

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11307

研究課題名(和文) 自己由来フィブリンによる成長因子制御と幹細胞を用いた骨・粘膜再生テクノロジー

研究課題名(英文) Bone/soft tissue regeneration technology with stem cells and the control of growth factor by autogenous fibrin

研究代表者

丸川 恵理子 (MARUKAWA, Eriko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：40419263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：疎水化多糖ナノゲル(CHPナノゲル)の徐放化による成長因子BMPの骨形成能への影響の検討をおこない、ラット異所性骨形成モデルを用いて、1 $\mu$ gまでrhBMP-2の濃度を減らすことが可能であった。また、老齢ラットにおける低濃度BMP-2/ナノゲル複合体含有 -TCPの異所性骨誘導の検討を行った。どの群でも新生骨面積の減少を認め、特にナノゲル使用群で骨形成量が低下し、ナノゲルの徐放効果で、骨形成のピークが遅く現れた可能性が考えられた。老齢ラットにおいては徐放化するだけでは十分な結果は得られなかったため、幹細胞などの細胞因子を導入させる必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：I examined the influence on bone formation ability with controlled release of the BMP as growth factor by the CHP nano-gel. We were able to reduce the density of rhBMP-2 to 1  $\mu$ g using a rat bone ectopic model. In addition, I examined the ectopic bone induction of low-concentrated BMP-2/ CHP nano-gel/ -TCP complex in the old age rat. We recognized the decrease of new bone area in all groups of old rats, and the new bone area decreased significantly in especially CHP nano-gel groups. Our result was suggested the possibility that bone formation was late by a controlled release effect with the CHP nano-gel. In the old age rat, enough results were not provided only by controlled release of BMP. We thought that it might be necessary to use cells such as stem cells.

研究分野：骨再生

キーワード：フィブリン 成長因子制御 幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

以前より我々は科研費を用いた研究で、血漿（フィブリン）を用いた骨再生に関する研究を行ってきた。足場材料としてだけでなく、自己由来の成長因子を含み、その DDS としても有用であることを示してきた。また、一方で骨髓穿刺液を濃縮し、単核球細胞数を増加させることで、細胞を培養して増殖させなくても、細胞外マトリックスであるフィブリンを足場として、イヌの顎骨欠損を再生させることが可能となった。本研究では、今までの結果を活かし、臨床応用を念頭においた顎骨再生部位の条件に応じた血漿と人工骨を用いた成長因子の徐放コントロールの最適化を行い、非培養の幹細胞を使用する場合の方法を確立すると共に、その作用機序についても明らかにする。さらに今回は軟組織の創傷治癒に効果のある多血小板血漿を粘膜再生に応用し、新たな粘膜移植（被覆）材の開発を目指したい。

## 2. 研究の目的

国内外を含めて、多血小板血漿（PRP）、多血小板フィブリン（PRF）を用いた骨再生に関する研究は数多くなされているが、その効果については明らかになりつつあるものの、その効果や機序については未だに明らかになっていない。われわれは PRP、PRF、乏血小板血漿（PPP）といった作製方法の違いによってそれぞれの構成成分は様々であるが、血小板由来成長因子などの成分とフィブリンの構造や強度の違いが骨再生にどのように影響するのかを検討し、明らかにしてきた。さらに使用部位や周りの環境、構成細胞によってそれら血液精製物の効果は異なっていたことが明らかとなった。これらの結果を踏まえて、使用部位に応じた最適な血漿を決定し、単独使用と人工骨や自家骨との併用との違いを明らかにし、臨床応用での最適な使用方法を確立したい。

一方で、疎水化多糖ナノゲルはタンパク質を疎水的会合力により自発的にナノゲルに複合化し得るため、安定したタンパク質 DDS として有望である可能性がある。われわれはすでに、疎水化多糖ナノゲルを骨形成蛋白質（BMP）の徐放材として用いたマウスでの実験で良好な結果が得られている。BMP の臨床応用で障害となっているのは至滴濃度が非常に高濃度であるためである。

よって、疎水化多糖ナノゲルを BMP と PRP に含まれる成長因子の DDS として使用することで、より速い再生やより大きな欠損でも再生可能となる可能性がある。

