

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10729

研究課題名(和文) 骨親和性ペプチドを付与した、生体適合性骨髄止血材料の開発

研究課題名(英文) Osteogenic-enhancing peptides-modified, polycaprolactone and polylactide copolymer, for a novel biodegradable bone hemostatic wax-like agent

研究代表者

伊藤 英樹 (ITO, Hideki)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：50732707

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)：胸骨切断面からの骨髄出血の止血にはボーンワックスが用いられることが多い。ボーンワックスは手術操作性に優れるが、非分解性で残存により感染源や骨癒合・再生の妨げとなりうる。本研究では、ポリカプロラクトン、ポリ乳酸、骨親和性ペプチドによる新規骨髄止血材料を開発した。動物実験において、新規骨髄止血材料はボーンワックスと同様の手術操作性で止血することができた。ボーンワックスは骨再生を阻害したが、新規骨髄止血材料は骨親和性ペプチドにより骨再生が促進された。これらの結果から、本研究で開発した新規骨髄止血材料は、優れた手術操作性および生体適合性を持つ新たな骨髄止血材として有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

古くから使用されているボーンワックスは、非分解性で感染や術後合併症などのリスクを抱えているのに関わらず、現在においても臨床で用いられている。これは、ボーンワックスは術者にとって操作しやすい物性であること、また、ボーンワックスに取って代わる生体適合性のある骨髄止血材料が開発・市販されていないためである。本研究では、独自技術でボーンワックスと同じ操作性で止血ができる生体適合性骨髄止血材料を開発し、止血効果および骨再生促進が見られた。したがって、本研究結果は、学術的意義だけでなく、術後合併症の低減やQOLの向上といった医学的意義も持ち合わせる。

研究成果の概要(英文)：Bone wax is widely applied for sternal hemostasis after median sternotomy. However, it is known to be a cause of infection, interference of bone healing, and chronic inflammation. In this study, we developed a novel biodegradable bone hemostatic agent using osteogenic enhancing peptides-modified polycaprolactone and polylactide copolymers. In animal experiments, our bone hemostatic wax-like agent stopped bone bleeding from tibias similar to bone wax in surgery. Although bone wax inhibited bone regeneration in tibias, our bone hemostatic wax-like agent promoted bone regeneration by osteogenic-enhancing peptides. These results suggested that our bone hemostatic wax-like agent is useful as a novel bone hemostatic material with abilities involving excellent surgical operability and biocompatibility.

研究分野：心臓外科学

キーワード：骨髄止血 ポリカプロラクトン ポリ乳酸 ペプチド 生体吸収性 生体適合性 ボーンワックス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

手術介入に際し、骨の切開・切断を必要とする場合は少なくない。たとえば、心臓外科手術では心臓に到達・露出するために胸骨正中切開が必要であるが、胸骨切開により骨切断面の骨髄から出血を伴い、血液のロスや手術操作の妨げとなるだけでなく、後出血など術後合併症の原因になる。

現在の臨床では、骨髄止血にはミツロウを主成分としたボーンワックスを骨髄にパッキングすることによる物理的な止血法が主に用いられている。ボーンワックスは、生体温度域で柔らかくなる物性であるため、手指操作で骨切断面にパッキングしやすく手術時の操作性に優れている。しかし、ボーンワックスは非分解性で、閉胸時にボーンワックスが残存していると胸骨癒合を妨げ、術後の炎症を惹起したり、感染源にもなりうる。また、骨癒合・再生の遅延は術後の早期社会復帰を妨げる。特に高齢者の場合、日常生活への復帰の遅延が患者のQOLに著しく影響を及ぼすことがある。

これらのことから、手術操作性や術後合併症の低減、QOL向上を目指した、生体適合性を持つ新たな止血材料の創出が求められる。

2. 研究の目的

本研究では、生体吸収性ポリマーおよび骨親和性ペプチドを用いた新たな骨髄止血材料を創出し、動物実験にて止血効果や骨再生に関してボーンワックスと比較検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)-1 wax 状生体吸収性ポリマー基材の作成

