

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09032

研究課題名(和文) 進化分子工学を用いたリン酸化プルランでの新たな骨移植術の開発

研究課題名(英文) Development of new bone grafting technique with phosphorylated pullulan using evolutionary molecular engineering

研究代表者

三澤 治夫 (Misawa, Haruo)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：60448222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸化プルランは骨などの硬組織への粘着、定着能に優れた素材であり、骨再生の担体として有用である。本研究では、骨欠損部へ使用しやすい形状であるシート状への加工および、骨欠損部の骨再生の担体としての有用性を検証した。シート状のプルラン上での間葉系幹細胞の培養の実験では、細胞の生存と増殖が確認されたため、細胞移植の担体としての安全性、有用性を証明できた。また、ラットの頭蓋冠を使用した動物実験において、リン酸化プルランシート単体および、間葉系幹細胞と同時移植を行うことで良好な骨欠損部の修復が確認された。以上の結果よりシート形状に成形したリン酸化プルランシートの骨再生領域における有用性を証明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会に伴い、高齢者の骨折も増加傾向にあり、また手術法の進歩及び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、骨欠損の大きな骨折症例や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。骨再生力を向上させる素材の開発は、骨折などの治療成績の向上、手術侵襲軽減、合併症の減少など社会的にも重要な問題であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Phosphorylated pullulan is a material having excellent adhesion and fixing ability to hard tissues such as bone, and is useful as a carrier for bone regeneration. In this study, we verified the usefulness of the bone defect as a carrier for bone regeneration and processing into a sheet shape that is easy to use for the bone defect. In the experiment of culturing mesenchymal stem cells on sheet-shaped pullulan, cell survival and proliferation were confirmed, so that the safety and usefulness as a scaffold for cell transplantation could be proved. In addition, in animal experiments using rat calvaria, good repair of bone defects was confirmed by transplantation with phosphorylated pullulan sheet alone, co-transplantation of phosphorylated pullulan sheet and mesenchymal stem cells. From the above results, the usefulness of the phosphorylated pullulan sheet molded into a sheet shape in the bone regeneration region could be proved.

研究分野：整形外科学

キーワード：プルラン 骨再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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性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。高齢化社会に伴い、高齢者の骨折も増加傾向にあり、また手術法の進歩及び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、骨欠損の大きな骨折症例や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

整形外科領域では近年、低侵襲手術が多く行われるようになってきており、高齢患者に対する整形外科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単体での骨欠損部における骨修復促進効果を確認する実験を行った。その他に、リン酸化プルランシートを、骨再生能を持つ間葉系幹細胞の担体として使用することで、骨修復効果の増強を確認する実験を行った。再生医学では、成長因子や細胞の足場となる担体も、非常に重要なポジションを占めているが、実際の臨床応用のためには、術中の使用しやすさという点も非常に重要である。リン酸化プルランシートは非常に切り出しや成形が容易であり、有効性が確認されれば骨再生領域における画期的な素材となりえる可能性が高いと考えられる。

3. 研究の方法

(1) リン酸化プルランシートの成型

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) リン酸化プルランシートへの骨髄幹細胞の生着および増殖、細胞毒性の評価

リン酸化プルランフィルムの細胞適合性を検討するため、ラット骨髄間葉系細胞を用い、リン酸化プルランシート上での培養を行った。細胞の生存を確認するためにラット骨髄幹細胞に対し蛍光標識を行い、経時的に生存率や細胞数を観察した。

(3) ラット頭蓋冠骨欠損モデルにおける骨修復促進効果の検討

ラットの頭蓋冠に直径 4.3 mm のトレフィンバーを使用して骨欠損を左右に作成し骨欠損モデルとした。骨欠損部は十分洗浄したのちに、何も処置をしないものをコントロールとして、欠損を被覆する形に切り出したリン酸化プルランシートを貼り付けたもの、骨欠損内にラット骨髄間葉系幹細胞のベレットを移植したのちに、リン酸化プルランシートを貼り付けたものを作成し、経時的な骨欠損の修復過程を観察した。これらの動物モデルは、移植後 4 週間目でサクリファイスし、組織学的な評価と、マイクロ CT による骨欠損面積の計測、骨欠損部内部の組織における骨関連遺伝子の発現の評価を行った。

4. 研究成果

(1) リン酸化プルランシートの成型

リン酸化プルランシートの外観写真を右に示す。リン酸化プルランの特徴として、様々な形態への成型が容易な点が挙げられる。厚みなどは動物実験での扱いやすさを考慮して決定したが、調整は容易であり、使用する部位のニーズに合った成型が可能であると考えられる。

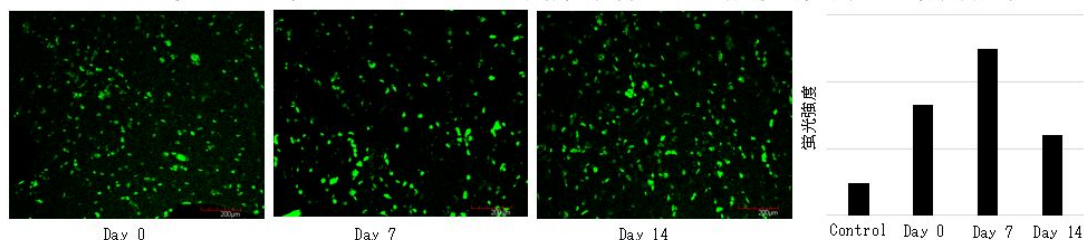


(2) リン酸化プルランシートへの骨髄幹細胞の生着および増殖、細胞毒性の評価

滅菌したプルランシートを、細胞培養用のシャーレに貼り付け、そのシート上に、ラット骨髄間葉系細胞を播種し、観察を行った。細胞の核を蛍光標識し、細胞の生死の確認、蛍光強度を測定することで、細胞数の推移などの検討を行った。実験結果の

