

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650282

研究課題名（和文）細胞親和性及び骨再生を促進する環境応答性ドラッグキャリアーの開発

研究課題名（英文）Development of drug carrier for bone regeneration

研究代表者

穴田 貴久 (ANADA TAKAHISA)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：30398466

研究成果の概要（和文）：新規リン酸カルシウム結合性脂質の合成とリポソームの調整、改良を行った。脂質を高分子修飾することでリン酸カルシウムへの結合能が向上することが明らかとなった。高分子修飾リポソームは疎水性低分子薬剤を内部に取り込むことができ、時間依存的に薬物が徐放されることがわかった。リポソームを吸着させる骨再生担体についても検討を進め、リン酸オクタカルシウム（OCP）の改質、安全性評価について検討を行った。

研究成果の概要（英文）：Novel calcium phosphate-binding lipids were synthesized. The polymer modified lipids were incorporated efficiently into liposomes. We found that the calcium phosphate binding and drug encapsulation efficiencies of the polymer modified liposomes were higher than those of the unmodified liposomes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：再生医工学材料、骨再生、ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

疾病や事故などによる大きな骨欠損の再建・修復には自家骨移植が多く行われているが、骨採取部位への外科的侵襲と採取量に限界があることが問題点である。自家骨に代わる人工骨再生担体としてヒドロキシアパタイト（HA）やβ-リン酸三カルシウム（β-TCP）は骨親和性に優れており、既に臨床に用いられているがこれら既存材料は吸収が遅く、自家骨に比べて骨再生能、吸収速度の点で劣っているのが問題点である。そこで我々は、これらに代わる新規骨補填剤の開発を行っている。これまでに我々は、リン酸オクタカルシウム（OCP）が *in vitro* で骨芽細胞分化を促進すること（Anada et al, *Tissue Eng*, 2008, 14, 965）、*in vivo* で優れた骨伝導能及び生体内吸収性があることを世界に先駆けて報告して

いる（S. Kamakura, O. Suzuki, *J Biomed Mater Res* 59, 29, 2002, N. Miyatake, et al., *Biomaterials*, 2009, 30, 1005 など）。HA や β-TCP にはない OCP の特徴は、生理的環境下において自発的に HA 構造へと結晶転換を起し、それに伴いイオンの出入りが生じて周囲の局所イオン環境を変化させることである。

これまでに HA や生分解性高分子などの担体の骨再生能を補うために、遺伝子や成長因子などのタンパク質を導入剤と複合化させて骨再生へと応用している例が報告されている（*Gene Therapy*, 2005, 12, 418）。しかしながら、複合体を担体材料に埋め込んでおく手法がほとんどであり、導入剤が担体材料に対して特異的な結合を持つようなものはほとんど報告されていない。導入剤が担体材

料に対して高い親和性を有することで、より厳密な薬物徐放の制御が可能であり、他の部位への薬剤拡散による副作用の低減や、より長期的な薬効が期待できる。

2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究の目的は、細胞-細胞間で行われている情報伝達システムを模倣したマテリアル-細胞間情報伝達を可能とする画期的なバイオ分子システムを構築し、新規骨再生治療法へと応用することである。具体的には、刺激応答性を有するナノ構造体（リポソーム）にリン酸カルシウム特異的結合部位を導入し、独自開発のリン酸カルシウム骨再生担体表面に組織化する。担体から放出されるイオンを情報伝達物質として、担体→ナノ構造体→細胞への骨形成指令伝達システムを構築する。このシステムにより、これまでには困難であった自家骨移植法に匹敵する高い骨再生能を人工材料で達成する画期的骨再生治療法の確立を目指す。また、リポソームを固定化し、生体内で骨再生を促す担体材料の開発も目指す。

3. 研究の方法

ポリエチレングリコール（PEG）をリンカーに有する脂質の末端を活性化し、この溶液にビスホスホネートの一種であるアレンドロネートを加え、一晚室温で攪拌した。その後、反応液を3日間室温で透析し、凍結乾燥することによりリン酸カルシウム結合性脂質（BP-PEG-lipid）を得た。リポソーム構成脂質として distearylphosphatidylcholine（DSPC）、コレステロールを混合することでリポソームを調製した。比較としてリン酸カルシウム結合部位であるビスホスホネート（BP）を含まない PEG 修飾リポソーム（DSPE-PEG）も調整した。また、高分子リンカーを含まずに BP と脂質を結合させた BPL も合成し、比較を行った。

BP-PEG-lipid の量を変化させ、リピッドフィルムを調製した。純水を加えて脂質濃度が 2 mM となるように溶液を調製し、60°C 加温下で extruder を用いて（100 nm ポアフィルター）整粒した。この溶液を希釈して動的光散乱、ゼータ電子測定システムにより粒径及びゼータ電位を測定した。

