

令和元年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10846

研究課題名(和文) 薬剤担持ナノシートとMPCのナノ表面処理を応用した新規骨折治療法に関する基礎研究

研究課題名(英文) Basic research for the nanosheet to overcome serious clinical problems in the field of orthopedic surgery

研究代表者

田中 健之 (Tanaka, Takeyuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00583121

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)：本研究では、独自技術である「薬剤担持ナノシート」と「生体親和性ポリマーによるナノ表面処理」とを応用し、骨折に対する革新的な治療法を創出するための基礎検討を行った。具体的には、病変部への接着、強度、骨癒合部の形態変化など、骨折治療に適応するナノシートを創出し、表面にMPCポリマーを導入する技術を確立した。また、骨形成性の薬剤を担持させたナノシートを創出した。さらに、ナノシートによる治療効果を、骨欠損・骨折・手術部位感染の疾患モデルを用いて評価した。以上の研究成果は、MPC処理ナノシートの実用化を推進する確信を得るに十分な結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体親和性ポリマーとナノシートを組みあわせ、骨折治療の課題解決を目指した研究は国内外を通じて行われておらず、本研究はまさに独創的な医工連携研究といえる。本研究により、「ナノシートのナノラッピング効果と骨形成性薬剤・因子徐放による骨形成・骨癒合の促進」、「MPC処理による細菌付着・バイオフィルム形成抑制と組織癒着防止」を達成することができれば、革新的な骨折治療法となることは確実であり、個人にとってはADL・QOLのさらなる改善、社会にとっては関連する医療費の抑制というニーズを満たすことができる。また、整形外科以外の外科領域においても画期的な技術として使用されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：To overcome serious clinical problems, we have successfully developed a free-standing biodegradable polymer nanosheet using a simple fabrication process consisting of spin-coating and peeling techniques. In addition we have created a nanosheet with the surface layer including 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC). By using mouse model, we have successfully demonstrated that the nanosheet structure may potentially be applied as a potent prolonged sustained-release carrier of molecules or drugs such as recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). From the results of this study, we concluded that the nanosheet is a promising method to overcome serious clinical problems in the field of orthopedic surgery.

研究分野：医歯薬学

キーワード：医療・福祉 運動器

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国における医療の進歩と生活環境基盤の整備により長寿社会が達成されつつある一方で、運動器疾患は増加の一途をたどっている。中でも骨折は整形外科の日常診療において、最も遭遇する運動器疾患の一つである。骨折の治療は整復と固定が基本であるが、臨床エビデンスに基づいた治療指針の確立、手術方法、医療機器、リハビリテーションなどの進歩により、多くの症例で良好な臨床成績が得られるようになってきている。しかし、より早期の職場やスポーツ競技への復帰など、治療期間という点においては、必ずしも患者サイドの要望を満たせていないのが現状である。また、医療サイドからも、より早期にリハビリテーションを開始することができれば、筋力低下や関節拘縮を最小限にすることができ、特に高齢者においては寝たきりを防止できる。したがって、骨折の治療成績を向上させることにより、患者の日常生活動作 (activities of daily living: ADL)・生活の質 (quality of life: QOL) の改善はもちろん、超高齢社会における労働力の確保や医療費の削減も期待できることから、社会的に重要な課題といえることができる。申請者らは、この課題の解決のためには骨形成・骨癒合を促進すること、癒合不全(遷延治癒・偽関節)・感染・癒着という合併症を阻止することが重要と考え、2つの独自技術、「薬剤担持ナノシート」と「2-メタクリルロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーによるナノ表面処理」を応用することを着想した。

近年のナノテクノロジー分野において、サイズアスペクト(膜厚-サイズ)比が106を超えるナノシートが注目されている。その作製法として、紫外線重合法、Langmuir-Blodgett法、交互積層法が提案されており、高性能ナノセンサーやナノ分離膜に応用されているが、モノマー構造自体が複雑で、作製法も煩雑(ナノシート1枚を得るのに数十回以上の積層や重合過程を要する)なため、その応用は限定されていた。特に生体系にナノシートを展開するには、独創的な発想と作製法の簡便さが必須である。そのような背景の下、申請者は、ナノシートを簡便(スピンコート2回のみ)に構築する手法を確立した。ナノシートはナノ厚特有の柔軟な構造と平滑面をもつため、貼りたい目的界面の凹凸に追従しながら面接触吸着し高接着性が発現する。このため、接着剤を使用せず物理吸着のみで濡れた皮膚や臓器に貼付でき、例えば胃切開部位に貼るだけで縫合術の代替となる高いポテンシャルを実証している(Okamura Y et al.: Adv Mater, 2009)。本研究では、ナノシートを骨折固定材料・機器と併用し、その高接着性を利用して骨折部周囲に貼付した。さらに、ナノシートの内側面(骨折部接触面)に骨形成を誘導する薬剤徐放機能を持たせ Drug Delivery System(DDS)としての効果を担持させた。また、ナノシートのラッピング効果により血腫、骨髄、骨膜からの液性因子や間葉系細胞など、さらに、後述する骨形成性の薬剤を封じ込め、骨形成・骨癒合の促進を図った。

