

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500532

研究課題名(和文)リン酸エステル系高分子による骨リモデリングの正常化

研究課題名(英文)Preparation of polyphosphoesters for controlled bone remodeling

研究代表者

岩崎 泰彦 (Iwasaki, Yasuhiko)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：90280990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は骨のリモデリングの制御を可能にするポリマーの獲得を目的とし実施された。研究期間の前半においてポリリン酸エステルの新たな合成法に着手し、従来法よりも温和な条件で、かつ、毒性の原因となる金属を一切使用しない合成手法を確立した。続いて、ポリリン酸エステルと血漿タンパク質および血球細胞との相互作用を調査し、合成したポリリン酸エステルがタンパク質の変性や細胞の溶血を惹起しないことを明らかにした。研究後半では、骨リモデリングに関与する骨芽細胞と破骨細胞におよぼすポリリン酸エステルの影響を調べ、ポリリン酸エステルが、破骨細胞の機能を特異的に脆弱化することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Polyphosphoesters are unique polymeric biomaterials because of their biocompatibility, biodegradability and bone affinity. Synthesis of poly(ethylene sodium phosphate) (PEP-Na) was achieved through ring-opening polymerization of 2-methoxy-2-oxo-1,3,2-dioxaphospholane followed by hydrolysis. We investigated the viability and function of human osteoclasts and murine osteoblasts precursors in contact with 100 mg/mL of PEP-Na. This did not trigger any significant effect on osteoblast cell viability. In contrast, the polymer effectively reduced the adhesion of human osteoclasts on bone slices at concentration as low as 0.0001 mg/mL. Moreover, the in situ generation of resorption pits was also effectively reduced. This is the first report to demonstrate the possibility of using polyphosphoesters for selective inhibition of osteoclast function and bone resorption. This study indicates that PEP-Na has potential to be used as an effective polymer prodrug for bone therapy.

研究分野：生体材料学

キーワード：ポリリン酸エステル 開環重合 骨リモデリング 骨芽細胞 破骨細胞 DDS プロドラッグ

1. 研究開始当初の背景

世界的に高齢化が進行している状況において、高齢者が活気ある自立した社会生活をおくるために、医療、健康に関わる技術革新は必至であり、とりわけ安全かつ確かな医療器具や医薬品の開発は重要な課題と言える。現在、骨粗鬆症の第一選択薬として分子内に2つのリン酸基を持つビスホスホネート(BP)が用いられている。BPは骨治療に極めて有効である反面、食道内で炎症を引き起こすことや、消化管での吸収が悪いことなど、欠点も有している。また、BPと顎壊死との関連性も指摘されており、新たな骨治療薬の創出は急務である。このような背景のもと、研究代表者は新たな骨治療用ポリマー医薬品の創出に着手し、平成21年度～23年度の科学研究費・若手研究(A)において、本研究計画の基礎となる研究を遂行している。若手研究(A)の中で、医薬品として生分解性ポリマーを用いる際、常に指摘される、重合触媒として用いる有機金属の毒性と広い分子量分布の問題について検討し、ポリリン酸エステルの新たな重合法を確立した。また、部分的にイオン化されたポリリン酸エステルの合成にも成功し、このポリマーが、骨の主成分であるヒドロキシアパタイト(HAp)に親和性を示し、またBPの最も基本的な性質であるHApの形成および溶解を阻害する効果を示すことを見出した。さらに、このポリマーがBPに比べ著しく低毒性であることも明らかにした。

これらの研究成果を基盤とし、本研究ではポリリン酸エステルが骨リモデリングに關与する細胞の機能におよぼす作用を詳細に調べる。加齢とともに骨密度が低下する骨粗鬆症は骨リモデリングのバランスが崩れることから起こる。すなわち、破骨細胞の働きが骨芽細胞の働きを過度に上回る。破骨細胞の働きは、骨転移した腫瘍細胞によっても活発化されることが明らかにされており、骨粗鬆症、骨転移とともに、破骨細胞の働きを抑えることがまず重要となる。BPは、破骨細胞に選択的に取り込まれ、細胞内でメバロン酸合成を阻害し、その結果、破骨細胞のアポトーシスを誘導する。そこで、破骨細胞の働きを脆弱化するポリリン酸エステルの獲得を目指す。このような活性をポリリン酸エステルおよびその分解生成物が発現するかを調査するとともに、破骨細胞のアポトーシスを誘導する分子を担持したポリマーの合成についても検討する。さらに、骨芽細胞の機能を亢進するポリマーの合成も進め、これらの結果を総括して、骨リモデリングの正常化に有効なポリマー医薬品の形態を体系化する。

