

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19070

研究課題名(和文)PRP徐放化温度応答性高分子ゲルによる骨膜下バイオリアクター技術の開発

研究課題名(英文)Development of the subperiosteal bioreactor technology using temperature-responsive bioabsorbable gel sustained release of PRP

研究代表者

古賀 喬充(Koga, Takamitsu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：50779428

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究では侵襲的な手術操作を伴わず、注射器で骨膜下に成長因子を含有させた生体吸収性ゲルを注入するという容易な手技で骨再生を促す手法を開発した。生体吸収性ゲルに凍結乾燥多血小板血漿を混和し、動物への移植実験を行ったところ、骨誘導において一定の有効性が確認できた。現在、骨誘導の機序について詳細な解析を実施しているところである。またこの技術を臨床応用するために、凍結乾燥保存した多血小板血漿の人体への安全性を検討した。この結果から、凍結乾燥多血小板血漿が健康状態に与える悪影響は確認できず、かつ一定の治療効果があることが示唆された。この研究内容は学術学会や論文発表を通して公表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、生体吸収性ゲルに成長因子を添加し局所応用することで、骨誘導が行える可能性が示唆され、低侵襲な骨再生治療の先駆的研究に位置付けられる。今回は歯槽骨再生を主眼に研究を進めたが、本技術は骨膜下であればいずれの部位でも応用可能であり、整形外科分野などへの応用も期待できる。また骨再生治療が必要となる場合の多くは高齢者であり、全身状態に問題がある場合は侵襲度の高い治療は避けざるを得ないのが現状である。しかし本技術のように治療の低侵襲化を進めることで適応症は拡大し、ひいては国民の健康増進に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文):In this study, we developed bone regeneration technique by an easy procedure to inject the bioabsorbable gel which incorporated growth factors under the periosteum with a syringe.

A certain degree of osteoinductivity were confirmed in animal experiment of bioabsorbable gel mixed with freeze-dry platelet-rich plasma. We are conducting detailed analysis about the mechanism of this bone osteoinductivity.

Also, we examined the safety of freeze-dried platelet-rich plasma in a human body as a pilot study in clinical research. The results obtained in this study suggested that FD-PRP can be used safely for bone engineering in clinical practice. We published an article in Journal of Clinical Medicine and presented in the conference.

研究分野：外科系歯学

キーワード：多血小板血漿

1. 研究開始当初の背景

細胞の増殖と分化能力を介した生体のもつ自然治癒力によって、欠損あるいは機能低下した生体組織の再生修復を図る新しい治療の試みが進められている。この再生誘導治療には、2つのアプローチがある。一つが細胞移植法であり、増殖、分化能力の高い幹細胞や前駆細胞を移植することによって、細胞の機能を利用して生体組織の再生修復を実現する。もう一つが、**バイオマテリアルを用いて、体内に存在する細胞の能力を増強させる組織工学的アプローチ**である。近年、骨再生の分野では間葉系幹細胞を骨補填材に搭載し移植する試みがなされているが、煩雑な作業に見合った効果が得られていないのが現状である。いかに有能な細胞を移植しても細胞周囲環境が整っていないければ、移植細胞による再生治療効果は限定的である。さらに、幹細胞の採取や培養技術などは高い専門性と設備が必要であり、一次医療機関レベルでの臨床応用は極めて困難である。

骨の自然治癒力は比較的高く、通常、骨折であれば骨片の整復固定を行うことで3か月後には骨癒合が得られる。近年、**骨膜由来の骨幹細胞 (PSSC)** と骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) の起源は共通するものの、成熟した骨の修復では PSSC の方が強く関与していることが示唆されている (De Lageneste et al. Nature communications. 2018)。骨膜は骨表面の骨皮質を覆う組織であり、生体内では骨の保護や栄養分供給に関与している。加えて骨膜に骨形成能力があることは、これまで数多く報告されており、**骨膜の持つ骨形成能力を局所的で賦活化するバイオマテリアルがあれば、骨再生治療は飛躍的に進歩する**可能性がある。

