

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：32660

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23611

研究課題名（和文）新規構造と機能を持つ有機無機複合粒子を用いた骨粗鬆症治療の実現

研究課題名（英文）Realization of osteoporosis treatment using organic-inorganic composite particles with new structure and function

研究代表者

小松 周平（Komatsu, Syuuhei）

東京理科大学・基礎工学部 材料工学科・助教

研究者番号：60843844

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では「薬物内包可能な骨誘導能を持つ新規炭酸アパタイト粒子を用いた骨粗鬆症の治療」を目的とし、実験を行った。作製した粒子はコアシェル構造をとっており、シェルは溶解し骨に変わるCO3Ap、コアは生分解性高分子から構成されている。シェルには骨形成タンパク質を、コアには疎水性低分子薬物をそれぞれ担持させることができた。さらに、骨芽細胞を粒子存在下で培養すると、骨細胞の分化マーカーであるオステオカルシンの発現量が増加し、石灰化結節が確認できた。以上より、作製した粒子は骨粗鬆症の治療への応用に期待ができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症は罹患すると、寝たきりになり、認知症発症の悪循環に陥り、患者のQOLを著しく低下させる重篤な疾患である。骨粗鬆症の治療材料には、薬物内包が可能、新生骨の形成を誘導できる能力、低侵襲性などの特徴を持つものが望ましい。本研究では、骨粗鬆症の治療のための薬物内包可能な骨誘導能を持つ新規炭酸アパタイト粒子を作製した。作製した粒子は、骨へのインジェクトが可能で大きさが適切であり、粒子の内部と表面にそれぞれ薬物を担持することが可能であった。さらに骨芽細胞を骨細胞へと分化誘導できたことから、骨粗鬆症を治療できる材料として期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted an experiment for the purpose of "treatment of osteoporosis using novel carbonate apatite particles with a drug-encapsulating bone-inducing ability". The produced particles have a core-shell structure, the shell is composed of CO3Ap that dissolves and turns into bone, and the core is composed of biodegradable polymer. The shell could load a bone morphogenetic protein and the core load a hydrophobic low molecule drug. Furthermore, when osteoblasts were cultured in the presence of the prepared particles, the expression level of osteocalcin, which is a differentiation marker for bone cells, increased, and calcified nodules were confirmed. From the above, the produced particles can be expected to be applied to the treatment of osteoporosis.

研究分野：バイオマテリアル工学

キーワード：骨再生 骨粗鬆症治療 有機無機ハイブリッド材料

1. 研究開始当初の背景

社会問題である骨粗鬆症などの骨疾患は生活の質を著しく低下させる。現在の治療は、人工骨埋没のため侵襲的治療であり持続的な薬物放出が困難である。そこで、インジェクション可能かつ薬物内包・徐放可能な骨再生材料が望まれる。本研究では、薬物内包可能なコアセルベート液滴をコアに、シェルに無機質層を有する有機-無機ハイブリッド粒子に着目した。

2. 研究の目的

本研究では、社会的問題である骨粗鬆症の解決できる革新的な「薬物内包可能な骨誘導能を持つ炭酸アパタイト粒子を用いた骨粗鬆症治療」を目的とする。

3. 研究の方法

この材料を骨粗鬆症治療へ使用するために、本研究では以下の点の実験を行った。

- ① 表面リン酸化による粒子表面 CO_3Ap 化が CaCO_3 粒子に与える影響 (XRD、SEM などを用いて評価)
- ② 内部に骨誘導できる薬物の内包能解析 (薬物の担持量などを蛍光分光光度計などで評価)
- ③ pH 変化に伴う内包薬物の放出試験 (pH 変化、時間依存的な内包薬物の放出量を測定)
- ④ 骨芽細胞 (MC3T3-E1) を用いて、 CO_3Ap 粒子の骨誘導能評価 (オステオカルシン発現量の測定による骨誘導測定)

4. 研究成果

初めに既報¹⁾通りに、 CaCO_3 粒子の作製を行うため、生分解性温度応答性高分子を合成した。この高分子はある温度で凝集し、コアセルベート液滴を形成する。このコアセルベート液滴を CaCO_3 存在下で攪拌し、ピッカリングエマルジョンを作製した。しかし、作製したピッカリングエマルジョンは高分子が温度応答挙動を示している状態でのみ存在するため、温度が低下すると崩壊してしまう。そこで、付着している CaCO_3 の結晶成長を行い、 CaCO_3 粒子を作製した。この CaCO_3 粒子をベースとして以下の実験を行った。