MPCポリマーは申請者らが平成9年度基盤研究Bを通じて創出した合成リン脂質であり、生体細胞膜類似構造を有する。これまでに1)生体親和性に優れ異物反応を惹起しないこと、2)細胞接着と活性化・タンパク質吸着を抑制すること、3)表面に水和潤滑ゲル層を形成し潤滑特性に優れることを明らかにしている(Moro T et al.: Nature Mater, 2004)。これらの特質をいかして様々な先端医療デバイスへの応用研究を行っているが、本研究と関連しては、1)ポリエチレン表面へのMPC処理により細菌付着が抑制されること(Kyomoto M et al.: Acta Biomaterialia, in press)、2)ナノポア構造を有するMPC添加ハイドロゲルで屈筋腱縫合部を覆うと屈筋腱の治療を妨げることなく癒着を阻止すること(Ishiyama N et al.: J Bone Joint Surg Am, 2011)、3)MPC層は薬剤徐放能を有することを実証している。抗感染性については、申請者らが実用化したMPC処理関節面を有する人工股関節において治験症例は手術後10~12年を経過しているが、1例も感染を生じていない(Takatori Y et al.: Mod Rheumatol, 2015)。薬剤徐放能については、抗炎症剤を徐放する血管ステントを既に実用化している。本研究では、ナノシートの外側面(骨折部と反対の面)の表面に抗生剤徐放能を付与したMPC処理を施し、細菌付着抑制による感染の制御と組織癒着抑制を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、独自技術である「薬剤担持ナノシート」と「生体親和性ポリマーによるナノ表面処理」とを応用し、骨折に対する革新的な治療法を創出するための基礎検討を完成させることである。骨癒合の促進に加え、癒合不全(遷延治癒・偽関節)・感染・癒着という合併症を阻止することで、日常生活動作(ADL)・生活の質(QOL)の改善および健康寿命の延伸を目指す。

本研究の基盤技術であるMPCポリマーは研究分担者の石原らが開発した日本発のオリジナルな高分子材料である。また、スピンコート2回のみという簡便な方法でナノシートを作製する手法も、研究分担者の岡村らが開発した独自技術である。従来の研究は、骨折の治療成績の向上のため、骨形成・骨癒合の促進、癒合不全(遷延治癒・偽関節)・感染・癒着という合併症の阻止という課題の解決を各々に目指すものであった。学術的には、生体親和性ポリマーとナノシートを組み合わせ、これらの課題を同時に解決することを目指した研究は国内外を通じて行われておらず、本研究はまさに独創的な医工連携研究といえる。本研究により、1)ナノシート

のナノラッピング効果と骨形成性薬剤・因子徐放による骨形成・骨癒合の促進、2)MPC 処理による細菌付着・バイオフィーム形成抑制と組織癒着防止、3)MPC 層からの抗生剤徐放による感染制御を達成することができれば、革新的な骨折治療法となることは確実であり、個人にとっては ADL・QOL のさらなる改善、社会にとっては関連する医療費の抑制というニーズを満たすことができる。また、本研究で解決を目指す、損傷組織の保護、感染・組織の防止は整形外科のみならず外科治療における共通の課題である。癒着防止効果を例にとると、脊椎や屈筋腱損傷部の癒着防止に加え、これまで有効な癒着防止材が実用化されなかった、耳鼻科・眼科・形成外科・口腔外科などの領域でも画期的な技術として使用されることが期待できる。

