

令和元年6月3日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17227

研究課題名(和文)免疫回避機能を有するPEG骨再生材料の開発

研究課題名(英文)Development of bone regenerative material evacuating immune response

研究代表者

李佩祺(LI, Peiqi)

大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤)

研究者番号：70782100

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): バイオマテリアルの研究分野において炎症などの生体反応を積極的に制御する材料の開発が試みられている。免疫応答をうまく制御することは、直接的に病気を治すという戦略だけでなく、従来のバイオマテリアル治療の効果をより促進する戦略としても有用である。本研究では、牛骨由来骨補填材の骨形成能と免疫応答をラット頭蓋冠骨欠損モデルにて評価した。また、免疫制御機能を有する骨再生材料を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究期間においては、主に基礎的知見として牛骨由来骨補填材の骨形成能および免疫応答をラット頭蓋冠骨欠損モデルを用いて明らかにした。牛骨由来リン酸カルシウムは、現在臨床において多用されている骨補填材であり、同材料の骨形成能や免疫応答の結果は臨床的にも意義を持つと考える。また、抗炎症効果を持つ成分との融合により同材料の骨形成能を高める予備的な結果もあわせて得た。これらの知見は新たな免疫制御型骨再生材料開発への基盤知見として活用が可能であると予想される。

研究成果の概要(英文): The various approaches are undergoing to develop the biomaterials controlling the inflammation and immune reaction. Controlling the inflammation is promising strategy not only to cure the diseases, but also to strengthen the ability of biomaterials for regenerative medicine. Bovine derived calcium phosphate granules is widely applied in the dental practice in world wide. Critical sized bone defect of rat calvaria is conventional method to elucidate the bone forming capability of biomaterials. In the present study, we tried to verify the bone forming ability and immune reaction of bovine derived calcium phosphate granules in the bone defect of rat calvaria. Additionally, we elucidated the bone forming capability of bovine derived calcium phosphate granules combined with anti-immune reaction substances. This combination yielded superior bone formation than the single use of bovine derived calcium phosphate granules.

研究分野：口腔インプラント学

キーワード：骨補填材

## 1. 研究開始当初の背景

一般に、組織、臓器の欠損あるいは障害が生じた場合、修復の有無に関係なく、最初にかかるイベントは炎症であり、炎症の程度により組織修復は大きく影響を受けることが考えられる。例えば、細胞の増殖分化能力を高め、生体のもつ自然治癒力を増強させ病気を治す再生医療では、体内で細胞の能力を高めるために、3次元の細胞足場材料などが用いられる。組織修復に適した条件下では、細胞は足場内で増殖、分化し、生体組織は再生修復される。ところが、用いる細胞や材料が体内環境に合っていない場合、過度の炎症が起こり、再生修復は進まない。また、初期にうまく再生修復が見られた場合でも、長期間の埋入後には材料あるいはその分解物により誘導される炎症によって、再生組織が吸収されてしまうこともある。すなわち、炎症・免疫反応は組織の再生修復の結果を左右する (Peiqi Li et.al, *Int J Mol Sci.* 2015)。

骨再生材料は、人工・生体高分子 (コラーゲン)、無機材料 (リン酸カルシウム) などが考えられるが、それぞれリン酸三ナトリウムなどの様に生体内で分解される材料と、ハイドロキシアパタイト等のように分解性の乏しい材料に分類される。従来、化学的に不活性な材料は生体内非分解性であるため生物学的にも不活性と誤解されてきたが、非特異的免疫応答は存在する。申請者らはラット頭蓋骨で臨界欠損を作り、骨欠損作製時に得られた頭蓋冠の骨を自家骨とし移植しその経過を観察した (Peiqi Li et.al, *Int J Mol Sci.* 2015)。自家骨移植から再生した骨の吸収には、マクロファージ、リンパ球が観察され、大量の TNF- $\alpha$  と RANKL が分泌し、破骨細胞分化を促進していた。更に、自家骨の吸収だけではなく、新生骨も大きく吸収された。また、同様の現象は、人工材料である  $\alpha$  型リン酸三カルシウムとコラーゲンの複合体でも認められた (Peiqi Li et.al, *Int J Mol Sci.* 2015)。これらの環境下において材料移植 4 週後のラットの移植部にインターフェロン  $\gamma$  を注射したところ新生骨が吸収することなく骨再生が更新することを見出した (免疫反応のコントロール)。以上の知見は、免疫機能の制御が骨再生に大きな影響を与えることを再認識させる。