2. 研究の目的

超高齢化が急速に進む現代社会において、人々が健やかな生活を続けるために安全かつ確実な骨治療薬の開発は不可欠である。本研究は骨治療に有効なポリマー医薬品の創出

を目指し、骨のリモデリングに關与する細胞の機能におよぼすポリリン酸エステルの作用を詳細に調べ、骨粗鬆症や骨転移の治療薬として有効なポリマーの分子形態の最適化を目的として企画された。具体的な研究実施項目は、1.安全性を考慮したポリリン酸エステルの合成法の確立、2.ポリリン酸エステルと生体成分との物理的相互作用解析(タンパク質変性および溶血活性など)、3.ポリリン酸エステルが骨芽細胞および破骨細胞の機能にもたらす影響の明確化、の3つである。これらを相互に關連づけ、分子設計にフィードバックし、ポリリン酸エステルの構造最適化を図る。

3. 研究の方法

3-1. ポリリン酸エステルの合成とキャラクタリゼーション

本研究ではポリリン酸エステルを環状リン酸エステルの開環重合により合成した。研究代表者らは、これまでにベンジル基を側鎖に持つ環状リン酸エステルを開環重合し、引き続きベンジル基を脱保護することにより、部分的にイオン化されたポリリン酸エステルの合成に成功している。しかし、本研究では生理活性物質を後修飾するための置換基を導入することを計画しており、想定している多くの置換基が上記論文で用いた脱保護反応の影響を受けると予測される。そのため、新たな方法で、ポリリン酸ジエステル、ポリエチレンホスフェート(PEP)の合成を試みた。

3-2. PEP·Na とタンパク質および血球細胞との相互作用

血漿に含まれる代表的なタンパク質、アルブミン、免疫グロブリン、フィブリノーゲンを生体濃度で溶解した緩衝溶液にポリマーを後から添加し、ポリマーの添加にともなうタンパク質の高次構造変化を円二色性分散計により調べた。さらに、市販の赤血球ゴーストを使用し、PEP·Naの溶血活性を評価した。

3-3. 骨関連細胞に及ぼすポリマーの影響

3-3-1. マウス骨芽様細胞を用いた評価

PEP·Naが骨芽細胞の生育に及ぼす影響を評価した。まず、急性の応答についてはマウス骨芽様細胞(MC-3T3E1細胞)を播種したウェル内に所定量のポリマーを添加する。その後、24時間ごとに市販のキットを用いてウェル内の細胞数を定量した。

3-3-2. ヒトマクロファージ様細胞(破骨細胞)を用いた評価

Uppsala病院血液バンクの倫理審査を受け入手したヒト新鮮血より単離した単球を所定の培地で培養し、破骨細胞に分化させた。破骨細胞への分化はTRAcP染色により確認した。破骨細胞の機能におよぼす PEP·Na

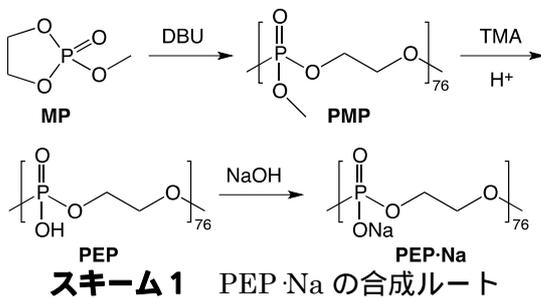
の影響をウシ骨片上で培養し評価した。

4. 研究成果

4-1. ポリリン酸エステル合成とキャラクタリゼーション

環状リン酸エステルモノマーである 2-メトキシ-2-オキソ-1,3,2-ジオキサホスホラン(MP)を開始剤にメタノール、重合触媒に1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセンを用い無溶媒系で開環重合したところ、数平均分子量 7.8×10^3 、分子量分布 1.3 のポリリン酸エステル(PMP)を得た。続いて、このポリマーにトリメチルアミンを作用させ、PMP 側鎖のメチル基を4級化し、その後、陽イオン交換樹脂と接触させ、PEPを得た。PEPを溶解した水溶液をNaOHの水溶液中で中和し、純水で透析後、凍結乾燥してPEPのナトリウム塩(PEP·Na)を得た。PEP·Naの合成ルートをスキーム1に示す。

本合成法は従来の方法と比べ温和な条件であり、金属触媒や水素添加反応を介さないため細胞毒性を示す金属がポリマーに残留する心配もない。



4-2. PEP·Na とタンパク質および血球細胞との相互作用

PEP·Naとの接触に伴うタンパク質の二次構造変化は全く認められなかった。さらに、赤血球サスペンションにPEP·Naを添加しても全く溶血せず、PEP·Naが細胞膜障害活性を示さないことが明らかとなった。これらの結果からPEP·Naが血中に存在するタンパク質や細胞と非特異的に相互作用しないことが明らかとなった。

