎モデルの構築を目的に, 下顎の左右の小白歯を 4 本すべて抜歯し, 8 週間の治癒を待って, 抜歯した小白歯部にインプラント体を一定の間隔を開けて 2 本埋入した。8 週後にインプラント体の近心もしくは遠心に(5×5×5 mm) 1 壁性の骨欠損を作製し, 骨欠損部にシリコン印象材を注入し, 感染を惹起した。2 週間後に臨床で行う処置と同様, 不良肉芽を搔爬し, インプラント体に β -TCP アブレーションを行い, 感染源を除去した。そして, 骨欠損部に何も移植しない群 (対照群), および自家骨を同一口腔内から採取し移植した群 (自家骨群) を作製し, フラップを戻して緊密に縫合した。8 週後に組織を回収し, micro-CT を用いた 3 次元解析を実施した。

(3) 難治性イヌインプラント周囲炎モデルを用いた BMP-2 含有人工骨膜の有用性の検討

上記で作製した難治性イヌインプラント周囲炎モデルの骨欠損部に, BMP-2 と β -TCP 複合体を移植し, その周囲を BMP-2 含有 PLGA メンブレンにて被覆し, フラップを戻して緊密に縫合した。対照群として, BMP-2 と β -TCP 複合体を移植した。移植 16 週後に組織を回収し, micro-CT を用いた 3 次元解析および, 非脱灰・研磨切片を作製し, Villanueva Bone 染色を行った。

4. 研究成果

(1) BMP-2 含有 PLGA メンブレンの厚みが再生された皮質骨の厚みに与える影響の検討

Micro-CT 解析の結果, 1 枚の BMP-2 含有 PLGA メンブレンを移植した群と比較し, 5 枚の BMP-2 含有 PLGA メンブレンを移植した群において明らかに厚い骨様の組織が再生されている像が観察された。HE 染色の結果を図 1 に示す。HE 染色の結果から, 再生された組織は骨組織であることが確認された。しかし, 一部 PLGA メンブレンが吸収することなく, 残存している群があった。本結果より, 周囲から骨が形成されるが, PLGA が厚過ぎたため内部の PLGA の加水分解の速度が遅く 16 週では骨に置換しなかった可能性が示唆される。そのため, もう少し PLGA メンブレンの厚みを薄くする必要があると考えられる。今後, PLGA メンブレンを 2 枚, 3 枚の群も作製し検討する予定である。また, BMP-2 含有 PLGA メンブレ 1 枚の群で問題なく皮質骨様の骨再生を誘導することが確認できたため, イヌを用いた実験では, 1 枚の BMP-2 含有 PLGA メンブレンで実施することとした。

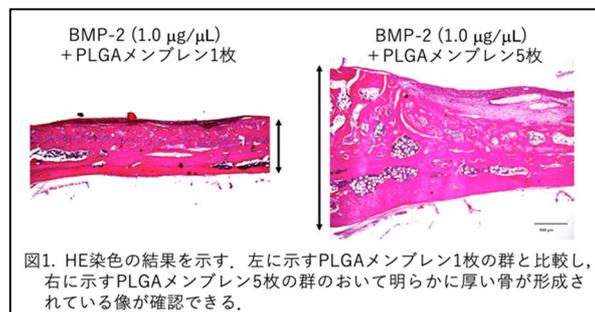


図1. HE染色の結果を示す。左に示すPLGAメンブレン1枚の群と比較し, 右に示すPLGAメンブレン5枚の群において明らかに厚い骨が形成されている像が確認できる。

(2) 難治性イヌインプラント周囲炎モデルの構築

8 週後に組織を回収し, micro-CT 解析を行った。その結果, 対照群と比較し, 自家骨群において, インプラント体周囲に骨再生が有意に促されていないことが確認された。骨再生において gold standard とされる自家骨移植においても骨再生をうまく促すことができなかったことから, 本動物モデルを, 難治性イヌインプラント周囲炎モデルとして, 次の実験に用いることとした。