リポソームを 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 中に 100 μM になるようにし、ハイドロキシアパタイト（HA）を 0, 1, 2, 3, 5, 10 mg/ml 添加した。5 時間回転混和した後、5000 rpm 2 分間遠心分離し、上澄みに含まれるリポソーム由来の散乱強度を光散乱計を用いて測定した。

新規骨再生担体としてリン酸オクタカル

シウム（OCP）を種々の条件で合成し、骨再生材としての評価を行った。

4. 研究成果

(1) リン酸カルシウム結合性リポソームの調製

合成した BP-PEG-lipid の割合を変化させて DSPC 及びコレステロールと混合することでリポソームを調製した。比較として、リン酸カルシウム結合部位を含まず、高分子修飾だけを行った脂質（PEG-lipid）も合成し、同様の条件でリポソームを調製した。表 1 に調製したリポソームの平均粒径及び表面電位（ゼータ電位）をまとめた。

表 1. 調製したリポソームの平均粒径およびゼータ電位。

	粒径 (nm)	ゼータ電位 (mV)
BP-PEG-lipid 1%	127.1±24.5	-14.9±1.6
BP-PEG-lipid 2%	126.9±40.9	-17.6±2.5
BP-PEG-lipid 5%	116.0±28.2	-24.0±2.7
BP-PEG-lipid 10%	112.1±34.2	-29.9±2.0
PEG-lipid 5%	110.2±31.9	-6.5±0.5
PEG-lipid 10%	101.8±44.5	-11.3±0.4

全てのリポソームにおいて粒径は 100-130 nm の大きさであった。BP 脂質を含むリポソームはその含有量が多くなるに伴いゼータ電位が負に大きくなった。これは BP が分子内にリン酸基を 2 つ有する構造を反映したものであり、リポソームへ BP 脂質が取り込まれていることを示していると考えられる。また、BP 部位がリポソーム外側に多く存在していることを示している。BP を含まない DSPE-PEG もその割合が多くなると負電荷が大きくなる傾向にあったが、同含量の BP リポソームと比べると負電荷は小さかった。

(2) ハイドロキシアパタイト（HA）へのリポソームの吸着

<実験>表 1 に示したそれぞれのリポソームを 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 中に 100 μM になるようにし、HA を 0, 1, 2, 3, 5, 10 mg/ml 添加した。5 時間回転混和した後、5000 rpm 2 分間遠心分離し、上澄みに含まれるリポソーム由来の散乱強度を光散乱計を用いて測定した。

<結果>BP及びPEGを含まないリポソーム (conventional liposome, BP0%) は、HA への結合がほとんど認められなかった。同様に、PEG-lipid5%及び10%リポソームもHAへの吸着はほとんど見られなかった。

それに対して、BP-PEG-lipid を含むリポソームの場合には、BP 量依存的に HA への結合が確かめられた。全てのリポソームにおいて HA 3 mg/ml 以上の添加量でほぼ 100% のリポソームが HA に結合したと考えられる。

(3) HA へ吸着における BP-PEG-lipid と BPL の比較

<実験>生体内へリポソームを導入する場合に血中安定性の向上と細網内皮系からの回避のためにリポソーム表面を PEG 修飾した「ステルスリポソーム」が報告されている。BP 修飾リポソームを生体内で用いることを想定し、リポソームを PEG 化した場合の HA への吸着を BP-PEG-lipid と BPL で比較した。DSPC : コレステロール : DSPE-PEG = 10:5:1 とし、BPL を 1% または 5% となるようにリポソームを調整した。4.2 の実験と同様にリポソームを調整し、HA への結合を評価した。また、調製したリポソームの平均粒径及びゼータ電位を測定した。

<結果>BP-PEG-lipid、BPL リポソームともに BP の割合が多くなると HA への吸着率が向上した。BP 含有率が同じ BP-PEG-lipid、BPL リポソームを比較すると、BP-PEG-lipid リポソームの方が有意に HA 吸着能が高いことがわかった。これは表 2 に示したゼータ電位が BP-PEG-lipid リポソームの方が BPL リポソームよりも負電荷が大きいことから図 1 の模式図に示すようなリポソーム構造を取っているためではないかと推察される。すなわち、BPL リポソームでは HA 結合部位である BP 部分が PEG 鎖の立体障害により遮蔽され、HA 結合能が低下したものと考えられる。それに対して、BP-PEG-lipid リポソームでは BP 部分が PEG 鎖の先端にあるため HA 結合能が保持されていると考えられる。