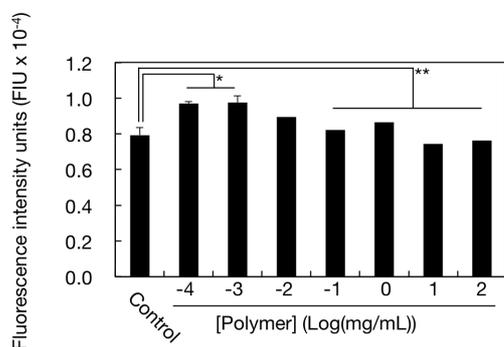


図-1 PEP·Naを含む培地中で24時間培養された骨芽細胞の生存率

4-3. 骨関連細胞に及ぼすポリマーの影響

4-3-1. マウス骨芽様細胞を用いた評価

図-1の結果より、100mg/ml以下の濃度において、PEP·Naは全く細胞の生存率に影響を与えないことがわかる。すなわち、PEP·Naは骨芽細胞の生育に悪影響を及ぼさないことが理解できる。

4-3-2. ヒトマクロファージ様細胞(破骨細胞)を用いた評価

図-2にPEP·Naが破骨細胞の接着におよぼす影響を示す。PEP·Naの濃度が増すにつれて破骨細胞の接着数が抑制されることがわかった。図3は細胞を4週間培養した後の骨表面のSEM像である。PEP·Naを含まない条件で培養を行った骨表面は溶解痕が多数見られるのに対し、PEP·Naを添加した系では効果的に骨の溶解が抑制されていることがわかる。

以上の結果から、PEP·Naは骨芽細胞の生育には全く影響を与えず、破骨細胞の骨への接着を抑制し、その結果、骨の溶解が抑制されることが明らかとなった。PEP·Naは温和な条件合成でき、他の薬剤を複合化することも容易に行えることから、骨治療のためのポリマー医薬として期待できる。

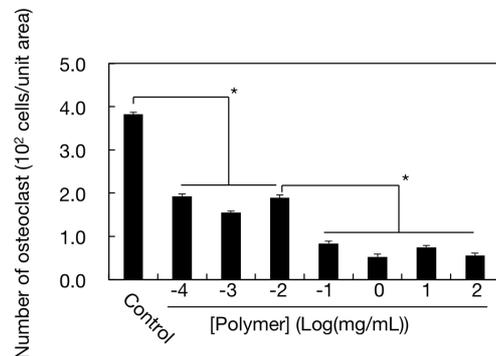


図-2 ウシ骨スライス表面で培養されたヒト破骨細胞の接着数とPEP·Na濃度の関係

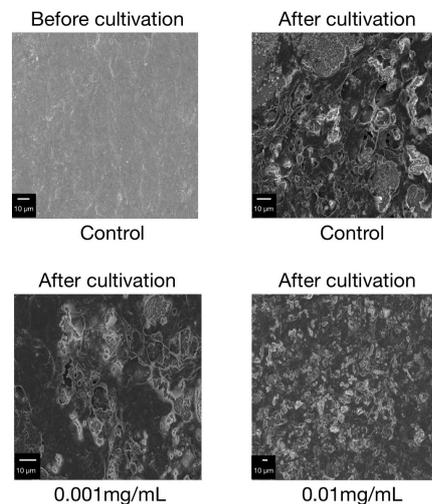


図-3 PEP·Naが細胞性骨溶解に与える影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- Iwasaki Y, Takahata Y, Fujii S. Self-setting particle-stabilized emulsion for hard-tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2015;126:394-400. (査読有)
- 岩崎泰彦. リン酸エステル結合を主鎖にもつポリマーの制御合成と薬物輸送担体への応用. *日本ゴム協会誌* 2014;87:411-415. (査読無)
- Tamura A, Tokunaga M, Iwasaki Y, Yui N. Spontaneous assembly into pseudopolyrotaxane between cyclodextrins and biodegradable polyphosphoester ionomers. *Macromol. Chem. Phys.* 2014;215:648-653. (査読有)
- 岩崎泰彦. 核酸の構造に倣ったポリマーバイオマテリアル. *機能材料* 2013;33:48-54. (査読無)
- Iwasaki Y, Katayama K, Yoshida M, Yamamoto M, Tabata Y. Comparative physicochemical properties and cytotoxicity of polyphosphoester ionomers with bisphosphonates. *J. Biomater. Sci., Polym. Edn.* 2013;24:882-895. (査読有)
- Ikeuchi R, Iwasaki Y. High mineral affinity of polyphosphoester ionomer-phospholipid vesicles. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2013;101A:318-325. (査読有)
- Ikeuchi R, Iwasaki Y. Synthesis of amphiphilic polyphosphoester ionomers for surface modification of small unilamellar phospholipid vesicles. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.* 2012;37:365-368. (査読有)