## 2. 研究の目的

バイオマテリアルの研究分野において炎症などの生体反応を積極的に制御可能な材料開発がみられるようになってきている。免疫応答をうまく制御することは、直接的に病気を治すという戦略だけでなく、従来のバイオマテリアル治療の効果をより促進する戦略としても有用である。そこで、本研究では、免疫制御機能を有する骨再生材料を試みた。

## 3. 研究の方法

免疫制御機能を有する足場材料を臨床応用まで引き上げるには、基礎的研究から、トランスレーショナル研究、臨床研究が必要と考えられる。今回の期間内では、予備的に既存の人工材料の免疫反応をラット頭蓋骨骨欠損モデルにて明らかにした後、申請者等が考案している PEG を用いた新たな免疫調節型骨再生材料の開発を目指した。

具体的には、下記を計画した。

- (1) ラット頭蓋冠骨欠損モデルに異なる骨切削法が及ぼす影響
- (2) ラット頭蓋冠骨欠損内を用いた牛骨由来リン酸カルシウムの骨形成能評価
- (3) ラット頭蓋冠骨欠損内を用いた牛骨由来リン酸カルシウムの免疫応答評価
- (4) PEG 結合リン酸カルシウムの合成と評価
- (5) PEG 結合リン酸カルシウムの骨再生能および免疫応答評価

### 3-1 ラット頭蓋冠臨界骨欠損モデルに異なる骨切削法が及ぼす影響

ラット頭蓋冠骨欠損モデルは、多くの骨補填材や骨再生材料の骨形成能の評価に用いられている。頭蓋への骨欠損の形成は主にトレフィンバーを用いて行われ、5~9 mm の大きさの骨欠損が形成される。当然ながら、より大きな骨欠損を治癒する方が困難となる。5 mm 系は長期的には自発的な閉鎖が見られ臨界骨欠損と呼ぶべきか議論の余地を残すが、ラット頭蓋に 2 つの欠損を形成しうることから、自発的な (非埋入での) 完全閉鎖が認められない短期間での骨形成能のスクリーニングに用いられている。申請者等は、9 mm の臨界骨欠損を用いた。ラットには、雄性 Sprague-Dawley ラット (8 週齢) を用いた。骨欠損の作製方法は、その後の治癒過程に影響を及ぼす可能性があることから、骨補填材埋入に先んじて、2 種類の骨切削器具 (トレフィンバー、超音波骨切削機器) を用いて骨欠損を作製し比較検討した。超音波骨切削機器は、軟組織を傷つけずに硬組織 (骨等) を選択的に切削可能であることから採用した。

### 3-2 牛骨由来リン酸カルシウムのラット頭蓋冠骨欠損内での骨形成能評価

基盤母材となるリン酸カルシウムには、直径 300-500 mm の牛骨由来リン酸カルシウム (Bio-Oss : Geistlich 社製) を用いた。滅菌後の牛骨由来リン酸カルシウムを 3-1 で形成した骨

欠損内に埋入し、所定の日数後に骨形成能を評価した。骨切削器具には、トレフィンバーを用いた。骨形成能は、マイクロ CT (SMX-130CT, Shimadzu 社製) と、ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色にて見積もった。骨関連細胞の細胞応答はアルカリフォスファターゼ・酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (ALP・TRAP) 染色および免疫染色にて評価した。また、将来的な PEG を用いた免疫制御骨再生材料の開発に先んじて、抗炎症効果などの免疫調節機能を持つエピガロカテキンガレート (EGCG) とゼラチンを化学的に結合させた EGCG 結合ゼラチンと牛骨由来リン酸カルシウムの複合化を行い、同材料の骨形成能も評価した。

### 3-3 牛骨由来リン酸カルシウムのラット頭蓋冠骨欠損内での免疫応答評価

ラット頭蓋冠骨欠損モデルに牛骨由来リン酸カルシウムを埋入後、同材料と周囲組織を回収し、ELISA アレイを用いて IL-2、IL-4 など複数の炎症性サイトカインの分泌挙動を評価した。また炎症性サイトカインの分泌を免疫学染色にて視覚的にも確認した。