作製した CaCO_3 粒子を 0.5 mol/L Na_2HPO_4 水溶液 10 mL に所定時間浸漬させ、リン酸化を行い、 CO_3Ap 粒子を作製した。リン酸化を行う前は、滑らかなカルサイトの表面であるが (Fig. 1a)、リン酸化後において、アパタイト由来の針状結晶に覆われた表面であることが分かった (Fig. 1b)。さらに XRD 回折より、リン酸化後にはベースとなっている CaCO_3 由来の回折、 CO_3Ap 由来の特徴的な (211), (112) 面の回折が確認できた。さらにリン酸化 8 日間において、6 日間リン酸化した粒子より CO_3Ap 由来のピーク強度が増加していることが分かり、リン酸化時間の制御により、表面の CO_3Ap の量をコントロールすることができた。以上の結果より、リン酸化により表面に CO_3Ap を有する粒子が作製できた。

次に作製した CO_3Ap 粒子への薬物の内包・担持の評価を行った。本実験では、低分子薬物のモデルとしてローダミン B、薬物モデルタンパク質として FITC-BSA を用いている。ローダミン B と FITC-BSA 混合 PBS 中で、 CO_3Ap 粒子への薬物内包実験を行った結果、Fig. 2 のような結果が得られた。Fig. 2a より、薬物内包での CO_3Ap 粒子への影響はないことが分かった。Fig. 2b より、ローダミン B 由来の赤色蛍光が粒子全体に存在していることから、疎水性低分子薬物は CO_3Ap シェルを通過し、内部のコアセルベート液滴相に内包されていることが分かる。また Fig. 2c より、FITC-BSA 由来の緑色蛍光は粒子内部には存在せず、表面に付着していることが分かる。FITC-BSA の等電点は 4.7-4.8 と骨誘導タンパク質の BMP-2 と近い値を持ち、 CO_3Ap 粒子の shell 表面は Ca

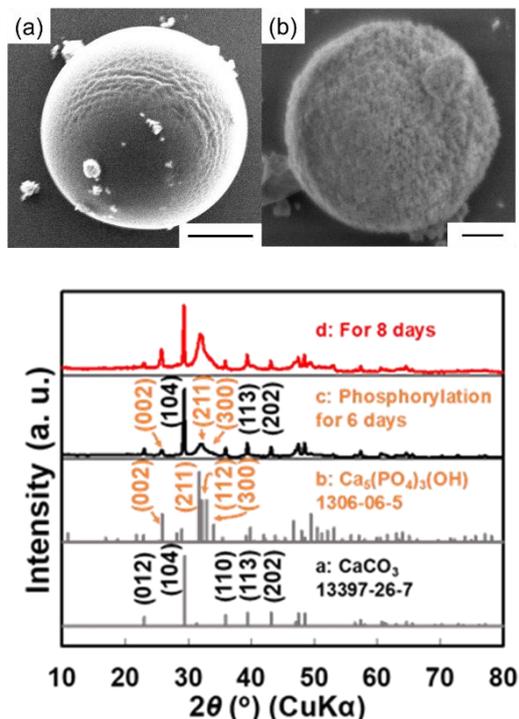


Fig.1 Characterization of CO_3Ap particle. (a) SEM image of CaCO_3 particle before phosphorylation. (b) SEM image of CO_3Ap particle. (c) XRD spectra of CO_3Ap particle phosphorylated for 6 and 8 days.

の存在によりカチオンサイトがあると考えられるため、静電相互作用によって FITC-BSA は吸着したと考えられる。すなわち、低分子薬物は通過できる微細孔がシェルには存在し、高分子薬物はシェル表面に付着することが分かった。さらに Fig. 2d のマージ像より、複数の薬物を同時に担持できることが分かった。以上から、内部の高分子相によりローダミンBを内包し、shell に FITC-BSA を担持した複数のモデル薬物担持可能な CO₃Ap 粒子を調製することに成功した。

ある程度の低分子のみを通過させる孔の存在は、非常に重要な物性と考えており、これは内部の高分子も通過しないことを示している。蛍光ラベル化ポリマーにより粒子を作製し、低温で静置したところ、内部の蛍光が失われることはなかった。さらに、溶媒を PBS からジオキサンに変更し、低温で静置しても内部の蛍光に変化はなかった。すなわち、溶媒を変更しても内部の高分子は漏出せずに粒子内部に存在することが明らかになった。そこで、PBS に溶解しない薬物の内包を試みた。薬物は、骨粗鬆症の治療薬の一つである β -エストラジオール、溶媒に 1,4-ジオキサンを用いて行った。PBS 下では薬物は難溶性であり粒子への内包効率は 40%程度であったが、1,4-ジオキサン下での内包効率は 83 %となった。すなわち、溶媒依存がなく様々な薬物の内包が可能であることが示された。

