

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500543

研究課題名(和文)骨再生のための時間差マルチ徐放システムの開発

研究課題名(英文)Controlled release of growth factors for bone regeneration

研究代表者

立花 亮(Tachibana, Akira)

大阪市立大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：80305614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：キトサン溶液を無水酢酸でアセチル化することで、キチンゲルを作製した。塩基性の細胞増殖因子は、キチンゲルに残存するアミノ基を残した場合、結合せず、ヨード酢酸でカルボキシメチル化すると、強く結合した。また、キチン結合ドメイン融合FGF2は特異的に結合し、緩衝液にはほとんど溶出しなかった。キチンを分解するリゾチームによって、キチン結合ドメイン融合FGF2は徐放された。キチンの分解に伴ってゲル外に放出されたのであるが、ゲルの成分の徐放と異なるパターンで徐放されていることから、放出された後に、再結合が起こっていると考察された。結果的に、初期バーストのない理想的な徐放システムが得られた。

研究成果の概要(英文)：Chitin gel was obtained by the acetylation of chitosan in solution. Basic growth factors did not bind to non treated chitin gel, whereas tightly bound to carboxymethylated chitin gel. Chitin binding domain-FGF-2 was bound to chitin gel and not released by PBS washing. Chitin binding domain-FGF-2 was released by degradation of chitin gel with lysozyme. During degradation of chitin gel with lysozyme, chitin fragment was released at a burst, but chitin binding domain-FGF-2 was not. Most of chitin binding domain-FGF-2 that was released from gel were re-bound to the gel, only low amount of FGF-2 was released out. Therefore, ideal controlled release without a burst release was realized.

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

キーワード：徐放システム FGF2 キチン

1. 研究開始当初の背景

近年、ES 細胞やiPS 細胞を使った再生医療が注目を集めている。また、これら以外でも従来の技術として、骨補填剤による骨再生などは医療現場において、有効な治療法として確立し、広く行われている。患者自身の骨細胞／骨芽細胞が骨補填剤（ハイドロキシアパタイトなど）を再構成し、骨を再生するというものである。今後、患者自身の細胞再生力が弱いなどの問題のあるとき、従来の技術とiPS細胞などの技術とが融合し、より高度な医療へと発展していくものと考えられる。このとき、骨補填剤から有用成分の徐放が必要となってくる。有用成分としては、細胞増殖因子であるFGF-2（線維芽細胞増殖因子）やBMP-2、BMP-7（骨形成因子）などが骨芽細胞の増殖および分化を誘導するのに役立つと考えられる。また、VEGF（血管内皮増殖因子）は骨再生に必要な血管の誘導に必要である。これらの増殖因子の作用・効果は異なるので、異なる時期／期間に徐放されることが望ましい。骨再生に特化したこれらの徐放はまだまだ研究の余地がある。

ところで、骨補填剤による治療時に細菌感染がしばしば見られることも知られている。このような場合、再手術が必要で、患者に重い負担となっている。これを避けるべく、抗生物質の徐放も試みられている。我々も骨補填剤であるハイドロキシアパタイトやβ-TCP からの抗生物質の徐放に関して病院と共同研究を行った。結果、抗生物質にはハイドロキシアパタイトなどに強く結合するものや弱く結合するもの、全く結合しないものがあることを明らかにした。徐放という観点からは弱く結合するものが最も良いという結論を下したが、強く結合した抗生物質も有用ではないかと考えた。すなわちEDTAなどによってハイドロキシアパタイトそのものを分解すると分解にともなって、抗生物質が徐放されるということを見いだした。これら弱い結合に

基づく短期の徐放と分解にともなう長期の徐放と組み合わせて用いることによって、目的を達成することができると考察した。抗生物質だけではなく、細胞増殖因子でも同様に、異なるメカニズムに基づく徐放を組み合わせて用いることができると考えた。そしてこれを、骨再生促進のためのバイオマテリアル作製に応用できると考えた。