表 2. PEG 脂質を混合したリポソームの平均粒径およびゼータ電位。

	粒径 (nm)	ゼータ電位 (mV)
BP-PEG-lipid 1% + DSPE-PEG	115.2±24.5	-16.0±2.1
BP-PEG-lipid 5% + DSPE-PEG	123.0±37.1	-22.4±2.8
BPL1% + DSPE-PEG	106.8±32.5	-13.1±2.4
BPL5% + DSPE-PEG	121.5±37.0	-15.5±3.8

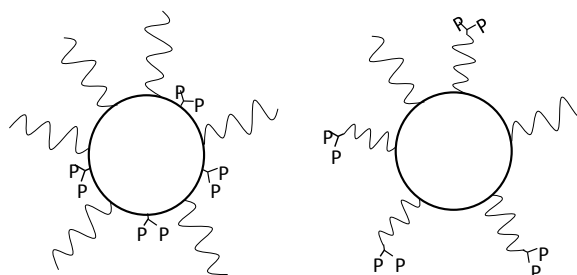


図 1. BPL + DSPE-PEG リポソーム (左) 及び BP-PEG-lipid + DSPE-PEG リポソーム (右) の模式図。左は HA 結合部位である BP が PEG 鎖の立体障害により遮蔽され、HA 結合能が低下したと考えられるが、右は PEG 先端に BP があるため HA 結合能の低下は小さいと考えられる。

(4) 抗癌剤のリポソームへの内包

<実験>リポソーム内に封入する薬剤のモデルとして、リポソームへ効率的に取り込まれることが知られている低分子薬剤ドキソルビシン (Dox) をモデルとして実験を行った。Dox がリモートローディング法 (pH 勾配法) によりリポソーム内へ取り込まれるかの確認を行った。pH 4.0, 300 mM クエン酸溶液に 2 mM となるようにリポソームを調製し、extruder を用いて 100 nm に整粒した。1 M NaOH、1 M Hepes buffer (pH 7.4) でリポソーム溶液を pH7.4 にし、ドキソルビシン (Dox) : 脂質が 2 : 1 (mol) になるように Dox 水溶液をリポソームに添加した。その溶液を 60°C で 10 分間加温し、Dox をリポソーム内へ内包させた。PD-10 カラムを通し、内包されなかった Dox を除去した。カラム後の溶液に終濃度 5% となるように Triton-X100 を加えて、混合後 (リポソームの破壊)、480 nm の吸光度を測定し、内包されていた Dox の定量を行った。

<結果>結果を表3に示す。BPL リポソームでは BPL 含有量が増加すると著しく Dox 内包率が低下したが、BP-PEG-lipid リポソームでは含有量 5%と 10%で大きな差が見られず、これまでに報告していた BPL リポソームよりも Dox 内包率の大幅な向上がみられた。この結果は PEG 鎖を介して BP を導入することでリポソーム表面近傍から BP を遠ざけることで BP の Dox 取り込みへの干渉を抑制できたためであると考えられる。しかしながら、全てのリポソームにおいて Conventional liposome より内包率は低下した。これは BP を含まない DSPE-PEG リポソームにおいても内包率が低下していることから、PEG がリポソーム内水相に入り込み、Dox 内包率が下がるためであると考えられる。

表 3. Dox のリポソームへの内包率

	Dox 内包率 (%)
conventional liposome (BP0%)	94.2
BPL 5%	62.8
BPL10 %	35.3
DSPE-PEG-BP5%	71.2
DSPE-PEG-BP10%	70.1
DSPE-PEG5%	83.7
DSPE-PEG10%	61.6

以上のように、リン酸カルシウムに結合し、薬剤を内包することができるリポソームを作製することができた。このリポソームを結合させ、骨再生を促進するための担体材料開発も行い、研究成果を論文投稿することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Y Honda, T Anada, S Morimoto, O Suzuki, Labile Zn ions on octacalcium phosphate-derived Zn-containing hydroxyapatite, *Appl Sur Sci*, 273, 2013, 343-348.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.02.040> (査読有り)

2. S Morimoto, T Anada, Y Honda, O Suzuki. Comparative study on in vitro

biocompatibility of synthetic octacalcium phosphate and calcium phosphate ceramics used clinically, *Biomed Mater*, 7, 2012, 045020. doi: 10.1088/1748-6041/7/4/045020 (査読有り)

3. Y Shiwaku, T Anada, H Yamazaki, Y Honda, S Morimoto, K Sasaki, O Suzuki. Structural, morphological and surface characteristics of two types of octacalcium phosphate-derived fluoride-containing apatitic calcium phosphates. *Acta Biomater*, 8, 2012, 4417-4425. doi: 10.1016/j.actbio.2012.07.041. (査読有り)

[学会発表] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.cfe.dent.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

穴田 貴久 (ANADA TAKAHISA)
東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号 : 30398466

(2)研究分担者

鈴木 治 (SUZUKI OSAMU)
東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号 : 60374948