本研究では、骨膜下に従来と異なる方法で足場を形成し、骨折後の治癒過程のように骨形成を惹起させることができないかと考えた。従来の方法では、外科的に自家骨または人工骨を移植していたが、今回我々は**困難な手術操作を必要とせず、注射器で骨膜下に成長因子を含有させた生体吸収性ゲルを注入する**という容易な手技で骨再生を図る方法の開発を考案した (Fig.1)。生体吸収性ゲルは液体として骨膜下に注入可能で、生体内でゲルとなり骨から骨膜を**挙上させ足場を形成**することができる。2005年に生体吸収性ゲルを腓骨骨膜下に注入し足場を形成することで骨再生を誘導しそれらを移植骨として利用する、いわゆる生体バイオリクター技術が発表されている (Stevens et al. PNAS. 2005)。これは整形外科的疾患の治療を念頭に考案されており、多量の骨が必要となる状況でドナーサイトの創傷を低減することを目的としていた。本研究は歯槽骨再生という比較的少量の骨再生が目的であるため、局所に骨誘導を行うのみで十分な効果が得られる可能性が高い。生体吸収性ゲルには足場としての機能に加え、**薬剤を徐放する機能を付与することが可能**である。足場の形成と同時に、骨膜由来の骨幹細胞の活性化は不可欠であり、本研究では**自己血清由来の PRP** を含有させその機能を与える。PRP は遠心分離操作で血液中の血小板分画を血漿中に濃縮したものであり、血液の3~5倍程度の血小板を含む。PRP には組織再生を促進する効果が期待でき、骨折の治癒や皮膚の再生に有用であることが示されている (Simman et al. Ann Plast Surg. 2008; Redaelli et al. J Drugs Dermatol. 2010)。研究代表者らはこれまでに PRP の骨再生能を検討し、PRP をフリーズドライ保存しても即時調製した新鮮な PRP と同等の骨形成能を保持していることを明らかにしている (特許公開番号: 2015-125916)。さらに、フリーズドライ PRP (FD-PRP) には再溶解する際に血小板濃縮液を調製できるという利点があり、3倍濃縮した FD-PRP では、等倍の FD-PRP と比較し有意に骨形成を促進することが分かっている (Fig.2)。

本研究では、バイオマテリアル技術と PRP の組織再生能力を組み合わせることで、低侵襲でシンプルな骨再生治療を確立することを目指す。

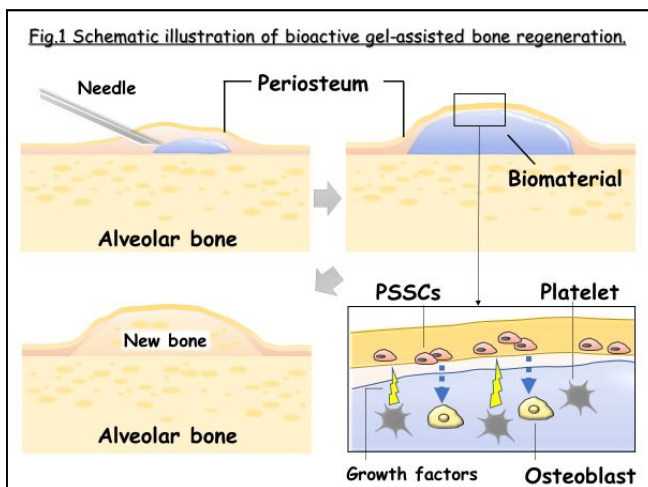
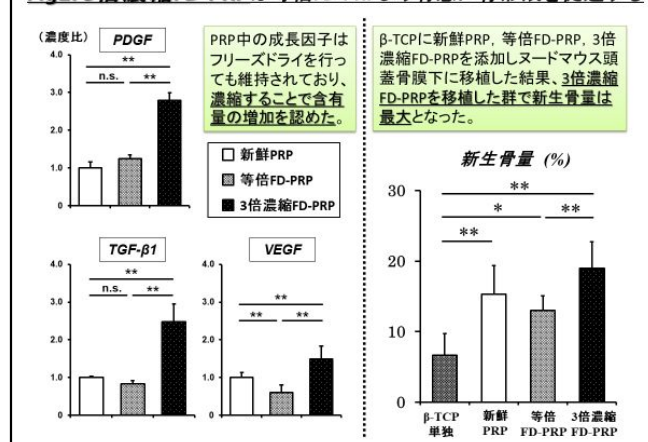