本研究により「薬剤担持ナノシートと MPC のナノ表面処理を組み合わせた革新的な骨折治療法」が創出できた場合、次の目的は実用化ということになる。本研究のナノシートの候補材料は既に医療材料として長年使用実績がある高分子材料であり、生体内の安全性は確立されている。また、申請者らはこれまでの MPC を応用した医療機器の実用化を通し、生体内安全性試験の検討を終えている。これらの医療機器が実用から 15 年以上経過後も MPC に起因した合併症を生じていないことと考え合わせると、速やかな実用化が期待できる。

3. 研究の方法

基盤技術「薬剤担持ナノシート」と「生体親和性ポリマーによるナノ表面処理」を応用した新規骨折治療法に関する基礎研究のため、医療材料に汎用されている各種高分子材料を用いたナノシートを創出する。シート内側面(骨折部接触面)に骨形成を誘導する薬剤徐放機能を、外側面には MPC 処理による細菌付着・組織癒着防止効果を担持させる。ナノシートによる治療効果は、骨欠損・骨折・手術部位感染の疾患モデルを用いて評価する。

ナノシートの創出と物性の評価

助成期間後の実用化を速やかに行うため、既に医療材料として使用実績があり、安全性が確認されている高分子を候補材料としてナノシートを作製し、物性評価から材料の絞り込みを行った。これらのナノシートについて、内側面(骨折部接触面)に骨形成を誘導する薬剤徐放機能を担持させ、その評価を行った。外側面(骨折部と反対の面)には MPC 処理を施し細菌付着・バイオフィーム形成の抑制効果を担持させ、その評価を行った。チタン合金製のディスクにナノシート(MPC 処理有/無)を作製した。24 穴プレート中に試験片を配置し、細菌を播種した。37℃にて静置環境下/流動環境下で培養後試験片を回収し、細菌付着・バイオフィーム形成抑制効果を評価した。さらに、下記 の動物実験の結果をフィードバックし、より効果的に効果を発現するようにナノシートの調整を行った。

in vivo 動物モデルを用いた治療効果の評価

で創出した MPC 処理薬剤担持ナノシートの骨形成・骨癒合促進効果について、マウス頭頂骨臨界骨欠損モデル、マウス大腿骨難治性骨折モデルを用いて評価した。

4. 研究成果

ナノシートの創出と物性の評価

1) ナノシートの調製と物性評価：

シリコン基板上にポリビニルアルコール(PVA)を塗布し犠牲膜とし、この上に医療材料に汎用されている各種高分子(ポリ乳酸(PLLA)、ポリアミド等)をスピンコートする。純水中で PVA 層を溶解させ、ナノシートを基板から剥離した。この時、ナノシートの膜厚はスピンコートする際の溶液濃度で制御できることを確認し、ナノシートにならない高分子組成・分子量を除外した。各組成に対して膜厚(100 nm 以下)の異なる一連のナノシートを調製し、薄膜機械強度測定(弾性率・伸び率を測定)、並びに接着強度試験(スクラッチ試験)を実施して物性表をまとめた。この表を基に、a)適切な接着力を有するナノシートの膜厚を決定し、b)骨癒合部の形態変化を想定した伸縮に耐え得るナノシートの組成(伸び率 100%以上)に絞り込んだ。

2) 骨形成性薬剤担持ナノシートの調製および徐放試験：

ナノシートをテフロンメッシュ上に転写・乾燥させた。その中央に骨形成を誘導する薬剤・因子である Bone Morphogenetic Protein-2 (骨形成タンパク質-2: BMP-2)、Fibroblast Growth Factor-2 (繊維芽細胞成長因子-2: FGF-2) を滴下・乾燥させ、小径ナノシートでラッピングすることで薬剤担持ナノシートを作製する手法を確立した。次に、ナノシートを 37℃ に保った細胞培養液 (Dulbecco's modified Eagle medium: DMEM) に浸漬し、3 日毎に溶液を回収・交換しながら、回収した溶液中の薬剤濃度を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で計測した。最適な徐放速度に制御できるナノシートの膜厚、組成を確立するとともに、薬剤の徐放を計測し、少なくとも 8 週間にわたり、有効濃度の薬剤を徐放する

