

令和 6 年 5 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09320

研究課題名（和文）低分子ヘパリンを用いた骨DDSの開発と骨再生研究

研究課題名（英文）The Development of system for drug delivery to the bones using low molecular weight heparin to promote bone regeneration

研究代表者

野澤 聡 (Nozawa, Satoshi)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20771679

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）：低分子ヘパリンに酸性ペプチドを付加することで骨特異的に送達される低分子ヘパリン（LMWH-D8）を開発した。BMP-2などの骨形成因子とLMWH-D8が結合した状態で人工骨に含浸させラットの腰椎後側方に移植した。BMP-2単独含浸群に比し、LMWH-D8とBMP-2結合群では8匹中6匹が頭側尾側ともに骨連続性を伴った癒合が得られた。一方、他群では頭側尾側ともに完全に骨癒合が得られたものは無かった。（完全骨癒合率75%， $p<0.01$ ）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人口の高齢化に伴い、骨欠損部再建・脊椎固定術・人工関節置換術・偽関節治療など骨移植や早期骨癒合を必要とする状況は増加の一途を辿っている。海外では骨形成蛋白（bone morphogenetic protein: BMP）が認可され、DDSとしてDemineralized Bone Matrix(DBM)・コラーゲンスポンジやゼラチンが使用されているが、局所の薬剤徐放が速いため、高用量が必要となり高価となること・創部腫脹や創治癒遅延・異所性骨化の合併症が問題点となっている。成長因子をヘパリンと一緒に骨表面まで運び骨形成を促進できるのではないかと考え研究を行っている。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel drug delivery system (DDS) that transports growth factors to the bone with low molecular weight heparin (LMWH) conjugated acidic peptide, which binds to hydroxyapatite (HA). Growth factors such as BMP, FGF etc. electrostatically bind to heparin. Eight mer acidic amino acids using Asp (D) bind to HA. We chemically conjugated LMWH and D8 (LMWH-D8) as a vector. Posterolateral fusion (PLF) model in which “HA is impregnated with both LMWH-D8 and BMP-2” and implanted in between transverse processes, showed significant bone formation as compared with “only BMP-2 impregnated HA”.

研究分野：脊椎脊髄外科

キーワード：骨癒合 糖鎖 BMP-2

1. 研究開始当初の背景

人口の高齢化に伴い、骨欠損部再建・脊椎固定術・人工関節置換術・偽関節治療など骨移植や早期骨癒合を必要とする状況は増加の一途を辿っている。海外では骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein: BMP) が認可され、DDS として Demineralized Bone Matrix (DBM)・コラーゲンスポンジやゼラチンが使用されているが、局所の薬剤徐放が速いため、高用量が必要となり高価となること・創部腫脹や創治癒遅延・異所性骨化の合併症が問題点となっている。

本研究はそれらと違った視点で、ヘパリンが多くの成長因子と結合する性質に着目した。つまり、ヘパリンに骨へのキャリアを化学的に修飾することで成長因子をヘパリンと一緒に骨表面まで運ぶという、既存の DDS とは大きく異なるシステムを考案した。

2. 研究の目的

糖鎖化学者の協力の下低分子ヘパリン (LMWH) の還元末端にアスパラギン酸ペプチド (D8) を修飾 (LMWH-D8) することに成功した (2018-2020 年度基盤研究による成果)。ヘパリンは多数の硫酸基による強い陰性荷電により BMP, FGF, VEGF 等といった多くの生理活性物質と結合することが知られている。その特性を利用し、骨形成促進作用を有する BMP-2 の DDS を計画した。

3. 研究の方法

1) in vitro での LMWH-D8 の効果確認

骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞を培養し、2 週間石灰化誘導した後に、PBS LMWH-D8 のみ BMP-2 (2 μ g) のみ LMWH-D8 と BMP-2 (2 μ g) の混合したもの、を培地へ加え 24 時間後に Western blot 法・Q-PCR を用いて群間を比較した。

2) 脊椎椎体間固定動物モデル (腰椎後側方モデル) での骨癒合比較

ラット脛骨骨欠損モデル、ラット尾骨椎体間癒合モデル、ラット腰椎後側方モデルを使用し、PBS LMWH-D8 のみ BMP-2 (2 μ g) のみ LMWH-D8 と BMP-2 (2 μ g) の混合したもの、を含浸させた人工骨 HA を脛骨骨欠損部、横突起間に留置し、8 週後の骨癒合を μ CT、非脱灰標本を用いて評価した。

4. 研究成果

1) in vitro において、 \square は他群に比し有意に Smad1,5,9 のリン酸化が有意に増加していた。Q-PCR において、 \square は他群に比し有意に osteocalcin, osterix といった骨形成マーカーの発現が有意に増加していた。

2) ラット脛骨骨欠損モデルへ移植した人工骨内への骨形成は、 において他群に比し有意に増加していたが差は顕著では無かった。続いて行ったラット尾骨椎体間癒合モデルでは、ラットが手術部位を頻回に触ってしまう等、安定した結果が得られなかった。

ラット腰椎後側方モデルにおいて、各群 8 匹骨移植を行い、 では 8 匹中 6 匹が頭側尾側ともに骨連続性を伴った癒合が得られた。一方、他群では頭側尾側ともに完全に骨癒合が得られたものは無かった(の完全骨癒合率 75%, $p<0.01$)。

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 岩田直也 野澤聡 河崎史子 藏満紀成 後藤 篤史 榎 利衣 石塚 恭平 廣瀬 仁士 市川 勝寛 加藤皓己 秋山治彦
2. 発表標題 低分子ヘパリンへの酸性ペプチド修飾による新規骨ドラッグデリバリーシステムの開発
3. 学会等名 日本脊椎脊髄病学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩田直也 野澤聡 河崎史子 藏満紀成 後藤 篤史 榎 利衣 石塚 恭平 廣瀬 仁士 市川 勝寛 加藤皓己 秋山治彦
2. 発表標題 低分子ヘパリンへの酸性ペプチド修飾による新規骨ドラッグデリバリーシステムの開発
3. 学会等名 日本整形外科学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 糖鎖複合体、薬物担体、及びドラッグデリバリーシステム	発明者 野澤聡 河崎史子 岩田直也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-165577	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	秋山 治彦 (Akiyama Haruhiko) (60402830)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授 (13701)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	岩田 直也 (Iwata Naoya)		
研究協力者	河崎 史子 (Kawasaki Fumiko)		

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