

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463062

研究課題名(和文) 薬剤徐放性骨再生材料の新規開発

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

研究代表者

馬場 俊輔 (BABA, Shunsuke)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40275227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：線維芽細胞増殖因子(bFGF)は未分化間葉系幹細胞を増殖および分化をさせ骨形成を促すことが知られている。ヘパリンとの静電的相互作用を介してbFGFを高効率かつ高活性でリン酸三カルシウム多孔体( $\alpha$ -TCP)に固定化することを可能にした。ラット頭蓋冠骨欠損モデルとイヌ下顎骨欠損モデルを用いてbFGF/ $\alpha$ -TCPが骨再生に有用であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances the proliferation of undifferentiated mesenchymal cells, resulting in the promotion of bone formation. bFGF was immobilized on porous alpha-tricalcium phosphate ( $\alpha$ -TCP) particles through a specific interaction with heparin. This study demonstrates that porous  $\alpha$ -TCP with immobilized bFGF is sufficiently adaptable for treatment of rat calvarial and canine mandibular bone defects.

研究分野：口腔インプラント学

キーワード：薬剤徐放性担体 骨再生

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え現在我が国における歯周病患者は9000万人と推定され、その中でも重症歯周病患者は約800万人ともいわれている(厚生労働省医政局歯科保険課:平成11年度歯科疾患実態調査)。しかし、重症患者に対しては治療を断念し、抜歯することも多い。また、エムドゲインやGBR治療も行なわれるが決定的な方法とは言い難い。画期的な足場材料を開発し、迅速かつ確実な歯槽骨再生を可能にすれば、高齢化社会の質的向上へ大きく寄与できる。

Basic fibroblast growth factor (bFGF)は我が国で褥瘡・皮膚潰瘍治療剤(フィブラストスプレー)としてすでに臨床応用がされている細胞増殖因子である。このbFGFは血管新生作用および線維芽細胞増殖促進作用を有し、新生血管に富んだ良性肉芽を形成するため、創傷治癒を促進させると同時に骨再生を促進する効果がある。一方、生体において肝臓で生成される生体内物質のヘパリンはbFGFとの親和性に優れ、その存在下でbFGFの生理活性化を促進することが知られている(Biomaterials, 2010;31, 7985-7994)。また、リン酸三カルシウム(-TCP)は生体親和性の高い合成アパタイトセラミックスで、ハイドロキシアパタイトと同様に優れた骨伝導能を有するため我が国では整形外科領域で10年以上前から臨床応用が行われてきた(Dent Mater J 2006;25:138-144)。

申請者らはこれまで骨組織の再生を目指し、生体吸収性材料と細胞を組み合わせた再生療法の開発を進めてきた(J Osaka Dent Univ, 2011; 45: 151-157, Dent Mater J, 2010; 29: 673-681)。確かに幹細胞治療は魅力的な治療法ではあるが、一般臨床を鑑みた場合未だ費用対効果に乏しく、幹細胞を用いないティッシュエンジニアリングの開発が平行して進められる必要がある。そこで、申請者は高い生体親和性と優れた骨伝導能を有する-TCPに改めて着目し、あらかじめ多孔質体にした-TCPブロックを破碎して作製したTCP多孔粒子と人工コラーゲンゲル水溶液とゲル水溶液をミニブタ頭蓋骨骨欠損モデルに移植した実験を行なった。その結果、X線マイクロCT画像から、わずか4週で骨体積がPoly(PHG)ゲル水溶液単独群と比較して-TCP多孔質体を溶液に混合することで骨体積が顕著に増加したことを明らかにした(Dent Mater J 2011; 30: 913-922)。

この組織再生効果を更に高め、幹細胞存在状態と同等の手段を得るには、In situにおいて細胞を局所誘導する手法は、やはり必要となる。bFGFは、再生を必要とする局所周圍からの細胞を-TCPなどの足場材料にIn situで誘導し、さらに足場内部に毛細血管を侵入、新生させることで細胞の増殖・分化が促進し、確実に骨再生させる事が可能となる。しかしながら、成長因子の単純なCaP担体塗布は、埋入後すぐにバースト放出を起こし、

局所領域に最適な薬剤濃度を担保出来ない事が知られており、bFGFを-TCP表面に留め、徐放効果を可能とする新たな工夫が必須であった。これらの背景を踏まえ、申請者らは-TCP多孔質体とヘパリンを化学的に結合させた薬物徐放担体を独自に作製し、同新規担体の骨再生能を評価する本申請の着想を得るに至った。

