

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11778

研究課題名(和文) 層構造を有する新規生分解性PLGAメンブレンの開発

研究課題名(英文) Development of layered bio-degradable PLGA membranes

研究代表者

佐々木 淳一 (Sasaki, Jun-ichi)

大阪大学・歯学研究科・講師

研究者番号：50530490

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)：本研究では、層構造を有するPLGAメンブレンを試作し、それが安全かつ効率的な組織再生を誘導する生体材料として応用可能であるかを検証することを目的とした。本研究の結果、試作メンブレンは臨床使用に適した機械的性質と優れた辺縁封鎖性を有しており、さらに、組織再生を担う間葉系幹細胞の挙動を制御できることが明らかとなった。また、動物実験の結果から、試作メンブレンは市販のPLGAメンブレンに比べて上皮組織を遮蔽する機能を長期間にわたり発揮することが分かった。以上の結果から、本研究で開発した二層性PLGAメンブレンは歯周組織再生を効率よく誘導する新規のGTR法用材料として有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、歯科で使用されている生体吸収性メンブレンには、動物由来材料を用いたものとPLGAを基材としたものがあるが、いずれも細胞の接着や増殖、分化等の挙動を制御する能力は備えていない。一方、本研究で開発に成功した二層性PLGAメンブレンは、組織再生を担う細胞の挙動制御を可能にする新規の生体吸収性材料であり、次世代の歯周組織再生技術の発展に貢献できると考えられるため、大きな社会的意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to evaluate the physicochemical and biological characteristics of bilayer biodegradable PLGA membrane, and to assess whether the bilayer PLGA membrane could be used for periodontal tissue regeneration. Physicochemical analyses revealed that bilayer membranes possessed appropriate mechanical properties for clinical use and excellent barrier effects to seal bone defects. It was also confirmed that porous layer of the membrane promoted proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, thus resulting in bone regeneration in vivo. The present study demonstrates that the bilayer biodegradable PLGA membranes fabricated facilitate tissue regeneration in vivo, and therefore represent a prospective biomaterial for GTR therapy.

研究分野：生体材料学

キーワード：歯科材料学 生体材料学 歯周組織再生療法 歯科用メンブレン PLGA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重度の歯周病に対しては組織再生誘導法による治療が行われており、本手法においては、上皮組織と結合組織、またそれらを構成する歯肉線維芽細胞の選択的排除を目的として、生体吸収性メンブレンが用いられている。現在、臨床で使用されている歯周組織再生用生体吸収性メンブレンには、動物由来材料を用いたものとポリ乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) を基材としたものがあるが、前者は生体安全性の点で理想的とは言えず、また、いずれのメンブレンも細胞の接着や増殖、分化等の挙動を制御する能力は備えていない。

我々はこれまで、高分子を用いた生体材料の開発に関する研究を行い、細胞培養基材となる高分子の機械的強度の変化によって骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) の細胞増殖率や骨系分化の表現形が変化することを明らかにしてきた (Sasaki J, *et al.* Soft Matter, 2010)。さらに、生体高分子の形態を変化させることで、再生される骨組織の構造が変わることを示した (Sasaki J, *et al.* J Biomed Mater Res A, 2015)。

これらを背景として、申請者らは、PLGA メンブレンの表裏に異なる表面構造を付与することで、組織再生を担う細胞の接着・増殖挙動を制御することが可能となり、より確実な歯周組織再生療法を実現できるのではないかと着想した。すなわち、PLGA メンブレンの一方の面に密な構造 (層)、他方の面に疎な層を付与することで、組織再生を担う細胞の接着、増殖や分化を選択的に制御できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、生体内で安全かつ効率的に組織再生を誘導できる層構造を有した生体吸収性メンブレンを創製することを目的とした。すなわち、メンブレンの表裏に異なる表面構造を付与し、組織再生を担う細胞の挙動制御を可能にする生体吸収性材料を開発することとした。