上記に示してきた骨再生だけでなく、今回は軟組織特に歯肉粘膜再生材料の開発を行うことも大きな目的である。遊離歯肉粘膜移植の必要性が高まっているが、現存する人工粘膜材料は未だ不十分とされ、硬口蓋より粘

膜を採取する FGG が現在は一般的な方法である。最適な人工粘膜材料の開発が急務であると思われる。今まで習得してきた幹細胞・成長因子・足場（フィブリン・ナノゲル）を用いる技術はそのまま粘膜再生に応用可能であり、軟組織治癒における PRP の効果が国内外で数多く証明されている今、PRP を粘膜再生に応用することは非常に有用であるだろう。幹細胞の候補としては今まで使用してきた骨髓由来幹細胞に加えて、脂肪由来幹細胞も用いる。また、フィブリンだけでは足場としての強度が足りないため、DDS としても使用可能な多糖ナノゲルを使用するか既存のコラーゲンや PLLA などの吸収性材料を比較検討し、最適な粘膜再生ハイブリッドマテリアルの開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### 血漿成分の違いによる骨形成能への影響の検討

多血小板血漿 PRP（白血球あり・なし）・乏血小板血漿 PPP・多血小板フィブリン PRF（白血球あり・なし）の計 5 種類間での比較を行う。以前の結果に多血小板血漿 PRP（白血球なし）・多血小板フィブリン PRF（白血球なし）を追加して行うだけで比較可能である。ラット頭蓋骨欠損モデルで行う。F344 ラットを用いて血漿やフィブリンを作製し、径 5 mm 骨欠損作成し、各材料を補填する。それぞれ材料の血小板由来成長因子濃度、白血球数、フィブリン強度、構造（SEM）を測定、評価する。さらに、骨欠損部の新生骨面積計測を行い、形態的に骨形成能の違いを評価する。

### 多糖ナノゲル・成長因子 BMP の徐放化による骨形成能への影響の検討

SD ラットを用いて、異所性骨形成モデルを用いて、-TCP ブロックを細胞の足場として評価した。ラット背部皮下組織に材料を移植し、骨誘導能を比較検討する。そこで、骨形成能だけでなく、形態が維持されるか、材料強度、操作性などについても配慮し、評価する。材料強度、SEM での形態解析も成長因子なしで評価して、最適化をおこなう。

### 脂肪由来幹細胞、BMP、RANKL に結合する OP3-4 ペプチドを用いた骨再生

脂肪由来幹細胞、BMP、RANKL に結合する OP3-4 ペプチドを併用して用いることで骨形成を促進させることができるかを評価した。In vitro で BMP、OP3-4 の濃度を変えて細胞増殖能、ALP 活性の違い、石灰化における影響などを評価した。

### 脂肪由来幹細胞、自己 PRP、コラーゲンシートを用いた軟組織再生

粘膜再生にはラット背部皮下モデルを用いて条件を絞り込む。幹細胞の有無、PRP の有無の違いによる上皮再生能の違いを評価し

た。細胞の生体内挙動を詳細に確認するために、MSC - GPS ラベリングされているものを用いて、IVIS を用いて in vivo で経時的に imaging する。また、その成長因子、凝固因子や接着因子の評価を ELISA や SEM により、詳細に解析する。

#### 4. 研究成果

血漿成分の違いによる骨形成能への影響の検討

血小板由来成長因子濃度は PPP、全血、PRF、PRP の順で増加していた。SEM においては PRF のフィブリン重合の強度が最も高く、PPP、PRF の順に強度が低下している可能性が示唆された。白血球の含有による明らかな差は認められなかった。ラット頭蓋骨欠損モデルの骨形成能の違いは PPP が中央部分より骨形成が認められるのに対して、PRF、PRP は欠損部周囲より骨形成が認められる特徴を示した。この詳細なメカニズムを今後も検討していく予定である。

