

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17070

研究課題名(和文)自家架橋したヒアルロン酸に成長因子を配合した生体材料の創製と治療効果の基礎的評価

研究課題名(英文)Creation of biomaterials containing autologous crosslinked hyaluronic acid and growth factors and basic evaluation of their therapeutic effects

研究代表者

畠山 航(Hatakeyama, Wataru)

岩手医科大学・歯学部・研究員

研究者番号：20733728

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文): 注入型試料として、チオール修飾ヒアルロン酸ベースnHAP・BMP複合試料を調製した。また、凍結乾燥体埋入試料として、EGDE架橋ヒアルロン酸・アルカリ処理ゼラチンベースnHAP・BMP複合試料を調製した。両試料において各種理工学的評価を行い、生体内残存期間の延長と、タンパク徐放能の向上を予測する結果を観察・計測した。また、マウス・ラット頭蓋骨に適用する動物実験を行い、凍結乾燥埋入試料については設定した骨欠損からの骨再生を、注入試料については埋入リング内の垂直的骨形成を観察し、それぞれBMP含有群で対照群よりも有意な骨形成を認めた。これら結果は2編の英論文として公表に至っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、ヒアルロン酸は創傷治癒促進や関節の緩衝潤滑剤を中心とした用途で用いられてきた。本研究ではヒアルロン酸を基材として骨補填材としての検討を行い、新たに骨領域における骨増生用DDS材料として使用可能であることを見出した。この成果は、普及が進んでいヒアルロン酸ベース骨補填材の実用化に向けた大きな一助になると考えられる。また、注入型ヒアルロン酸骨補填材においては、注射針の刺入のみの低侵襲な方法で骨増生を達成する可能性を示唆しており、患者の身体的負担の軽減や術者の施術操作の簡易化などが期待できる。これらメリットは、現在の骨増生術に対するハードルを大きく引き下げる、大きな成果である。

研究成果の概要(英文): A thiol-modified hyaluronic acid-based nHAP/BMP composite sample was prepared as an injectable sample. An EGDE-crosslinked hyaluronic acid/alkali-treated gelatin-based nHAP/BMP composite sample was also prepared as a freeze-dried implant sample. Various scientific and engineering evaluations were performed on both samples, and results were observed and measured that predicted an extension of the in vivo survival period and an improvement in the protein sustained release ability. Animal experiments were also performed on mouse and rat skulls, and bone regeneration from the set bone defect was observed for the freeze-dried implant sample, and vertical bone formation within the implant ring was observed for the implant sample. Significant bone formation was observed in the BMP-containing group compared to the control group. These results have been published in two English papers.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：骨補填材料 ヒアルロン酸 インプラント

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

医科あるいは歯科の臨床における様々な治療法にヒアルロン酸が使用されている。整形外科領域では、変形性膝関節症に対してヒアルロン酸注射を行う治療法が確立され、歯科では美容目的で口腔周囲に注射をすることも可能になった。ヒアルロン酸が用いられる理由として、1g あたり 6l もの水を保持できる保水性や潤滑作用に加え人体内での非常に優れた軟組織治癒効果が挙げられる。ヒアルロン酸の硬組織再生への応用については、複数の基礎研究が存在するものの、現在、ドイツなどでインプラント手術後の創傷治癒促進や瘢痕形成抑制のための利用（製品名 Puredent）に留まり、骨補填材として広く普及していない。このヒアルロン酸を歯科の骨補填材の基材として用いる場合、ヒアルロン酸単体では生体内のヒアルロナーゼによって数時間で分解されてしまうため、架橋し、不溶化させることで、生体内で少なくとも 4 週間以上残存させる必要がある。架橋のポイントとなるのはヒアルロン酸の構造式上のカルボキシル基 (-COOH) と水酸基 (-OH) である。架橋方法には複数あり、注入型ゾル-ゲル応用も含む。ヒアルロン酸自体に軟組織修復作用が存在するが、骨誘導能や骨伝導能はなく、成長因子 + 成長因子徐放材料 (DDS 材料) の配合等で硬組織での治療効果の向上が期待される。

### 2. 研究の目的

ヒアルロン酸原料を自ら化学合成（架橋、修飾）し、機能性・架橋ヒアルロン酸系生体材料を調製する。成長因子と成長因子保持 (DDS) 材料を併用し、歯科治療効果の向上を目指す。自己調製した生体複合材料の有効性を理工学実験及び動物実験から検証する。自作する生体複合材料の臨床応用として、骨欠損部に注入することで外科的侵襲を最小限に抑えた骨造成を可能とする。また、抜歯窩にスポンジ状の生体複合材料を填入し、骨吸収の抑制を目指す。その結果、十分な骨量が得られ、インプラント治療に骨造成を行うことなく移行できる。研究のノイエスとして、水に溶解させた成長因子を DDS 材料に保持させ、架橋ヒアルロン酸に配合することで新規の骨補填材を創製する。成長因子を生体内で徐放する DDS 材料には、ナノハイドロキシアパタイト (nHAP)、ゼラチンやリポソーム等の利用を予定し、実際に骨造成に働く成長因子には BMP、bFGF やフルバスタチン等を使用する。成長因子の架橋ヒアルロン酸への直接結合もリンカー（ヘパリン等）を利用して試みる。架橋ヒアルロン酸系複合生体材料を、歯科治療効果を想定して自作し、有用性を評価する研究は歯科界ではほとんど行われておらず、本研究は意義深いと思われる。関連研究は一般企業が行うことが多く、特許公報に技術情報が偏在していて技術の共有や普及を阻害している。美容分野等での架橋ヒアルロン酸は高額で一般医療に使用できない点も改善する。ヒアルロン酸の架橋方法について文献検索的調査（和田、線維と工業、2009 他）と予備実験を行い、5 方法が採用できることを確認済である。複数架橋法の使用が特色である。