〔学会発表〕(計17件)

- 徳永昌啓, 岩崎泰彦, 原田敦史. 硬組織親和性を示すポリマー/酵素複合体の調製, 第36回日本バイオマテリアル学会大会, 2014年11月18日, タワーホール船堀, 東京.
- 徳永昌啓, 岩崎泰彦, 原田敦史. 骨親和性酵素複合体の調製, 日本バイオマテリアル学会第9回関西若手研究発表会, 2014年8月5日, 京都大学, 京都.
- 徳永昌啓, 岩崎泰彦. ポリリン酸エステルを修飾したリゾチームの溶菌活性, 第43回医用高分子シンポジウム, 2014年7月29日, 産業技術総合研究所臨海副都心センター, 東京.
- Iwasaki Y. Polyphosphoester-based biomaterials, Macro2014, July 5th, 2014, ChiangMai, Thailand.
- 古田周平, 岩崎泰彦. ポリリン酸エステルアイオノマーをグラフトした表面での骨芽細胞の機能誘導, 第35回日本バイオマテリアル学会大会, 2013年11月25日, タワーホール船堀, 東京.
- 高畑祐輔, 岩崎泰彦, 藤井秀司. 硬組織

補修を指向した自己硬化型微粒子安定化エマルジョン, 第35回日本バイオマテリアル学会大会 2013年11月25日, タワーホール船堀, 東京.

徳永昌啓, 岩崎泰彦, 原田敦史. ポリリン酸エステルアイオノマー修飾タンパク質の調製と機能, 第62回高分子討論会, 2013年9月11日, 金沢大学, 金沢.

高畑祐輔, 岩崎泰彦, 藤井秀司. 連通多孔質硬化体を自発的に形成する無機/有機微粒子安定化エマルジョン, 第8回日本バイオマテリアル学会関西若手研究発表会, 2013年8月31日, 大阪大学, 大阪.

徳永昌啓, 岩崎泰彦, 原田敦史. ポリリン酸エステルアイオノマーと複合化したタンパク質の特能, 第59回高分子研究発表会(神戸), 2013年7月12日, 兵庫県民会館, 神戸.

高畑祐輔, 岩崎泰彦, 藤井秀司. 無機/有機微粒子を用いた多孔質構造を形成する新規骨ペーストの開, 第59回高分子研究発表会(神戸), 2013年7月12日, 兵庫県民会館, 神戸.

徳永昌啓, 岩崎泰彦. ポリリン酸エステルアイオノマーとタンパク質の複合化, 第62回高分子学会年次大会, 2013年5月29日, 京都国際会館, 京都.

高畑祐輔, 岩崎泰彦, 藤井秀司. 無機/有機混合微粒子からなる自己硬化型エマルジョンの創製, 第62回高分子学会年次大会, 2013年5月29日, 京都.

高畑祐輔, 岩崎泰彦, 藤井秀司. 微粒子安定化エマルジョンをテンプレートとした自己硬化型骨補填材の創製, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012, 2012年11月26日, 仙台国際センター, 仙台.

岩崎泰彦. 生体に倣ったリン含有ポリマーバイオマテリアルの設計, プラスチック技術者協会の定例講演会, 2012年10月25日, 住友ベークライト 東京.

高畑祐輔, 岩崎泰彦, 藤井秀司. 無機/有機混合微粒子安定化エマルジョンを鋳型とした骨補填材の創製, 日本バイオマテリアル学会第6回関西若手研究発表会, 2012年8月2日, 甲南大学, 神戸.

Takahata Y, Iwasaki Y, Fujii S. Porous hydroxyapatite substitutes generated from self-setting particle stabilized emulsions, 7th International Symposium in Science and Technology, Penang, August 30th 2012, Malaysia.

58. 高畑祐輔, 岩崎泰彦, 藤井秀司. ピッカリングエマルジョンを鋳型とした無機/有機複合多孔質体の調製, 第58回高分子研究発表会(神戸), 2012年7月13日, 兵庫県民会館, 神戸.

〔図書〕(計2件)

岩崎泰彦. 合成高分子(生体非吸収性).
遺伝子医学 MOOK 別冊 細胞の3次元組
織化 - その最先端技術と材料技術. (田
畑泰彦 編集) メディカルドウ p52-58
(2014).

岩崎泰彦. リン原子含有ポリマーのバ
イオマテリアルへの応用. 先端バイオ
マテリアルハンドブック(秋吉一成, 石
原一彦, 山岡哲二 監修) NTS.
p283-287 (2012).

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chemmater.kansai-u.ac.jp/biomat/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 泰彦 (IWASAKI, YASUHIKO)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：90280990

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：