一部を下に示すが、播種直度と比較し、7日目には細胞数が増加しており、リン酸化プルランシート上で細胞の増殖が観察されている。また、骨誘導培地を用いた培養後のアリザリンレッド染色で、多数の赤色に染色される石灰化が確認されたため、リン酸化プルランシート存在下で骨髄間葉系細胞の骨分化が可能であることが示された。

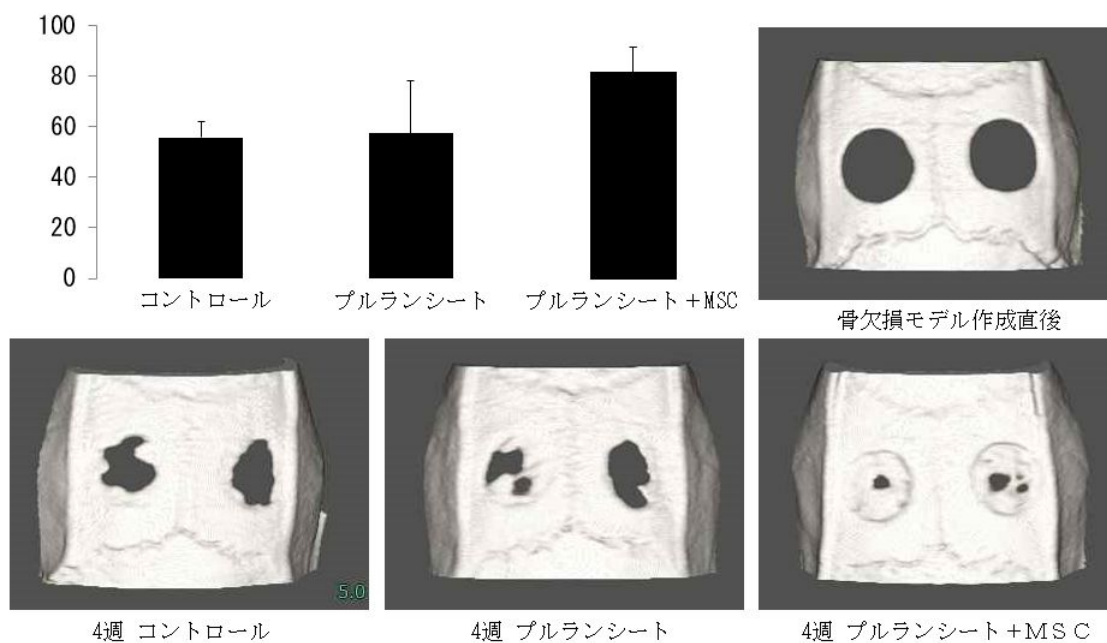
シート状リン酸化プルラン上での間葉系幹細胞（蛍光標識）の培養結果



(3) ラット頭蓋冠骨欠損モデルにおける骨修復促進効果の検討

ラットの頭蓋冠での骨欠損モデルに対するリン酸化プルランシート単体および、骨髄間葉系細胞を移植後リン酸化プルランシートでパッキングを行った動物実験の結果を示す。骨欠損モデルは、直径4.3mmのトレフィンバーを用い作成したため、常に同じサイズの骨欠損が作成される（右上図）。下段にそれぞれの動物モデルの代表的な結果を示すが、特に骨髄間葉系細胞のペレットを骨欠損部に移植し、リン酸化プルランシートでパッキングを行ったモデルで良好な骨修復過程が観察された。組織学的な評価においては、マイクロCTで観察された結果に対応する程度の新規の骨形成が観察された。また、骨欠損部での骨関連遺伝子の発現は、コントロールに比較してリン酸化プルランシート単体、骨髄間葉系細胞とリン酸化プルランシートを移植したもので発現の亢進が認められた。以上の結果より、リン酸化プルランシートの骨欠損部への使用による骨修復の促進、また特に細胞形成性の細胞や骨移植など骨再生力を持つ素材の担体としての有用性が証明できたものと考えられる。

ラット頭蓋冠の骨欠損モデルにおける骨再生実験結果



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 0件）

1. 発表者名 村岡聡介, 三澤治夫, 瀧川朋亨, 山根健太郎, 辻寛謙, 高尾真一郎, 尾崎敏文
2. 発表標題 間葉系幹細胞と凍結乾燥リン酸化プルランを用いた骨形成に関する有用性
3. 学会等名 第39回 日本運動器移植・再生医学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村岡 聡介, 三澤 治夫, 瀧川 朋亨, 山根 健太郎, 池田 吉宏, 辻 寛謙, 高尾 真一郎, 松川 昭博, 尾崎 敏文
2. 発表標題 ラット頭蓋骨欠損モデルに対する間葉系幹細胞と凍結乾燥リン酸化プルランの有用性
3. 学会等名 第35回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020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	塩崎 泰之 (SHIOZAKI Yasuyuki) (00596041)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------