### 2. 研究の目的

-TCP多孔質体にヘパリンを化学的に固定化した薬物徐放足場は、bFGFを担持可能であり、bFGFを熱や酵素による不活化要因から保護して活性を維持延長することが見込まれる。従って、ラット頭蓋骨欠損モデルやビーグル犬の顎骨骨欠損モデルにおいてもbFGF/薬物徐放足場の移植によって新生骨形成率が増加することが予想される。

本複合材はティッシュエンジニアリングの3要素のうち足場とシグナル因子の2要素に加え、そのシグナル因子を徐放する生体機能性を兼ね備えているため自家骨移植や細胞移植に代わる骨再生医療材料となりうる。本材料が実用化すれば、ヘパリンはbFGFだけでなく他のサイトカインとも親和性が高いことが知られており、サイトカインを用いた歯周組織再生治療の発展に大きな貢献が期待できる。

本研究の遂行により、迅速な治療や優れた骨増生が可能となれば、インプラント治療の適応範囲が大幅に広がり高齢化社会の質的向上に対し極めて大きな貢献が出来ると思える。

### 3. 研究の方法

#### (1) 薬物徐放足場の作製

接着性ペプチドは、Fmoc固相合成法により作成する。海洋性接着タンパク質の活性配列であるAla-Lys-Pro-Thr-Tyr-LysもしくはAla-Lys-Pro-Ser-Tyr-Hyp-DOPA-Thr-Tyr-Lysを選択し、末端にはシステイン残基を導入する。一方、分子量の異なるヘパリンに対して、カルボニルジイミダゾール活性化を施し、マレイミド残基を導入する。得られたマレイミド化ヘパリンと、海洋性ペプチドとを結合させることで、固相反応性ヘパリン誘導体を合成する。これらのヘパリン誘導体を用いて、所定濃度にて-TCP多孔質体と反応させ、ヘパリン固定化薬物徐放足場を作製する。その後、所定濃度所定量のbFGFとインキュベートすることで、薬物徐放足場へのbFGFの固定化を行う。

#### (2) 修飾条件の設定

安定した空孔径等の構造特性が得られ、かつ非分解性で移植後の空孔径変化がないポリエチレン多孔質(PPSs)を採用した。Underwoodらの報告を参考に、最も組織誘導効率が高い空孔径=32 $\mu$ m(気孔率=45%; Sunfine AQ-900, 旭化成)の多孔質体を用いた。

(3) ラット動物実験モデルの確立と移植試験

-TCP 顆粒サイズの規格化のために、マウス頭蓋冠臨界骨欠損モデルを使用し、2種類の -TCP 顆粒の顆粒径の違いが骨形成能に及ぼす影響を検討した。実験材料として用いた2種類の -TCP 顆粒は、200 μm 以下、500-600 μm (以下 -TCP200、 -TCP600 と表記)に整粒し用いた。骨形成能評価において、4 週までは両顆粒間で大きな違いが認められなかったため -TCP600 をラットモデルで使用した。

ラット頭蓋冠の中心に直径 9 mm、深さ 1 mm のクリティカルサイズの骨欠損を形成する。以下の3群について実験を行う。群分けとしては、(a)薬物徐放性骨再生材料群(b)骨再生材料群(c)移植しない群とする。実験期間は2、4、8 週とする。

(4) イヌ顎骨骨欠損モデル

ビーグル犬(雌、2歳)を用いて、麻酔奏効後に下顎小臼歯を抜去し、8 週の治療を経過後、インプラントドリルを用いて骨窩洞(直径 4.5 mm、深さ 6 mm)を3ヶ所形成する。実験群には -TCP/ヘパリン/FGF-2 複合体、対照群には -TCP、 -TCP/ヘパリン複合体を骨窩洞に填入し閉鎖創とする。術後4、8 週に各2匹を安楽死させ、10%中性緩衝ホルマリンによる灌流固定を行い下顎骨を摘出。実験部位をマイクロCTで撮影し骨のパラメーター解析を行う。

4. 研究成果

(1) 修飾条件の設定

図1には未処理 PPS 片(PPS)と表面ペプチド処理をした PPS 片(SMP-PPS)をヘパリン溶液(1000 units/mL; ノボヘパリン, 持田製薬)に8時間浸漬し、ヘパリン吸着量を評価した。ペプチド処理群(SMP/Hep-PPS)では、試験片あたり 23 μg のヘパリンが吸着したのに対して、未処理群(Hep-PPS)では 17 μg のヘパリンが吸着し、ペプチド処理によりヘパリン吸着量が有意に増加した。(n=3; p < 0.05; Tukey's test)