### 3. 研究の方法

#### 【ヒアルロン酸の化学的架橋戦略】

A. 酸性下-COOH 基利用架橋：エチレングリコールジグリシジルエーテル (EGDE、水溶性 2 官能エポキシ) による架橋法。

B. SH 基（チオール基）による架橋法：ヒアルロン酸 (HA) を不可逆的にゲル化する。市販品 (HyStem) を含めた、注入型ゾル-ゲル材料の調製を目指す。

架橋ヒアルロン酸の各種架橋法と理工学的性質および生吸収の関係を詳細に調べ有効な架橋法と適切な架橋条件（試薬濃度、pH、温度、反応時間）を明らかにする。DDS 材料との複合化研究がこれに続く。DDS 材料については nHAP の利用で先行している。他の材料も試みる。

令和 3 年度

材料：原料：ヒアルロン酸ナトリウム (HA-SHL)：微生物由来、分子量 160~240[万]、EDGE (製品名 デナコール EX-810)、製品：HyStem (チオール基修飾架橋型ヒアルロン酸：Merck 社製合成ヒアルロン酸) を用いた検討を行う。

A 法：ヒアルロン酸ナトリウム粉末 0.5g と蒸留水 49.5ml を混和し 1% ヒアルロン酸ゾルを調製。エッペンに 1.5ml 分注し、回転遠心分離機で 1/5 濃縮する。EGDE (pH4.0) を 150  $\mu$ l 添加し、50 に設定した恒温槽で 2 時間静置。さらに、EGDE を 150  $\mu$ l 添加し 50 で 1 時間静置。その後、4 で 1 時間静置。精製のため、架橋ゲルを透析膜に入れ蒸留水に対して 72 時間透析行う。-180 6 時間凍結後、12 時間凍結乾燥しスポンジ状の架橋ヒアルロン酸を得た。本試料に対しエチレンオキサイドガスを用いて滅菌処理を行う。

B 法：HyStem キットの使用方法に準じ、ヒアルロン酸および架橋剤の乾燥体を脱気水にて再構成する。得られたヒアルロン酸ゾルと架橋剤を混和し、ゲル化前に 0.22 $\mu$ m フィルターによるろ過滅菌処理を行う。

理工学的評価

架橋ヒアルロン酸の分子量測定、TG-DSC 熱分析、ヒアルロナーゼ溶解実験等を行う。操作性と分解性を評価する。

基礎生物学的評価

架橋および修飾したヒアルロン酸をマウス背部皮下に埋入(n=6)し、安楽死後、HE 染色を行い、安全性と生体内吸収性等の生体基礎反応を評価する。

生体に 2 週間以上存在し 4 週間程度で消失する安全性の高いヒアルロン酸架橋体・架橋条件を選択する。

令和 4 年度

架橋・修飾ヒアルロン酸と成長因子を複合化させた複合材料の硬組織再生能力の評価：

ラット頭蓋部骨欠損部(Critical size 6mm)への材料埋入による骨形成反応を評価する(n=6)。材料はハイドロゲルか凍結乾燥体を想定。一部、注入型のゾルーゲル材料を使用。評価法として、マイクロ CT、HE 染色、非脱灰組織観察(ピラヌエバ染色、蛍光二重染色)を用いる。実験計画として、Test group(T)と Control group(C)に分類し比較する。(T)ヒアルロン酸/nHAP/ BMP、(C)欠損のみ、ヒアルロン酸/BMP 等(n=6)。評価：1) マイクロ CT 使用による骨形成測定、2) 組織学的評価：脱灰組織の HE 染色。非脱灰組織によるピラヌエバ染色と蛍光(TC+CL)二重染色を実施。数値的データは統計解析によって有意差検定を行う。DDS 材料にはゼラチンも利用する。