2. 研究の目的

キチンゲルからの徐放システムの構築を行うが、その要因の細かい検討を積み重ねることによって、本システムの有効性を明らかにする。主として、以下の2項目を検討する。

(1) キチンゲルのマテリアルとしての評価を行う。

溶液であるキトサンをアセチル化することでキチンゲルを得ることを見いだした。アセチル化度／残存アミノ基量とゲル形成の関係、残存アミノ基に対する化学修飾（特に、カルボキシメチル化）性などキチンゲルのマテリアルとしての評価を行う。キチンゲル単体のほか、ハイドロキシアパタイトやケラチンスポンジ上でのキチンゲル生成の評価を行う。作製した各種ゲルの緩衝液や細胞培養培地における安定性を評価する。ゲルのリゾチームによる分解性を評価する。

(2) 各種キチンゲルからの徐放を評価する。ゲルに結合しない物質、弱く結合する物質、共有結合している物質、共有結合ではないが特異的に結合している物質などの徐放を検討する。

細胞増殖因子はFGF-2を用い、リコンビナント発現系を構築済みである。同時に、キチン結合ドメインとの融合タンパク質のリコンビナント発現系も構築済みである。これらを用いて、キチン結合ドメインー細胞増殖因子融合タンパク質の結合、結合ドメインを持たない細胞増殖因子の結合を検討する。細胞増殖因子の緩衝液、培地中における徐放／リゾチ

ームなどによる分解にともなう徐放を検討する。

3. 研究の方法

(1) キチンゲルの評価

キトサンと無水酢酸を激しく混合して型枠にキャストし、固化するとすぐに蒸留水で洗浄し、それ以上のアセチル化を行わないことでキチンゲルを得ている。このことで、修飾されていないアミノ基を残している。このアミノ基をさらに無水酢酸で処理し、アセチル化を進行させる、または、ヨード酢酸でアセチル化を行い、マイナスチャージに変換するなどを行う。このときのゲルの性質を検討した。さらにキチンを弱く分解することが知られている卵白リゾチームによる分解性を検討した。胎児ウシ血清 (FBS) 中での分解性もあわせて検討した。

(2) 各種キチンゲルからの徐放を評価する。

ゲルに結合しない物質としてBPBを、共有結合する物質としてTNBSを、固体化したキチン部分にだけ結合するキチン結合ドメイン融合FGF-2の結合性、徐放性をそれぞれ検討した。その後、キチンを弱く分解することが知られている卵白リゾチームによってゲルを分解し、それに伴う徐放を検討した。BPBおよびTNB化合物は吸光度を測定することで、FGF-2はELISAで濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 各種キチンゲルの評価

基準となるキチンゲルからさらに無水酢酸で処理を行うと90分まで一貫してゲルが収縮し、アミノ基の減少していることがわかった。つまり、ゲルとしての性質は修飾されずに残存しているアミノ基に依存していることがわかった。90分処理したゲルは堅くなっており、直径で半分以下に収縮していた。ヨード酢酸で処理したものは見かけ上の変化は特になかった。基準キチンゲルのリゾチームによる分解は10日以上かけて緩やかに行われることが

わかった。分解が進むとゲルがゆるくなり、少しの衝撃で崩壊した。PBS中ではそのようなことがなく、少なくとも1ヶ月は構造を保ったままであった。FBS中では約2週間でゲルが崩壊した。FBS中のキチン分解酵素であり、血清中に存在すると言われているキトトリオシダーゼによって分解されたためと考えた。すなわち、キチンゲルは生体内において、2週間程度の徐放に適した担体であると考えられた。