ことを確認した。

3) ナノシート表面の細菌付着・バイオフィーム形成抑制効果の検討：

a) 細菌付着抑制効果：

病変部・手術部位感染の病原菌である、バイオフィーム形成黄色ブドウ球菌、バイオフィーム形成メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、表在ブドウ球菌、緑膿菌を *in vitro* 感染症も出るに用いて評価した。付着生菌数測定、蛍光顕微鏡観察、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察を行い、MPC 処理によって細菌の付着が 90%以上抑制されることを明らかにした。

b) バイオフィーム形成抑制効果：

病変部・手術部位感染の主要起因菌である、バイオフィーム形成黄色ブドウ球菌を、流動環境下における *in vitro* 感染モデルに用いて、ナノシートの表面に予めバイオフィームを形成させた後、抗菌薬 (バンコマイシン) を作用させ、バイオフィーム形成抑制効果とこれに伴う抗生剤の抗菌作用を付着・浮遊生菌数測定、蛍光顕微鏡観察、走査型電子顕微鏡観察などにより評価した。未処理群ではバイオフィームが形成されるため抗菌薬が効果を発現しないのに対し、MPC 処理群ではバイオフィーム形成が抑制されるため、抗菌薬の効果が発現することを確認した。

in vivo 動物モデルを用いた治療効果の評価

1) マウス頭頂骨臨界骨欠損モデルを用いた骨再生誘導の評価：

8 週齢オスの C57BL/6J マウスの頭蓋骨に、下層の硬膜を損傷しないように十分に注意をしながら生検用パンチで直径 3.5 mm の全層性の骨欠損を作成し、9 x 9 mm 大に切ったシートを貼付した。BMP-2 (50 μ g) 担持ナノシートを貼付した群 (BMP-2 群)、BMP-2 の溶媒である PBS のみを担持したナノシートを貼付した群 (PBS 群)、何も移貼付しなかった群 (コントロール群) の 3 群に分け、2、4、8 週で画像所見 (肉眼所見、X 線像、マイクロ CT 像)、組織学的所見 (Hematoxylin-eosin (HE) 染色、Masson's trichrome 染色) から骨形成能を経時的に評価した。この結果、コントロール群、PBS 群では骨形成がみられなかったが、BMP-2 群では旺盛な骨形成がみられた。

2) マウス大腿骨骨欠損モデルを用いた骨再生誘導の評価：

8 週齢オスの C57BL/6J マウスの大腿骨骨幹部に 3mm 長の骨欠損を作製後、髄内釘固定を施した大腿骨骨欠損モデルを作製した。骨欠損部に何も処理を施さなかった群 (コントロール群)、FGF-2 (1.5 μ g) を、bolus injection した群 (Inj 群)、1 重のナノシートで担持移植した群 (N 群)、3 重のナノシートで担持移植した群 (3N 群) における骨形成能を評価した。マイクロ CT による評価では、骨癒合率は 3N 群>N 群の順に高かった。骨欠損部における bone volume を計測したところ、移植後 4 週では有意な差は認めなかったものの、8 週では 3N 群>N 群>Inj 群の順に新生骨が形成されていた。Safranin O 選手区について評価したところ、3N 群において軟骨内骨化を多く認めた。免疫組織学的評価では Runx2、Osterix、p-Fgfr1 の陽性率が 3N 群では有意に高値であった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- 1) Murahashi Y, Yano F, Nakamoto H, Maenohara Y, Iba K, Yamashita T, Tanaka S, Ishihara K, Okamura Y, Moro T, Saito T: Multi-layered PLLA-nanosheets loaded with FGF-2 induce robust bone regeneration with controlled release in critical-sized mouse femoral defects. *Acta Biomater* 85: 172-179, 2019.
- 2) 茂呂徹, 岡村陽介, 齋藤琢, 矢野文子, 石原一彦: ロコモティブシンドロームのためのバイオマテリアル 多層構造を有する rhBMP-2 担持 PLLA ナノシートの骨形成促進効果. *バイオマテリアル* 36(1): 58-61, 2018.
- 3) 茂呂徹, 石原一彦, 高取吉雄: MPC ポリマーと運動器疾患に対する応用. *日本整形外科学会誌* 92(10): 765-776, 2018.
- 4) Huang KC, Yano F, Murahashi Y, Takano S, Kitaura Y, Chang SH, Soma K, Ueng SWN, Tanaka S, Ishihara K, Okamura Y, Moro T, Saito T: Sandwich-type PLLA-nanosheets loaded with BMP-2 induce bone regeneration in critical-sized mouse calvarial defects. *Acta Biomaterialia* 59: 12-19, 2017.