3. 研究の方法

1) 二層性 PLGA メンブレンの作製

PLGA を 1,4-ジオキサランに溶解し、冷却したステンレス板を用いて段階的に PLGA 溶液を凍結した。この溶液を凍結乾燥装置を用いて乾燥させることで、二層性 PLGA メンブレンを作製した。この際、二層性 PLGA メンブレンに形成された密な性状の層を外層、反対側の疎な性状の面を内層と定義した。コントロールには、試作メンブレンと乳酸:グリコール酸の配合比率が同じである市販の PLGA メンブレン (GC メンブレン) を使用した。

まず、二層性 PLGA メンブレンの構造を観察することを目的として、メンブレンの表面および切断面に金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。さらに、各メンブレンの表面粗さを形状解析レーザー顕微鏡を用いて測定した。

2) 機械的性質の検討

縫合系引き抜き試験を行うために各メンブレンから 10.0 x 40.0 mm の試験片を切り出した。準備した試料の一方を治具で把持し、もう一方の断端の midpoint に縫合系を通した。次に、万能試験機を用いてクロスヘッドスピード 1.0 mm/min で長軸方向に縫合系を牽引し、得られた最大試験力と最大ストロークから、引き抜き強さと破断ひずみを算出した。

各メンブレンの臨床使用上の操作性を評価する目的で、模型を用いた適合性の評価を行った。重ね合わせのためのランドマークを設置したエポキシ製歯周病模型を作製し、これに各メンブレンを吸収性縫合系を用いて設置した。次に、各メンブレンを設置した骨欠損模型をマイクロ CT で撮影し、計測点からメンブレン内層表面までの最短距離を測定することで、メンブレンの適合性を評価した。

3) 二層性 PLGA メンブレン上における細胞挙動の検討

各メンブレンを 10.0 x 10.0 mm に切り出し、二層性メンブレンについては外層と内層のいずれかが上面になるようにして、12 well マイクロプレートに固定した。各ウェルに 5.0×10^3 cells のヒト由来 BMSC を播種し、1, 3, 7 または 12 日間培養後に 4% パラホルムアルデヒド水溶液を用いて固定処理を行い、SEM 観察を行った。さらに、同様に細胞を培養した試料に対して、Cell counting Kit-8 を用いて細胞数を測定した。

次に、各メンブレン上における BMSC の骨系分化誘導効率を評価することを目的として、メンブレン上で BMSC を骨芽細胞分化誘導培地で 21 日間の培養後、von Kossa 染色を行うことで BMSC によって産生された石灰化基質を可視化した。

4) *In vivo* での組織再生能評価

オス 10 週齢の Sprague-Dawley ラットに外径 5.0 mm のトレフィンバーを用いて頭蓋骨に骨欠損を形成した。次に、直径 7.0 mm の円形に切り出した各メンブレンで骨欠損部を被覆し、吸収性縫合系を用いて閉鎖した。メンブレン適用から 4 または 8 週間後に試料を摘出し、マイクロ CT で撮影することで骨欠損部における新生骨の体積割合を計測した。さらに、摘出した試料の脱灰後にパラフィン包埋薄切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施すことで組織学的検討を行った。

4. 研究成果

1) 二層性 PLGA メンブレンの材料学的特性

二層性 PLGA メンブレン表面の SEM 観察の結果、外層表面が密な構造、内層表面が多孔性の構造を呈していることが分かった(図 1 A, B). さらに、断面の SEM 像から、試作したメンブレンは、充実性で密な外層と多孔性で疎な内層で構成されていることが明らかとなった(図 1 C). また、レーザー顕微鏡による三次元観察の結果、外層表面では均等で小さな隆起が全体的に見られたが、内層表面は大小さまざまな隆起が認められ、これはコントロールの表面粗さよりも大きかった。これらの結果から、PLGA 溶液を段階的に凍結乾燥処理することで、二層構造を有する PLGA メンブレンが作製できることが示された。