令和 5 年度

自家調製した架橋・修飾ヒアルロン酸の理工学的性質や硬組織再生能力等の評価を続ける。

成長因子の保持と徐放性を評価する。全体の研究を総括して、歯科臨床への応用を企図する。

#### 4. 研究成果

注入試料においては、凍結乾燥・成形を必要としないことから、基材としての調製が簡便で、骨形成因子・DDS 材料複合体との混和も非常に容易であった。また、ヒアルロン酸ベース凍結乾燥体埋入試料については、EGDE にて架橋を行ったヒアルロン酸およびアルカリ処理ゼラチンを混合して調製を行い、ヒアルロン酸の濃縮やと架橋後透析処理が必要であったが、官能基の修飾といった複雑な操作を必要とせず、骨形成因子の複合化まで比較的容易に調製を行うことができた。注入試料・凍結乾燥埋入試料の両試料において理工学的評価(TG/DSC 熱分析・FTIR・ヒアルロニダーゼ溶解試験・タンパク溶出試験・タンパク吸着試験・SEM 観察)を行い、ヒアルロン酸を架橋することによる熱的安定性の向上および酵素分解時間の延長、nHAp とタンパクの吸着、nHAp 複合化による調製試料のタンパク徐放能の向上を観察・計測し、今回企画した生体材料が具備すべき各種性質が付与されていることを確認した。

動物実験については、埋入試料を用いた実験を継続的に行い、一方で、注入試料を用いた動物実験を行った。経過観察期間を経て採取した頭蓋骨サンプルについて、放射線学的評価および組織学的評価を行い、埋入試料については、初期の欠損範囲から内側に向けた骨の伸長率を算出した。注入試料については、埋入リング内の骨領域について垂直方向の長さを計測した。両試料において統計解析を行った結果、それぞれ BMP(+)群で対照群よりも有意に優れた骨形成を認めた。

これら結果は、2 編の英論文としてまとめ、それぞれオープンアクセスジャーナルにアクセプトされ、現在までに公表に至っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hachinohe Yuki, Taira Masayuki, Hoshi Miki, Hatakeyama Wataru, Sawada Tomofumi, Kondo Hisatomo	4. 巻 14
2. 論文標題 Bone Formation on Murine Cranial Bone by Injectable Cross-Linked Hyaluronic Acid Containing Nano-Hydroxyapatite and Bone Morphogenetic Protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 5368 ~ 5368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/polym14245368	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 -

1. 著者名 Hachinohe Yuki, Taira Masayuki, Hoshi Miki, Yoshida Daichi, Hatakeyama Wataru, Sawada Tomofumi, Kondo Hisatomo	4. 巻 24
2. 論文標題 Self-Prepared Hyaluronic Acid/Alkaline Gelatin Composite with Nano-Hydroxyapatite and Bone Morphogenetic Protein for Cranial Bone Formation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1104 ~ 1104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24021104	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 -

1. 著者名 Hoshi Miki, Sawada Tomofumi, Hatakeyama Wataru, Taira Masayuki, Hachinohe Yuki, Takafuji Kyoko, Kihara Hidemichi, Takemoto Shinji, Kondo Hisatomo	4. 巻 15
2. 論文標題 Characterization of Five Collagenous Biomaterials by SEM Observations, TG-DTA, Collagenase Dissolution Tests and Subcutaneous Implantation Tests	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 1155 ~ 1155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma15031155	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 -

1. 著者名 Hoshi Miki, Sawada Tomofumi, Hatakeyama Wataru, Taira Masayuki, Hachinohe Yuki, Takafuji Kyoko, Kihara Hidemichi, Takemoto Shinji, Kondo Hisatomo	4. 巻 15
2. 論文標題 Characterization of Five Collagenous Biomaterials by SEM Observations, TG-DTA, Collagenase Dissolution Tests and Subcutaneous Implantation Tests	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 1155 ~ 1155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma15031155	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八戸 勇樹, 平 雅之, 畠山 航, 吉田 大地, 星 美貴, 鬼原 英道, 澤田 智史, 近藤 尚知.
2. 発表標題 ナノHAとBMPを配合したヒアルロン酸・アルカリゼラチン複合スポンジ体によるラット頭蓋骨欠損部での骨形成評価
3. 学会等名 第52回口腔インプラント学会学術大会 2022年 名古屋
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八戸 勇樹, 平 雅之, 星 美貴, 畠山 航, 吉田 大地, 高藤 恭子, 近藤 尚知.
2. 発表標題 架橋型ヒアルロン酸/ナノHA/BMP複合ゲルによるラット頭蓋骨上での骨形成評価
3. 学会等名 公益社団法人日本口腔インプラント学会第42回東北・北海道支部学術大会 2022年 弘前
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 星 美貴, 平 雅之, 畠山 航, 澤田智史, 高藤恭子, 武本真治, 鬼原英道, 近藤尚知
2. 発表標題 市販コラーゲン系生体材料の形態と架橋度の評価
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第129回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星 美貴, 平 雅之, 畠山 航, 澤田智史, 高藤恭子, 武本真治, 鬼原英道, 近藤尚知
2. 発表標題 骨造成を目的としたコラーゲン・HA・酸性ゼラチン製顆粒とコラーゲン製メンブレンの調製及び顆粒へのFGF担持の試み
3. 学会等名 第50回日本口腔インプラント学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畠山 航, 吉田大地, 平 雅之, 星 美貴, 八戸勇樹, 鬼原英道, 澤田智史, 近藤尚知
2. 発表標題 ヒアルロン酸/アルカリゼラチン凍結乾燥複合体にBMPとナノHAを配合した4元系骨補填材の創製
3. 学会等名 第50回日本口腔インプラント学会
4. 発表年 2021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