次に、骨形成タンパク質の BMP-2 を用いてシェルへの付着試験を行った。その結果を Table 1 に示す。付着効率は 90%以上と高く、さらに既存の材料と比較しても担持率が高いことが示された。これは、従来の骨再生材料よりも CO₃Ap 粒子は球状であることから比表面積が比較的大きいと考えられる。以上のことから、複数のモデル薬物及び、複数の骨欠損治療薬物担持可能な CO₃Ap 粒子を調製することに成功した。

次に粒子内部の薬物放出試験を行った。骨吸収時と同様の pH 4.5 の酸性環境下における rhodamine B の放出挙動評価を行った。rhodamine B を内包した CO₃Ap 粒子を 37 °C の 0.15 mol/L 酢酸緩衝溶液 (pH 4.5) に浸漬させ、放出試験を行った。その結果 0 min. 以内に約 10%まで急激に放出し、その後の放出率は緩やかに 30 %付近まで増加していた。初期の 10 min. は CO₃Ap 粒子や粒子表面に付着していた rhodamine B が拡散し、急激な増加傾向になったと考えられる。その後はコアセルベート液滴部の生分解性温度応答性高分子の加水分解やシェルの溶解が徐々に起こるため、緩やかな放出になったと考えられる。したがって、破骨細胞が分泌する酸性環境下 (pH 4.5) で内部の薬物を徐放可能であることがいえる。

次に、骨芽細胞の MC3T3-E1 を作製した CO₃Ap 粒子存在下で 14 日間培養した。培養した細胞のアリザリンレッド S 染色 (無機質染色) を行い、骨形成評価を行った (Fig. 3)。コントロールと BMP-2 のみを加えた MC3T3-E1 については石灰化染色を観察することができなかった。一方で、CO₃Ap 粒子と BMP-2 担持 CO₃Ap 粒子において赤く染色されていることが観察された。赤く染色されている部分は、MC3T3-E1 に転化した CO₃Ap 粒子も含まれているが、CO₃Ap 粒子と BMP-2 担持 CO₃Ap 粒子を比較すると、BMP-2 担持 CO₃Ap 粒子のほうが多く染色されていることがわかった。そこで、14 日目の CO₃Ap 粒子と BMP-2 担持 CO₃Ap 粒子それぞれを添加した MC3T3-E1 を蛍光顕微鏡で観察し、その結果を Fig. 4 に示した。Fig. 4 より、黒矢印は添加した CO₃Ap、黄矢印は石灰化した骨結節であると考えられるが、CO₃Ap 粒子を添加した方よりも、BMP-2 担持 CO₃Ap 粒子を添

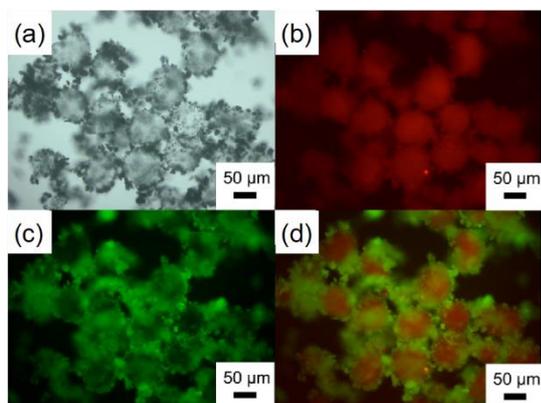


Fig.2 Drug load for CO₃Ap particle. (a) Micrograph of phosphorylated CaCO₃ capsules. (b), (c) Fluorescent micrograph image of CO₃Ap capsules loaded with rhodamine B (red fluorescence) and FITC-BSA (green fluorescence). (d) Merged image of (b) and (c).

Table 1 Adsorption content of BMP-2 on CO₃Ap capsules surfaces at 37 ° C for 3 days.

Feed amount of BMP-2 [µg]	Adsorption efficiency [%]	Adsorption content [µg/g-capsules]
0.10	88.8±1.8	17.1±0.8
0.20	96.1±0.3	38.4±0.1
0.40	95.5±1.8	76.4±0.1

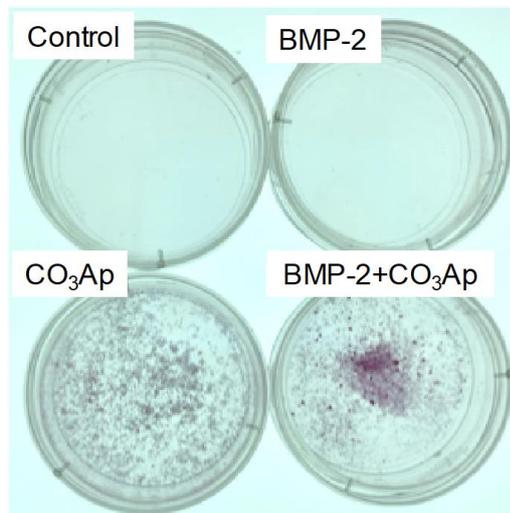


Fig. 3 Calcified nodule staining of MC3T3-E1 on the 14th day.