## 4 . 研究成果

### 4-1 ラット頭蓋冠臨界骨欠損モデルへの手術方法の影響

トレフィンバーと超音波骨切削機器で形成した骨欠損辺縁の形状を走査型電子顕微鏡にて確認したところ、両形状に大きな違いが認められた。トレフィンバーでは、凹凸の大きな辺縁形状を示したのに対し、超音波骨切削機器では滑沢な形状を示した。マイクロ CT による骨形態計測の結果、骨形成能は超音波骨切削機器が優れていた。また、骨関連マーカーである ALP の発現も超音波骨切削機器で切削された場合の方が早い発現を認めた。一方、骨形成能のばらつきは、超音波骨切削機器が大きかった。これらの結果は、手術器具としては超音波骨切削機器が優れていることを示す。一方、骨補填材料の骨形成能を評価する動物モデルの形成に視点を移した場合、安定的に臨界骨欠損を形成するにはトレフィンバーが望ましいことがわかった。

### 4-2 牛骨由来リン酸カルシウムのラット頭蓋冠骨欠損内での骨形成能評価

牛骨由来リン酸カルシウムをラット頭蓋冠骨欠損モデル内に最長 8 週間埋入し、骨形成能をマイクロ CT および HE 染色にて評価したが、顕著な新生骨の形成は認められなかった。同材料を用いた骨形成には、より長期的な埋入期間が求められたと推察された。一方、抗炎症効果を持つ EGCG が結合された EGCG 結合ゼラチン-Bio-Oss 複合体を埋入した場合、牛骨由来リン酸カルシウム単独埋入に比べ骨形成の促進が認められた。同知見において、EGCG の抗炎症効果がどの程度寄与しているかは不明であり、現在詳細の解明を進めている。

### 4-3 牛骨由来リン酸カルシウムのラット頭蓋冠骨欠損内での免疫応答評価

ラット頭蓋冠に埋入された牛骨由来リン酸カルシウムが引き起こす免疫応答を ELISA アレイにて評価したところ、非埋入群に比べて発現量が高いサイトカインと低いサイトカインの両方が確認された。炎症性サイトカインと組織修復に関与するサイトカインなどの分類を試みた結果が入り交じっており、複雑な発現傾向を示していた。これらの結果の意味について現在解析を進めているところである。

本研究期間においては、上記 4-1~3 などの基礎的なデータ収集を慎重に進めていたことから「PEG 結合リン酸カルシウムの合成と評価」および「PEG 結合リン酸カルシウムが引き起こす免疫応答と骨形成評価」へは到達できなかった。しかし、牛骨由来リン酸カルシウムは、現在臨床において多用されている骨補填材であり、同材料の骨形成能や免疫能評価は臨床的に意義を持つと考える。また、この知見は新たな免疫制御型骨再生材料開発への基盤知見として活用可能であることから、同知見を土台として PEG 結合リン酸カルシウム開発に取り組む予定である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- 1: Honda Y, Takeda Y, Li P, Huang A, Sasayama S, Hara E, Uemura N, Ueda M, Hashimoto M, Arita K, Matsumoto N, Hashimoto Y, Baba S, Tanaka T, Epigallocatechin Gallate-Modified Gelatin Sponges Treated by Vacuum Heating as a Novel Scaffold for Bone Tissue Engineering, *Molecules*, 査読あり, 23, 2018, doi:10.3390/molecules23040876

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1: 李佩祺, 黄安祺, 高蓓媛, 本田義知, 馬場俊輔, 牛骨由来移植材料を含有させた真空熱処理エピガロカテキンゲレート結合ゼラチンの骨形成能評価, 第48回日本口腔インプラント学会学術大会, 2018年.
- 2: 黄安祺, 李佩祺, 高蓓媛, 小林信博, 本田義知, 馬場俊輔, 真空熱処理エピガロカテキンゲレート結合ゼラチンの生体内分解挙動解明に向けたマトリックスメタロプロテアーゼ発現の解析, 第48回日本口腔インプラント学会学術大会, 2018.

※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。