疎水化多糖ナノゲル (CHP ナノゲル) の徐放化による成長因子 BMP の骨形成能への影響の検討

ラット異所性骨形成モデルを用いて、5 mm 角の -TCP に各材料を移植直前に含浸させ、ラット背部皮下内に移植し、1 µg まで rhBMP-2 の濃度を減らすことが可能であった。4 µgrhBMP-2/ナノゲル複合体を含浸させた 4 µgB ゲル群、4 µgrhBMP-2 を含浸させた 4 µgB 群、同様に BMP を 1 µg にした 1 µgB ゲル群と 1 µgB 群、同様に BMP を 1 µg にし凍結乾燥させた凍結 1 µgB ゲル群と凍結 1 µgB 群、何も含浸させない対照群の 7 群で術後 3、6 週の骨誘導能を比較した。移植後 3 週で 4 µgB 群と比べて有意に 4 µgB ゲル群の骨形成が促進されていたが、凍結乾燥なしの 1 µg BMP ではほぼ骨形成は認められなかった。移植後 6 週では、凍結 1 µgB ゲル群と凍結 1 µgB 群で骨形成を認め、凍結 1 µgB ゲル群は BMP 4 µg 使用の 2 群と同等の骨形成量が認められた。BMP-2 にナノゲルを複合化させることで低濃度の BMP でも骨誘導され、BMP-2/ナノゲル複合体含有 -TCP は臨床応用に際しても安全で有用な骨補填材となる可能性が示唆された。

同時に多糖ナノゲル架橋の有無による骨形成の違いも検討したが、材料の吸収過程に問題が生じ、材料形態を変更する必要があると思われた。

In vitro での徐放化の確認も行い、多糖ナノゲルと成長因子の複合化により、モデルタンパク質としてのインシュリンの長期徐放が可能となることを示した。

また、老齢ラットにおける低濃度 BMP-2/ナノゲル複合体含有 -TCP の異所性骨誘導の検討を行った。どの群でも新生骨面積の減少を認め、特にナノゲル使用群で骨形成量が低下し、ナノゲルの徐放効果で、骨形成のピ

ークが遅く現れた可能性が考えられた。老齢ラットにおいては徐放化するだけでは十分な結果は得られなかったため、幹細胞などの細胞因子を導入させる必要があると考えられた。

脂肪由来幹細胞、BMP、RANKL に結合する OP3-4 ペプチドを用いた骨再生

脂肪由来幹細胞、BMP、RANKL に結合する OP3-4 ペプチドを併用して用いることで骨形成を促進させることができるかを評価した。OP3-4 ペプチドを用いることで in vitro で骨形成促進傾向にはあったが、有意差を持って促進されなかった。また、ラット異所性骨形成モデルを用いて、-TCP を細胞の足場として以前と同様に評価したが、OP3-4 ペプチドによって骨形成は促進されなかった。

脂肪由来幹細胞、自己 PRP、コラーゲンシートを用いた軟組織再生

粘膜再生に関しては脂肪由来幹細胞、自己フィブリン (PRP)、コラーゲンシートを用いてマウスで評価している途中であるが、角化上皮が幹細胞を用いた群、PRP を用いた群が対象群と比べて厚い組織が形成されている傾向が認められたが、有意差は得られていない。また、両者を用いた場合にはさらなる優位性は得られなかった。コラーゲンシートを皮膚欠損部に留めておくことが困難であり、幹細胞の生着の前に材料が脱落してしまうケースがあり、ばらつく結果の要因と考えられた。今後、材料を再度検討し、N を増やして検討する予定である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 河崎 陸、佐々木 善浩、西村 智貴、関根 由莉奈、森田 圭一、丸川 恵理子、澤田 晋一、向井 貞篤、秋吉 一成、磁性ナノゲルシャペロンによるタンパク質デリバリー、第 33 回日本 DDS 学会学術集会、2017 年
2. 丸川 恵理子、シンポジウム (多血小板血漿 (PRP) 療法) 骨の治療、第 7 回細胞再生医療研究会、2017 年
3. 丸川 恵理子、Application of various artificial bones in bone augmentation for dental implants、40th Asia Pacific Dental Congress & 109th PDA Congress (招待講演)(国際学会)、2018 年

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸川 恵理子 (MARUKAWA, Eriko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・准教授  
研究者番号：40419263

(2)研究協力者

佐々木 善浩 (SASAKI, Yoshihiro)  
京都大学工学研究科・高分子化学専攻・准教  
授

秋吉一成 (AKIYOSHI, Kazunari)  
京都大学工学研究科・高分子化学専攻・教授