加した方に骨結節が多く存在していることが観察できた。このことから、BMP-2 担持 CO₃Ap 粒子の添加によって、より多くの骨結節を形成したため、CO₃Ap 粒子と BMP-2 担持 CO₃Ap 粒子で比較すると、BMP-2 担持 CO₃Ap 粒子の方が多く染色された。これは、BMP-2 担持 CO₃Ap 粒子は BMP-2 と無機質の供給によって骨形成を促進し、骨結節の沈着を増大し、骨形成を促進したと考えられる。BMP-2 による骨誘導能と CO₃Ap 粒子からの骨成分の供給によって骨形成分化が BMP-2 のみを加えた MC3T3-E1 よりも促進され、MC3T3-E1 が骨芽細胞を通過し、骨芽細胞後期から骨細胞の間まで分化したためであると考えた。

骨結節が確認できたため、骨細胞へと分化していることが予想できる。そこで、骨形成分化後期に発現する骨形成マーカーの一つであるオステオカルシンの発現量の測定を行った。その結果を Fig. 5 に示す。Fig. 5 より、オステオカルシンの発現量を評価した結果、コントロールと比較して BMP-2、CO₃Ap 粒子、BMP-2 担持 CO₃Ap 粒子を添加した 3 つにおいて高い発現量であることがわかった。BMP-2 においては、骨形成分化の促進により発現量が高くなったと考えられる。CO₃Ap 粒子と BMP-2 担持 CO₃Ap 粒子については、細胞が無機成分を認識したことにより、骨形成分化が促されたため、骨芽細胞が成熟し、オステオカルシンの発現量が高まったと考えた。以上の石灰化染色、オステオカルシン発現の結果から、BMP-2 担持 CO₃Ap 粒子は骨形成分化を促進可能であることがわかった。これは、BMP-2 による骨誘導能と CO₃Ap 粒子からの骨成分の供給によって骨形成分化が生じ、骨芽細胞後期から骨細胞の間まで分化したためであると考えられる。

以上の結果より、作製したカプセルは複数の薬物を内包することができ、さらに骨誘導能を示すことが分かった。さらに骨芽細胞を成熟させ、骨細胞まで分化できる特徴を有していた。そのため、骨粗鬆症の治療と骨再生を行うことができる材料として期待できるものであった。

参考文献

- 1) S. Komatsu, Y. Ikedo, T. Asoh, R. Ishihara, A. Kikuchi, *Langmuir*, 34, 3981-3986.

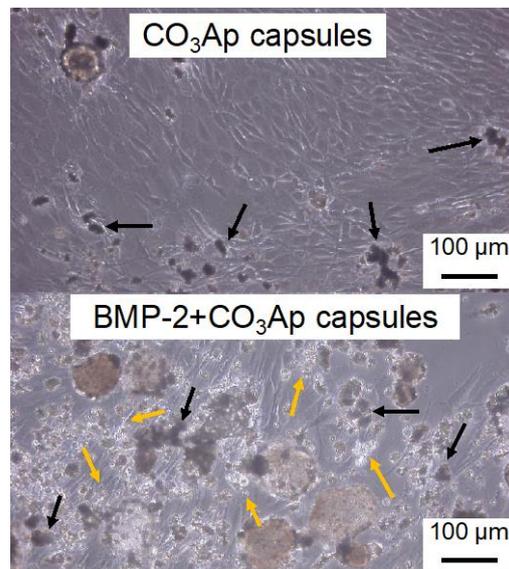


Fig. 4 Calcified nodule staining of MC3T3-E1 on the 14th day. Black arrow: feed CO₃Ap, yellow arrow: calcified nodule.