Fig.2. 3倍濃縮FD-PRPは等倍FD-PRPより有意に骨形成を促進する



## 2. 研究の目的

本研究では**局所投与可能なバイオマテリアルとして生体吸収性ゲル**を用い、我々が独自に開発した**フリーズドライ PRP 技術**を応用することで、**低侵襲で簡便な骨再生治療の確立**を目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨再生に適した生体吸収性ゲルの選択

生体吸収性ゲルとして具備すべき機能は、ゲル化時間、力学特性、物質透過性、分解性などがあげられるが、骨再生への応用においてゲル化時間や力学特性がきわめて重要な問題である。つまり、ゲル化した担体が組織圧に耐えられず平坦化し、理想的なスペースメイキングが得られないといった問題を解決する必要がある。近年、そのようなゲルの物性をコントロールする技術として、外部刺激にตอบสนองしてゾルからゲルに転移する刺激応答性高分子ゲルが開発されている。温度、pH、電場、タンパクなどで刺激が可能であり、本研究では温度応答性ゲルの応用を検討する。温度応答性を示すバイオマテリアルは、人の体温近傍(32℃)に下限臨界溶液温度を持つポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を用いる。このゾルゲル転移の臨界温度は共重合するモノマーの性質と共重合率を調整することで、高温側、低温側にもシフトさせることができ、この技術を用いてゲル注入後、体温に反応しシャープにゲル化するバイオマテリアルを作出する。さらに生体吸収性ゲルは、通常不均一な網目状構造を持つため、力学的強度の向上には限界があったが、相互に結合可能な官能基を持つ四分岐高分子を合成することで、分子構造を均一化し飛躍的な強度の向上が見込める。

### (2) PRP 添加生体吸収性ゲルによる in vivo 骨再生能の評価

マウス頭蓋骨膜下で骨再生能を評価する。ゲルの注入では、まず生理食塩水を注入し十分に骨膜下のスペースを確保した後、PRP を添加した生体吸収性ゲルを注入する。注入は注射針を用いて行い、最適なゲージ数や注入圧の検討を行う。PRP はフリーズドライ技術を用いて等倍、3 倍、5 倍など含有率を変化させ、生体吸収性ゲル単独を sham として移植する。4 週間後、形態学的评价をマイクロ CT で行い、組織学的评价を HE 染色、von Kossa 染色で行う。また、免疫学的评价として TRAP 染色、Osteocalcin 免疫染色で骨形成の評価を行い、vWF、CD31 免疫染色などで血管新生を評価する。

### (3) PSSCs の遊走および増殖活性の評価

バイオマテリアル注入後 7 日目、早期の骨形成における PSSC の関与を確認するために、5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) で増殖細胞のラベリングを行うとともに、幹細胞マーカーである Sca-1 の免疫染色を行う。また、骨の修復過程では PSSC に発現するペリオスチンが強く関与することが示唆されており、分子生物学的手法を用いてペリオスチンの発現を評価する。