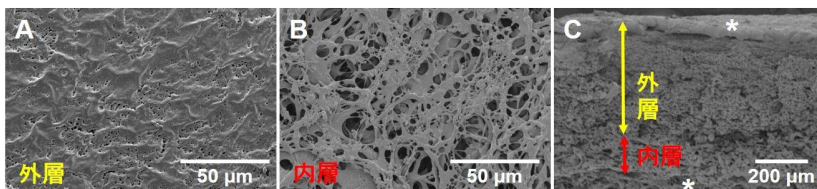


図 1. 二層性 PLGA メンブレン
二層性 PLGA メンブレンの(A)外層表面、(B)内層表面、(C)断面の SEM 像。図中の*はメンブレン表面を示す。

2) 機械的性質の検討

二層性 PLGA メンブレンの機械的性質を検討した結果、縫合系引き抜き強さは 0.88 ± 0.07 N/mm² であり、コントロール (1.85 ± 0.32 N/mm²) と比較して有意に低い値を示した。一方、引き抜き試験における破断ひずみは、試作メンブレンとコントロール間において有意差は認められなかった。このことから、試作メンブレンは、引きちぎろうとする応力には弱いものの、縫合時にはコントロールと同様に伸びやすい性質を発揮することが確認された。

また、試作メンブレンの歯周病模型への適合性を評価したところ、計測点のすべてにおいて、コントロールと比較してメンブレン - 模型間距離が有意に短いという結果が得られた。以上の結果から、試作メンブレンは、強度についてはコントロールに劣るものの縫合系による牽引力に耐えることが可能であり、さらに、すぐれた辺縁封鎖性をもたらす適合性を備えていることから、臨床で使用可能な材料であることが明らかとなった。

3) 二層性 PLGA メンブレン上における細胞挙動の検討

二層性メンブレン上に播種した BMSC を SEM で観察した結果、内層表面で多くの細胞が接着し、伸展している様子が認められた。一方、試作メンブレンの外層表面に接着した細胞数は少なく、また形態も球状で伸展が見られなかった。各メンブレン上の細胞数を定量評価したところ、培養 12 日後には、試作メンブレンの内層表面で、外層表面やコントロールよりも有意に細胞数が多いことが分かった。また、培養 12 日後の試作メンブレン外層表面の細胞数は、コントロールと比較して有意に少なかった。

各メンブレン上で BMSC を骨系分化誘導培養し、von Kossa 染色を施した結果、試作メンブレンの内層表面では、外層表面やコントロールよりも多くの石灰化基質の沈着が認められた。

以上の結果から、二層性メンブレンの内層表面では細胞の増殖が促進され、また、間葉系幹細胞の分化を促して基質産生能を高めることが分かった。

4) *In vivo* での組織再生能評価

二層性メンブレンを 4 週間適用した群では、コントロールと比較して新生骨量の割合に有意差は認められなかったが、8 週間適用した群においては、コントロールよりも新生骨が有意に多く形成される結果となった(図 2 A, B). メンブレン適用 8 週間後の試料の組織学的検討の結果、試作メンブレンの内層においては、結合組織がメンブレン内部に侵入していることが分かった。一方、外層では表面に細胞群が付着している様子が認められるものの、メンブレン内部への組織の侵入は見られなかった。コントロールにおいては、結合組織のみならず、新生骨もメンブレン内部に侵入している様子が観察された(図 2 C, D). 以上のことから、試作メンブレンでは、*in vitro* で確認された細胞挙動を制御する機能が *in vivo* でも長期間にわたり発揮され、骨組織の再生が促されることが示された。

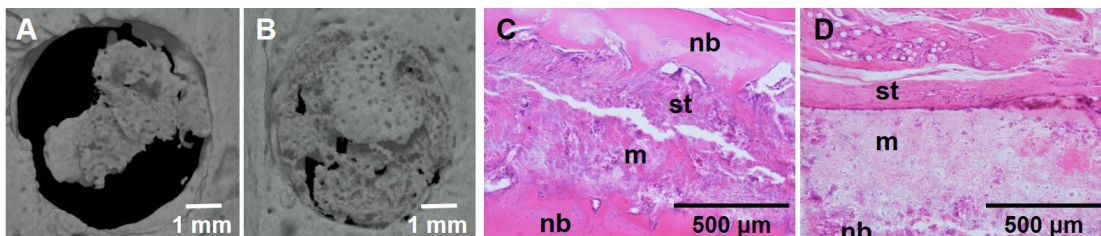


図 2. メンブレンの組織再生能評価。各メンブレンの適用 8 週間後のマイクロ CT 像(A, B)および HE 染色像(C, D)を示す。(A, C)コントロール、(B, D)二層性 PLGA メンブレン、nb: 新生骨、m: メンブレン、st: 軟組織。