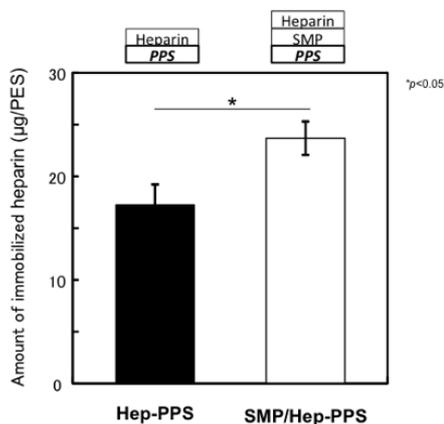


図1 多孔質体(PPS)上、および、海洋性ペプチド-カチオンペプチド結合体(SMP)修飾後のヘパリン結合量

また、図2には、3層構造固定化SMP/Hep/bFGF-PPS 群および未処理群(bFGF-PPS)へのbFGF吸着量を、125ヨウ素標識したbFGFを用いて評価した結果を示した。SMP/Hep/bFGF-PPS 群では、処理直後で試験片1個あたり0.62 μgのbFGFが吸着したが、PBS浸漬により14日目でも0.35 μgのbFGFが安定的に保持された。一方bFGF-PPS 群では、処理直後の時点で2.85 μg/片と3層固定化群を上回る固定化量であったが、徐々に徐放される傾向で、14日後まで残存したbFGFは1.8 μgであった。

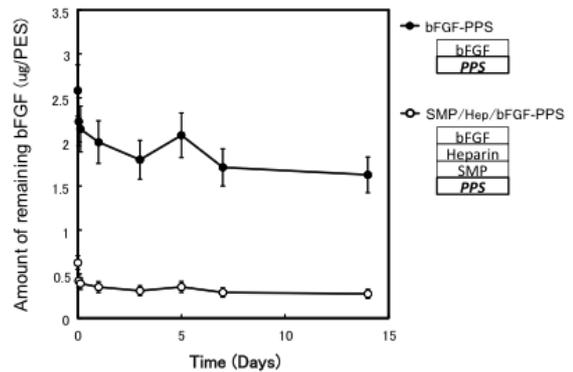


図2 多孔質体に直接固定化したbFGF量(●)、および、3層構造固定化法により固定化したbFGF量(o)。また、PBS中での放出挙動。

(3) ラット移植組織の骨再生能の評価

薬物徐放性担体利用の効果比較を目指して、移植後、ラットを屠殺し、X線学的、病理組織学的、分子生物学的に解析を行った。評価法の確立を行うのが27年度のマイルストーンであるの

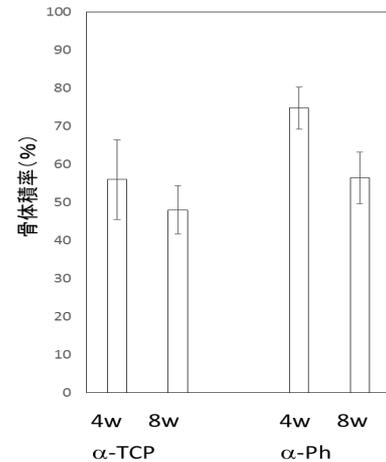


図3 . α-ph の埋植による骨体積率の変化

ですすでに達成している。X線学的評価については骨体積率と骨密度を求める評価法が有用であると明らかにし、-TCP、-TCP/ヘパリン複合体をラット頭蓋冠欠損モデルに移植したところ移植4週後で -TCP/ヘパリン複合体群(α-ph)でコントロール群である -TCP 群(-TCP)に比較して有意に高かった。しかし、8 週後では有意差は認められなかった(図3)。病理組織学的評価の結果からα-ph 群で、-TCP に比較して骨のリモデリングが進行し、新生骨が増加していることも明らかとなった。以上、FGF を使用しなくて

も骨再生能が上昇することを明らかとした。  
 (4) イヌ移植組織の骨再生能の評価  
 実験群には  $\alpha$ -TCP/ヘパリン/FGF-2 複合体、  
 対照群には  $\alpha$ -TCP、 $\alpha$ -TCP/ヘパリン複合体  
 を骨窩洞に填入し、安楽死後、骨窩洞をマイ  
 クロ CT で撮影し骨のパラメーター解析を行  
 った。その結果、骨密度は3群で優位差は認  
 められなかったが、骨体積率では埋入4週後  
 で、 $\alpha$ -TCP/ヘパリン/FGF-2 複合体が3群中  
 で最も高い値を示し(図4)、骨塩量では埋入  
 8週後で最も高い値を示した(図5)。すなわ  
 ち、 $\alpha$ -TCP/ヘパリン/FGF-2 複合体が骨再生  
 に有効であることを明らかにした。