### (4) FD-PRP 特定臨床研究

本研究技術の効果が確認された場合、臨床応用へとスムーズに移行するため、既に動物実験レベルで効果が確認されている FD-PRP については臨床試験を進める。

末梢血から遠心分離を加えて調整した PRP を凍結乾燥保存し、骨移植を必要とする重度の歯槽骨萎縮症患者に対して、凍結乾燥保存 FD-PRP を応用した骨再生治療を行い、その安全性を検証する。研究対象者の末梢血最大 90ml を採血し、細胞調整センター内で無菌的に PRP を調整し凍結保存した。手術時に 3 倍濃縮の FD-PRP を再構成し人工骨と混和後、直ちに移植する。主要評価項目は安全性とし、術後 4 週間の臨床所見および血液検査所見から評価する。副次的評価項目は骨形成能とし、パノラマ X 線所見と CT 所見、およびインプラント 2 次手術時の ISQ 値から評価する。

## 4. 研究成果

2019 年度は、移植に適した生体吸収性ゲルの選択と、PRP 添加生体吸収性ゲルの作出を行った。生体吸収性ゲルには、生体内に存在するアミノ酸から構成され、生理的条件下でハイドロゲルとなる PuraMatrix ペプチドハイドロゲルを用いることとし、PRP を均一に添加する工程まで完了した。

2020 年度は、FD-PRP の臨床研究を行った。ヒトに対する通常の新鮮 PRP を使用した治療は既に世界的に実施されており、これまで重大な疾病等を認めた例は報告されていない。FD-PRP は製造や臨床使用にあたり、特別な試薬等を使用しないため、基本的に新鮮 PRP と同等の安全性が予測されるものの、凍結乾燥処理および保存という工程を介するため、その安全性については検証が必要であった。そこで我々は、パイロット研究として FD-PRP を応用した骨再生治療を行い、まずはその安全性の検証を行った。

デンタルインプラント治療を前提とした上顎洞底挙上術が適応となる 5 例を対象として、FD-PRP を人工骨とともに移植した。主要評価項目の安全性では、全例で術後有害事象の発生はなかった。また副次的評価項目の骨形成能では、術後 6 か月で上顎洞底の垂直的挙上は術前と比較し有意差をもって維持されており、インプラント 2 次手術時の ISQ 値は全例 70 以上で安定していた。これらの結果から、PRP に対して凍結乾燥処理を行っても安全性には影響を与えず、かつ一定の治療効果が担保されていることが示唆された。この内容を研究論文として Journal of Clinical Medicine に報告した。

最終年度は、前年度までに生体での安全性が確認された PRP の 3 倍濃縮での FD-PRP を応用し、

その添加条件を最適化した FD-PRP 含有 PuraMatrix ペプチドハイドロゲルについて、生体での骨膜下での骨誘導性を評価した。その結果、マウス頭蓋骨骨膜下への移植モデルにおいて、FD-PRP 含有 PuraMatrix ペプチドハイドロゲルによる骨誘導の有効性について、一定の知見を得ることができた。現在、骨膜由来の骨幹細胞を介した骨誘導の機序について詳細な解析を実施しているところである。また、FD-PRP を他の生体吸収性ゲルに添加した場合と比較し、上記のペプチドハイドロゲルとの組み合わせの有用性についても検討を加えているところである。

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 1件）

1. 著者名 Koga Takamitsu, Nakatani Yuya, Ohba Seigo, Hara Masahito, Sumita Yoshinori, Nagai Kazuhiro, Asahina Izumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinical Safety Assessment of Autologous Freeze-Drying Platelet-Rich Plasma for Bone Regeneration in Maxillary Sinus Floor Augmentation: A Pilot Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1678 ~ 1678
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm10081678	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古賀 喬充, 中谷 佑哉, 原 昌士, 住田 吉慶, 大場 誠悟, 長井 一浩, 朝比奈 泉
2. 発表標題 凍結乾燥保存多血小板血漿（FD-PRP）による組織再生治療技術を用いた歯槽骨再生療法の検討（パイロット試験）
3. 学会等名 日本口腔外科学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------