本研究において、内外層で異なる性状を有する二層性の PLGA メンブレンを作製することに成功した。この二層性 PLGA メンブレンは、臨床使用可能な材料学的特性を有し、組織再生を担う細胞の挙動を制御することで組織再生に有利に働くことから、歯周組織再生を効率よく誘導する新規の生体吸収性材料として有用である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Yoshimoto I, Sasaki JI, Tsuboi R, Yamaguchi S, Kitagawa H, Imazato S.	4. 巻 34
2. 論文標題 Development of layered PLGA membranes for periodontal tissue regeneration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dental Materials	6. 最初と最後の頁 538-550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dental.2017.12.011.	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 -
1. 著者名 Sasaki JI, Katata C, Abe GL, Matsumoto T, Imazato S.	4. 巻 107
2. 論文標題 Fabricating large-scale three-dimensional constructs with living cells by processing with syringe needles.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 904-909
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.a.36613.	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 -
1. 著者名 Sasaki JI, Kiba W, Abe GL, Katata C, Hashimoto M, Kitagawa H, Imazato S.	4. 巻 35
2. 論文標題 Fabrication of strontium-releasable inorganic cement by incorporation of bioactive glass.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dental Materials	6. 最初と最後の頁 780-788
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dental.2019.02.019	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 -
1. 著者名 Abe GL, Sasaki JI, Katata C, Kohno T, Tsuboi R, Kitagawa H, Imazato S.	4. 巻 36
2. 論文標題 Fabrication of novel poly(lactic acid/caprolactone) bilayer membrane for GBR application.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dental Materials	6. 最初と最後の頁 626-634
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dental.2020.03.013	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 -

1. 著者名 Sasaki JI, Yoshimoto I, Katata C, Tsuboi R, Imazato S.	4. 巻 108
2. 論文標題 Freeze-dry processing of three-dimensional cell constructs for bone graft materials.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 958-964
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.b.34448	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉本いつみ, 壺井莉理子, 北川晴朗, 佐々木淳一, 今里 聡.
2. 発表標題 試作二層性GTR用メンブレンの組織再生誘導能の評価.
3. 学会等名 第69回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Abe GL, Sasaki JI, Kitagawa H, Kohno T, Tsuboi R, Imazato S.
2. 発表標題 In vitro evaluation of a novel poly(lactic acid/caprolactone) bilayer membrane for GBR application.
3. 学会等名 第72回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木淳一, 騎馬和歌子, アベ ガブリエラ, 堅田千裕, 北川晴朗, 今里 聡.
2. 発表標題 Sr徐放型バイオアクティブガラスのグラスアイオノマーセメントへの応用.
3. 学会等名 第73回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神野友樹, Abe Gabriela, 壺井莉理子, 北川晴朗, 佐々木淳一, 今里 聡.
2. 発表標題 新規吸収性GBRメンブレンの生体分解性と生体安全性のin vivo評価.
3. 学会等名 大阪大学歯学会第128回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Abe G, Sasaki JI, Kohno T, Tsuboi R, Imazato S.
2. 発表標題 Poly(lactic acid/caprolactone) bilayer membrane with slower degradation promotes bone formation in vivo.
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research, Asia Pacific Region 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座（歯科理工学教室） https://web.dent.osaka-u.ac.jp/techno/ 大阪大学 研究者総覧 http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=2796&a2=0000007&o=affiliation&sm=affiliation&sl=ja&sp=2</p>
--

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	今里 聡 (Imazato Satoshi) (80243244)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	