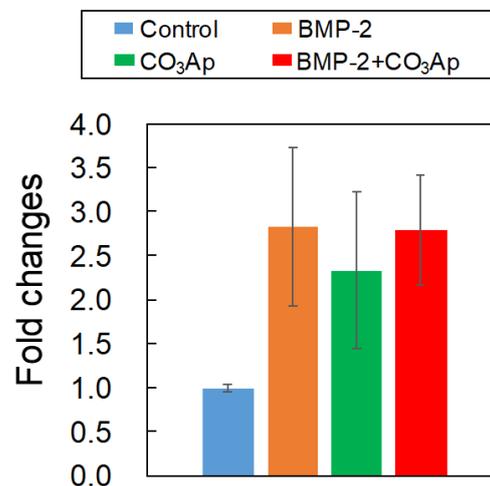


Fig. 5 Positive expression ratios of OCN.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 小松周平、菊池明彦	4. 巻 -
2. 論文標題 薬物担持可能な骨再生・治療材料の設計	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Society of Inorganic materials Japan	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小松周平、安部秀平、菊池明彦	4. 巻 35
2. 論文標題 骨欠損再生のための足場材料の展開	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO clinica	6. 最初と最後の頁 54, 58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 小松周平
2. 発表標題 MDOを用いた分解性材料
3. 学会等名 2020東海シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Syuuhei Komatsu, Shuhei Abe, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi
2. 発表標題 Organic-inorganic Hybrid Drug loadable Carbonate Apatite Capsules for Bone Tissue Engineering
3. 学会等名 11th World Biomaterial Congress（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部 秀平, 中村 和沙, 小松 周平, 麻生 隆彬, 菊池 明彦
2. 発表標題 生分解性高分子ベースとしたコアセルベート液滴から成る複数薬物担持可能なコアシェル型CO3Apカプセルの調製
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuhei Abe, Kazusa Nakamura, Syuuhei Komatsu, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi
2. 発表標題 Preparation of dual-drugs loadable carbonate apatite capsules based on degradable polymer rich-phase
3. 学会等名 3rd G'L'owing Polymer Symposium in KANTO (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部秀平、小松周平、麻生隆彬、菊池明彦
2. 発表標題 分解性高分子濃厚層をコアとするCO3Apカプセルの調製及び複数薬物担持能の評価
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部秀平 小松周平 麻生隆彬 菊池明彦
2. 発表標題 骨欠損治療のための薬物内包可能な炭酸アパタイトカプセルの調製
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小松周平、安部秀平、麻生隆彬、菊池明彦
2. 発表標題 骨再生を目指した有機 無機ハイブリッドカプセル
3. 学会等名 第9回 JACI/GSCシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部 秀平, 小松 周平, 麻生 隆彬, 菊池 明彦
2. 発表標題 複数の骨誘導薬物を担持可能な炭酸アパタイトカプセルの調製
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部秀平、小松周平、麻生隆彬、菊池明彦
2. 発表標題 複数の骨誘導薬物を担持可能な炭酸アパタイトカプセルの調製
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuheii Abe, Syuuhei Komatsu, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi
2. 発表標題 Preparation of drug loadable carbonated apatite capsules surrounded on biodegradable coacervate droplets for treatment of osteoporosis
3. 学会等名 2nd GLowing Polymer Symposium in KANTO, 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Syuuhei Komatsu, Shuhei Abe, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi
2. 発表標題 Drug loading carbonate apatite capsule based on biodegradable coacervate droplets for bone tissue engineering
3. 学会等名 29th Annual Meeting of MRS-Japan 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安部秀平、小松周平、麻生隆彬、菊池明彦
2. 発表標題 骨粗鬆症治療薬内包可能な炭酸アパタイトカプセルの調製
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Syuuhei Komatsu, Shuhei Abe, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi
2. 発表標題 Organic-inorganic Hybrid Particles Made from Biodegradable Coacervate Droplets for Bone Tissue Engineering
3. 学会等名 Okinawa colloids 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安部秀平、小松周平、麻生隆彬、菊池明彦
2. 発表標題 生分解性コアセルベート液滴を用いた骨粗鬆症治療薬物内包可能な炭酸アパタイトカプセルの調製
3. 学会等名 CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Syuuhei Komatsu, Shuhei Abe, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi
2. 発表標題 Drug Containing Carbonate Apatite Capsule Made from Biodegradable Coacervate Droplets for Bone Tissue Engineering
3. 学会等名 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society-AP Chapter and the 7th Asian Biomaterials Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安部秀平、小松周平、麻生隆彬、菊池明彦
2. 発表標題 骨粗鬆症治療薬内包炭酸アパタイトカプセルの調製と物性評価
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松周平、安部秀平、麻生隆彬、菊池明彦
2. 発表標題 骨再生のための薬物担持型炭酸アパタイトカプセルの調製
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松周平 安部秀平 麻生隆彬 菊池明彦
2. 発表標題 骨再生のための薬物内包型炭酸アパタイトカプセルの調製
3. 学会等名 第48回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2019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
---------	---------