[学会発表] (計 8 件)

1. 村橋靖崇, 矢野文子, Kuo-Chin Huang, 石原一彦, 岡村陽介, 山下敏彦, 田中栄, 茂呂徹, 齋藤琢: 骨形成促進剤を担持した PLLA ナノシートによる長管骨骨欠損治療の検討. 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会. 奈良, 10.11, 2018.
2. 村橋靖崇, 矢野文子, Kuo-Chin Huang, 石原一彦, 岡村陽介, 山下敏彦, 田中栄, 茂呂徹,

- 齋藤琢：骨形成促進剤を担持した PLLA ナノシートによる長管骨骨欠損治療の検討．第 36 回日本骨代謝学会学術集会．長崎，7.26，2018．
3. 村橋靖崇，矢野文子，Kuo-Chin Huang，石原一彦，岡村陽介，山下敏彦，田中栄，茂呂徹，齋藤琢：骨形成促進剤を担持した PLLA ナノシートによる広範囲骨欠損治療の検討．第 91 回日本整形外科学会学術総会．神戸，5.27，2018．
 4. 村橋靖崇，Kuo-Chin Huang，矢野文子，北浦義昭，張成虎，田中栄，石原一彦，岡村陽介，茂呂徹，齋藤 琢：頭蓋冠臨界欠損モデルにおける rhBMP-2 担持ナノシートの骨形成促進効果．先端医療シーズ開発フォーラム 2018．東京．2.1,2018．
 5. 村橋靖崇，石原一彦，Kuo-Chin Huang，矢野文子，北浦義昭，張成虎，田中栄，岡村陽介，齋藤琢，茂呂徹：頭蓋冠臨界欠損モデルにおける rhBMP-2 担持ナノシートの骨形成促進効果．第 39 回日本バイオマテリアル学会大会．東京，11.20，2017．
 6. 村橋靖崇，Kuo-Chin Huang，矢野文子，北浦義昭，張成虎，田中栄，石原一彦，岡村陽介，茂呂徹，齋藤琢：頭蓋骨臨界骨欠損モデルにおける rhBMP-2 担持ナノシートの骨形成促進効果．第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会．沖縄，10.26，2017．
 7. 茂呂徹，石原一彦，岡村陽介，宮本比呂志，菖蒲池健夫，村橋靖崇，矢野文子，齋藤琢，田中栄：パネルディスカッション 2 「整形外科バイオマテリアル」MPC 処理ナノシートの細菌付着抑制効果．第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会．沖縄，10.26，2017．
 8. 村橋靖崇，Kuo-Chin Huang，矢野文子，北浦義昭，張成虎，田中栄，石原一彦，岡村陽介，茂呂徹，齋藤琢：頭蓋骨臨界骨欠損モデルにおける rhBMP-2 担持ナノシートの骨形成促進効果．第 35 回日本骨代謝学会学術集会．福岡，7.28，2017．

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：薬剤担持薄膜

発明者：茂呂徹、岡村陽介、石原一彦、齋藤琢、矢野文子、田中栄、高野秀太

権利者：東京大学、東海大学

種類：特許

番号：特願 2017-165297

出願年：2017

国内外の別：国内

名称：薬剤担持薄膜

発明者：茂呂徹、岡村陽介、石原一彦、齋藤琢、矢野文子、田中栄、高野秀太

権利者：東京大学、東海大学

種類：特許

番号：PCT/JP2018/31990

出願年：2018

国内外の別：国外

取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 石原 一彦

ローマ字氏名： ISHIHARA Kazuhiko

所属研究機関名： 東京大学

部局名： 大学院工学系研究科

職名： 教授

研究者番号 (8 桁)： 90193341

研究分担者氏名： 岡村 陽介
ローマ字氏名： OKAMURA Yosuke
所属研究機関名： 東海大学
部局名： 工学部
職名： 准教授
研究者番号(8桁)： 40365408

研究分担者氏名： 高取 吉雄
ローマ字氏名： TAKATORI Yoshio
所属研究機関名： 東京大学
部局名： 医学部附属病院
職名： 客員研究員
研究者番号(8桁)： 40179461

研究分担者氏名： 金野 智浩
ローマ字氏名： KONNO Tomohiro
所属研究機関名： 東北大学
部局名： 薬学研究科
職名： 教授
研究者番号(8桁)： 80371706

研究分担者氏名： 矢野 文子
ローマ字氏名： YANO Fumiko
所属研究機関名： 東京大学
部局名： 医学部附属病院
職名： 特任講師
研究者番号(8桁)： 80529040

(2)研究協力者
該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。