(2) 各種キチンゲルからの徐放

キチンゲルに全く結合しないBPBは速やかに放出され、2時間以内にほぼ放出された (図1)。半数放出時間は10分程度であった。

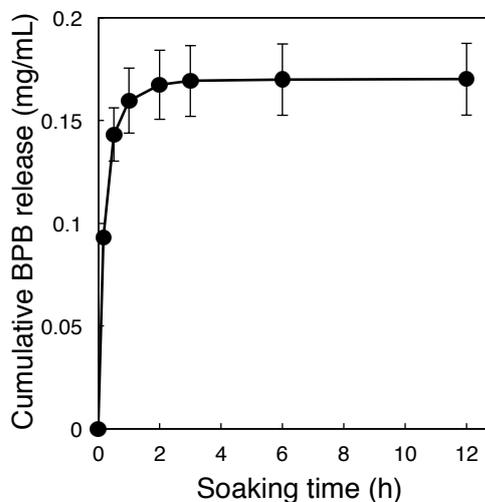


図1 キチンゲルからのBPBの徐放

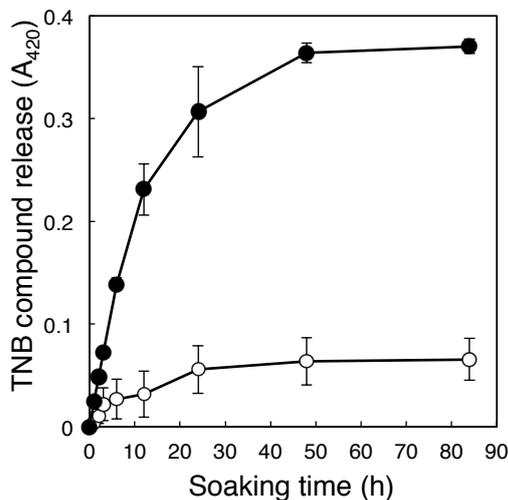


図2 キチンゲルからのTNB-Xの徐放

次に、キチンゲルのアミノ基に共有結合で結合しているTNB化合物の徐放を検討した(図2)。PBS中(○)ではほとんど放出されなかったが、リゾチーム中(●)では50時間程度まで徐放され、半分放出時間は10時間であった。ただし、TNBはゲル表面だけを修飾したものであるため、放出がほぼ終わった50時間以降でもゲルは崩壊していなかった。少なくともゲルに結合しないBPBよりもはるかに徐放性が認められており、このような徐放担体に共有結合させ、担体が分解していくに伴って徐放させるという新しい方法が提案できる。さらにキチン結合ドメイン融合FGF-2の徐放を検討した(図3)。PBS中(■)ではほとんど放出されず、リゾチーム溶液(0.1 mg/mL(●)、1.0 mg/mL(○)、10 mg/mL(□))の濃度依存的に徐放量が増大していた。