た。

(3) 難治性イヌインプラント周囲炎モデルを用いた BMP-2 含有人工骨膜の有用性の検討

Micro-CT および組織学的解析の結果、対照群である BMP-2/ -TCP 複合体を移植した群では、移植された -TCP は全て骨に置換されていたが、骨欠損部は完全に骨によって置換されていなかった。一方、骨欠損部に BMP-2/ -TCP 複合体を移植し、BMP-2 含有 PLGA メンブレンにて被覆した群において、対照群と比較し明らかに骨再生量が多く、組織学的解析の結果から、骨に置換されていることが確認された。以上の結果より、BMP-2 含有 PLGA メンブレンを応用することで、難治性骨欠損に対しても、安定して骨再生を促す可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nguyen Ha Thi, Ono Mitsuaki, Oida Yasutaka, Hara Emilio Satoshi, Komori Taishi, Akiyama Kentaro, Nguyen Ha Thi Thu, Aung Kyaw Thu, Pham Hai Thanh, Tosa Ikue, Takarada Takeshi, Matsuo Koichi, Mizoguchi Toshihide, Oohashi Toshitaka, Kuboki Takuo	4. 巻 34
2. 論文標題 Bone Marrow Cells Inhibit BMP-2-Induced Osteoblast Activity in the Marrow Environment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 327 ~ 332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/jbmr.3598	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 三海晃弘, 大野充昭, 納所秋二, 土佐郁恵, 縄稚久美子, 大野 彩, 窪木拓男, 大橋俊孝
2. 発表標題 マウス薬剤関連性顎骨壊死モデルにおける BMP-2の骨形成能の検討
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田仲由希恵, 大野充昭, 納所秋二, 石橋 啓, 三海晃弘, 土佐郁恵, 笈田育尚, 大野 彩, 秋山謙太郎, 大橋俊孝, 入江洋之, 窪木拓男
2. 発表標題 大型動物歯槽骨欠損モデルを用いた大腸菌由来rhBMP-2の骨再生能の検討
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuji Noshoh, Mitsuaki Ono, Akihiro Mikai, Kumiko Nawachi, Aya Kimura-Ono, Emilio S Hara, Takuo Kuboki, Toshitaka Oohashi
2. 発表標題 Bone-inducing effects of rhBMP-2 and rhFGF-2 in bone marrow microenvironment
3. 学会等名 International Association for Dental Research (IADR) 98th General Session and Exhibition and 49th Annual Meeting of the American Association for Dental Research (AADR) (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihiro Mikai, Mitsuaki Ono, Shuji Noshio, Ikue Tosa, Emilio S Hara, Aya Kimura-Ono, Kumiko Nawachi, Takuo Kuboki, Toshitaka Oohashi
2. 発表標題 BMP-2 local administration for MRONJ-mice induced partial bone regeneration
3. 学会等名 International Association for Dental Research (IADR) 98th General Session and Exhibition and 49th Annual Meeting of the American Association for Dental Research (AADR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ha Thi Thu Nguyen, Mitsuaki Ono, Emilio Satoshi Hara, Taishi Komori, Midori Edamatsu, Tomoko Yonezawa, Aya Kimura-Ono, Kenji Maekawa, Takuo Kuboki, Toshitaka Oohashi
2. 発表標題 A new function of Type XVIII collagen in Basement Membrane of Oral Mucosa: a regulator of Keratinization
3. 学会等名 11th international conference on proteoglycans in Kanazawa (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aya Kimura-Ono, Kenji Maekawa, Takuo Kuboki.
2. 発表標題 Prosthetic treatment can improve dietary diversity among Japanese outpatients.
3. 学会等名 International Association for Dental Research (IADR) 98th General Session and Exhibition and 49th Annual Meeting of the American Association for Dental Research (AADR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三海晃弘, 大野充昭, 納所秋二, 土佐郁恵, 縄稚久美子, 大野 彩, 窪木拓男, 大橋俊孝
2. 発表標題 マウス薬剤関連性顎骨壊死モデルにおける BMP-2の骨形成能の検討
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田仲由希恵 , 大野充昭, 納所秋二 , 石橋 啓, 三海晃弘, 土佐郁恵 , 笈田育尚 , 大野 彩 , 秋山謙太郎 , 大橋俊孝, 入江洋之, 窪木拓男
2. 発表標題 大型動物歯槽骨欠損モデルを用いた大腸菌由来rhBMP-2の骨再生能の検討
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuji Noshoh, Mitsuaki Ono, Akihiro Mikai, Kumiko Nawachi, Aya Kimura-Ono, Emilio S Hara, Takuo Kuboki, Toshitaka Oohashi
2. 発表標題 Bone-inducing effects of rhBMP-2 and rhFGF-2 in bone marrow microenvironment
3. 学会等名 International Association for Dental Research (IADR) 98th General Session and Exhibition and 49th Annual Meeting of the American Association for Dental Research (AADR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihiro Mikai, Mitsuaki Ono, Shuji Noshoh, Ikue Tosa, Emilio S Hara, Aya Kimura-Ono, Kumiko Nawachi, Takuo Kuboki, Toshitaka Oohashi
2. 発表標題 BMP-2 local administration for MRONJ-mice induced partial bone regeneration
3. 学会等名 International Association for Dental Research (IADR) 98th General Session and Exhibition and 49th Annual Meeting of the American Association for Dental Research (AADR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ha Thi Thu Nguyen, Mitsuaki Ono, Emilio Satoshi Hara, Taishi Komori, Midori Edamatsu, Tomoko Yonezawa, Aya Kimura-Ono, Kenji Maekawa, Takuo Kuboki, Toshitaka Oohashi
2. 発表標題 A new function of Type XVIII collagen in Basement Membrane of Oral Mucosa: a regulator of Keratinization
3. 学会等名 11th international conference on proteoglycans in Kanazawa (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakagawa S, Kimura-Ono A, Kurosaki Y, Koyama E, Numoto K, Tokumoto K, Mino T, Hara ES, Maekawa K, Kuboki T
2. 発表標題 Evaluating minimally important differences in OHRQOL appraisal after prosthodontic rehabilitation.
3. 学会等名 The 96th General Session & Exhibition of the IADR. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nguyen HT, Ono M, Oida Y, Hara ES, Komori T, Akiyama K, Nguyen HTT, Aung KT, Pham HT, Oohashi T, Kuboki T
2. 発表標題 Novel function of BMP-2 to prohibit bone formation in marrow environment.
3. 学会等名 The American Society of Bone and Mineral Research. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nguyen HTT, Ono M, Kimura-Ono A, Komori T, Koyama E, Oohashi T, Kuboki T
2. 発表標題 Analysis bacterial flora of infected shunt in dialysis patients and its relation to oral flora.
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 納所秋二, 大野充昭, 三海晃弘, 筈田育尚, 小盛大志, 土佐郁恵, 大野 彩, 窪木拓男.
2. 発表標題 臨床応用に向けたイヌソケットプリザベーションモデルの構築ならびに大腸菌由来BMP2/ TCP複合体の有効性の検討
3. 学会等名 第48回 日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2017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	大野 充昭 (Ono Mitsuaki) (60613156)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授 (15301)	
研究分担者	窪木 拓男 (Kuboki Takuo) (00225195)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究分担者	三野 卓哉 (Mino Takuya) (10625718)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	
研究分担者	宝田 剛志 (Takarada Takeshi) (30377428)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・研究教授 (15301)	
研究分担者	笈田 育尚 (Oida Yasutaka) (50625720)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	