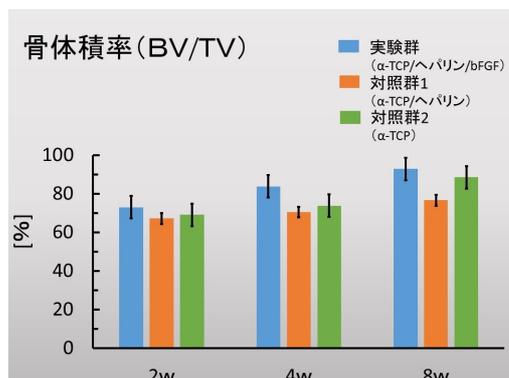


図4. 骨体積率の経時的変化

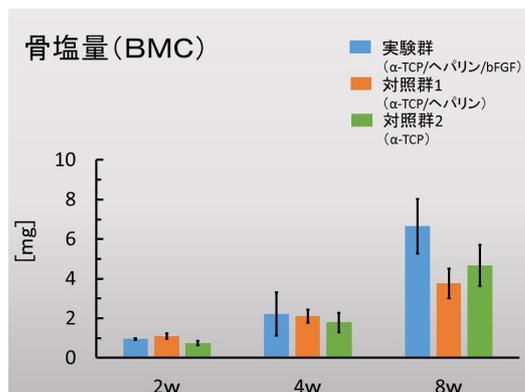


図5. 骨塩量の経時的変化

## 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4件)

Li P, Hashimoto Y, Honda Y, Nakayama Y, Kobayashi N, Hara E, Yasui K, Arima Y, Matsumoto N. Evaluation of Bone Regeneration by porous Alpha-Tricalcium Phosphate/Atelocollagen Sponge Composite in Critical-Sized Rat Calvarial Defects. Journal of Hard Tissue Biology 2016; 25: 35-40. 査読有り

Tokuda T, Honda Y, Hshimoto Y, Matumoto N. Comparison of the Bone Forming Ability of Different Sized-alpha Tricalcium Phosphate Granules using a Critical Size

Defect Model of the Mouse Calvaria. Nano Biomedicine 2015; 7: 63-71. 査読有り

Kakinoki S, Yamaoka T. Single-step immobilization of cell adhesive peptides on a variety of biomaterial substrates via tyrosine oxidation with copper catalyst and hydrogen peroxide. Bioconjugate Chemistry 2015; 26: 639-644. 査読有り

Kakinoki S, Sakai Y, Fujisato T, Yamaoka T. Accelerated tissue integration into porous materials by immobilizing basic fibroblast growth factor using a biologically safe three step reaction. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2015; 103: 3790-3797. 査読有り

[学会発表](計6件)

安田裕貴, 柿木佐知朗, 神戸裕介, 岩崎泰彦, 山岡哲二. 多孔質スキャホールドの表面化学的特性が組織浸潤に与える影響. 第15回 日本再生医療学会総会 2016年3月. 大阪国際会議場, 大阪市

徳田知子, 橋本典也, 大高晋之, 本田義知, 今井弘一, 馬場俊輔, 山岡哲二, 松本尚之. マウス頭蓋冠臨界骨欠損モデルを用いたヘパリン固定化  $\alpha$ -TCP 顆粒の骨形成能評価. バイオインテグレーション学会第6回学術大会. 2016年3月. 大阪歯科大学, 大阪市

徳田知子, 本田義知, 橋本典也, 松本尚之. マウス頭蓋冠臨界骨欠損モデルを用いた粒径の異なる型第三リン酸カルシウム顆粒の骨形成能の比較. 第549回 大阪歯科学会例会. 2015年12月. 大阪歯科大学, 枚方市

李 佩祺, 橋本典也, 本田義知, 有馬良幸, 松本尚之. リン酸三カルシウムコーゲンスポンジを用いた骨再生に対するインターフェロン とゾレンドロネートの効果. 第549回 大阪歯科学会例会. 2015年12月. 大阪歯科大学, 枚方市

山岡哲二, 坂井勇亮, 大高晋之, 本田義知, 橋本典也, 馬場俊輔, 藤里俊哉, 柿木佐知朗. 高分子多孔質マテリアル内部への in vivo 組織浸潤誘導のための bFGF 固定化法. 第37回 日本バイオマテリアル学会大会. 2015年11月, 京都テルサ, 京都市

山岡哲二, 坂井勇亮, 藤里俊哉, 柿木佐知朗. 増殖因子の高活性固定化法による多孔質スキャホールド露出/脱落の回避. 第64回 高分子討論会. 2015年9月. 東北大学, 仙台市

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 俊輔 (BABA, Shunsuke )

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 40275227

(2)研究分担者

橋本 典也 (HASHIMOTO, Yoshiya)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：20228430

山岡 哲二 (YAMAOKA, Tetsuji)

国立研究開発法人国立循環器病センター

ー・研究所・部長

研究者番号：50243126

本田 義知 (HONDA, Yoshitomo)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90547259