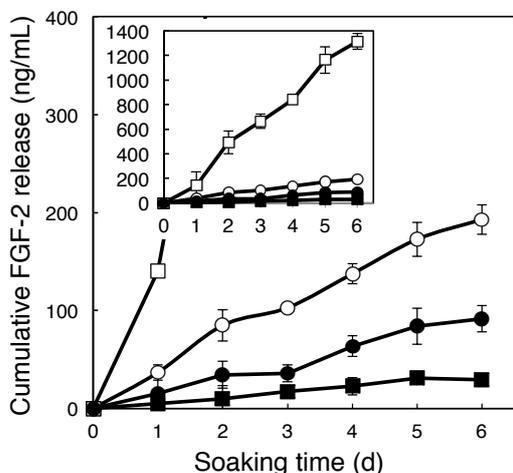


図3 キチンゲルからのFGF-2の徐放
リゾチーム濃度依存性

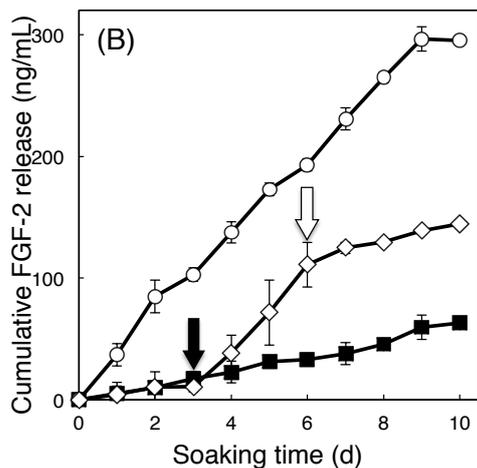


図4 キチンゲルからのFGF-2の徐放
リゾチーム存在依存性

ただ、どの濃度においても、ほぼ直線に徐放を観察された。通常、初期バーストが観察されるのであるが、全くそのようなことが観察されなかった。キチンゲルが崩壊するまで、このような直線の徐放が認められ、先のTNBの放出と異なっていた。次に途中でリゾチームを添加および除去した場合にどうなるかについて検討した(図4)。PBS中(■)、リゾチーム溶液(1.0 mg/mL(○))をコントロールとして、リゾチーム無しで3日の後、黒矢印でリゾチーム溶液(1.0 mg/mL(○))に、さらに白矢印でPBSに外液を交換し徐放性を検討した(◇)。すると、リゾチーム存在下においてだけ徐放され、しかもその徐放スピードは当初からリゾチーム溶液に浸したものと同等であった。PBSに交換した後は徐放が速やかに止まり、コントロールと同等になった。これによりリゾチームの存在に反応して徐放が行われていることが確認された。

ただ、キチンに結合しているTNB(図2)とキチン結合ドメイン融合FGF-2(図3、4)とで異なった徐放性を示すことについて、キチン結合ドメイン融合FGF-2の方はゲルからリゾチームによって切り出された後、そのまま放出されるのではなく、ほとんどが再度キチンゲルに結合し、放出されるものは非常に少ないのではないかと考えた。これが初期バーストを伴わず、1週間以上一定スピードで徐

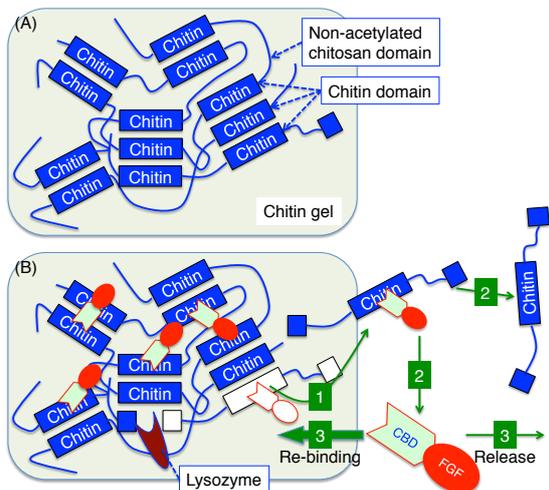


図5 キチンゲルからのリゾチーム依存的FGF-2の徐放
(A) キチンゲルの構造模式図
(B) リゾチームによる分解とFGF-2の徐放の関係

放される原因であると考えた(図5)。図5Bにおいて、(1)リゾチームによって、FGF-2が結合したまま切り出され、(2)キチン結合ドメインは遊離キチンと結合しないので、FGF-2はゲルのごく近傍ではずれる。(3)ほとんどが、ゲルに再結合し、ごく一部が放出される。これにより長期の徐放がなされると考察した。

これにより、初期バーストがなく、生体内酵素に応答する全く新しい徐放システムが開発できた。

この他に、カルボキシル化キチンゲルでは塩基性のFGF2は強く結合し、PBS中では放出されなかった。キチン結合ドメイン融合FGF-2のリゾチームによる徐放では、カルボキシル化していないゲルよりも、徐放が遅くなることを見いだした。キチンゲルをさらにアセチル化を行ったゲルでは、ややキチン結合ドメイン融合FGF-2の結合量は増えたが、大差はなかった。

以上よりまとめると、キチンゲルは塩基性であるが、カルボキシル化すれば、塩基性の細胞増殖因子を電気的に結合できる。このこととキチン結合ドメインを融合した細胞増殖因子の生体内酵素による徐放とを組み合わせることによって、時間差徐放が完成すると考えられた。

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)

[学会発表] (計2件)

1 安間 大、立花 亮、田辺 利住 キチンゲルを用いたFGF2の徐放/Controlled release of FGF2 using chitin gel バイオインターフェース先端マテリアルの創生 第3回シンポジウム 2013年2月8日 大阪市立大学 高原記念館。

2 安間 大、立花 亮、田辺 利住 キチンゲルを用いたFGF2の徐放/Controlled release of FGF2 using chitin gel 第64回日

本生物工学会大会 2012年10月26日 神戸国際会議場。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立花 亮 (TACHIBANA Akira)
大阪市立大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：80305614

(2) 研究分担者

田辺 利住 (TANABE Toshizumi)
大阪市立大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：20315972