モノマーカプロラクトン(CL)を用いて、分岐型脂肪族ポリエステル合成を行った。水酸基の数が異なる多価アルコールを開始剤として開環重合を行うことで分岐型ポリカプロラクトン(PCL)を合成したのち、末端水酸基にアクリロイル基を導入し、二重結合を有するPCLマクロモノマーを合成した。PCLの分子量・分岐数や、ポリD,L-乳酸(PLLA)およびハイドロキシアパタイト(Hap)との混合比を設計した。混合したポリマー基材は、核磁気共鳴(1H NMR; 現有)、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC; 現有)、示差走査熱量測定(DSC)、動的粘弾性測定(MCR)にて分子構造や物性の評価を行った。

(1)-2 骨親和性ペプチド

骨分化に関するタンパク Bone morphogenetic protein (BMP)のBMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7の各アミノ酸配列から相同性配列を選出したのち、ペプチドアレイスクリーニング法にて同定された9残基の骨親和性ペプチド TLVNSVNSKを用いた。この骨親和性ペプチドを、ポリマー基材に混練した。

(2) ウサギ脛骨骨欠損モデルによる出血量および骨再生の評価

7-12週齢日本白色ウサギの脛骨を露出し、直径2mmのドリルで骨欠損を作成した。欠損部位にガーゼを3分間当てて骨髄出血量を測定した。その後、ボーンワックスまたは新規骨髄止血材料で止血した。効果判定の比較対象群として、ボーンワックス群(bone wax)、ペプチド不含有ポリマー群(non-pep wax)、ペプチド含有ポリマー群(pep wax)、止血なしコントロール群(sham)の4群間で行った。止血後、閉創して2, 16週間後にCTにて骨評価を行った。

(3) ウサギ胸骨正中切開モデルによる骨再生評価

7-12週齢日本白色ウサギの胸骨を丸ノコギリで正中切開し、骨断面をボーンワックスまたは新規骨髄止血材料で止血したのち閉胸した。効果判定の比較対象群として、ボーンワックス群(bone wax)、ペプチド不含有ポリマー群(non-pep wax)、ペプチド含有ポリマー群(pep wax, n=10)、止血なしコントロール群(sham)の4群間で行った。2週後に力学的強度測定、組織学的評価にて骨評価を行った。

4. 研究成果

(1) wax 状生体吸収性ポリマー基材

PCLとPDLLAを60:40比で共重合し、4分岐を持つPoly(DLLA-CL)を作成した。bone waxの融解温度(T_m) 60に対し、Poly(DLLA-CL)の T_m 値は約36だった。レオロジー特性評価では、poly(DLLA-CL)の37での損失弾性率(G'')は貯蔵弾性率(G')よりも高かった。また、

poly(DLLA-CL)のG'およびG''の値はbone waxの値よりも高く、Poly(DLLA-CL)がT_mを超えると粘性のある液体として動作し、bone waxよりも粘着性があることを示した。粘着性を低減させるため、Hapを融解poly(DLLA-CL)と50:50比で混合したところ、poly(DLLA-CL)の粘着性は大幅に改善された。

得られたポリマー基材poly(DLLA-CL)-Hapに、0.2% (w/w) 骨親和性ペプチドを混練した(図1)。ポリマー基材poly(DLLA-CL)-Hapは、ペプチド混練の有無に関わらず、ボンワックスと同様に手でパッキングできる柔軟な物性を有していた。



図1. wax状生体吸収性ポリマー基材

(2) ウサギ脛骨骨欠損モデルによる出血量および骨再生の評価

各waxでの止血時の様子を図2Aに示す。出血量測定では、各平均値sham群0.7gに対し、bone wax群0.03g、non-pep wax群0.02g、pep wax群0.02gとなり、non-pep waxとpep waxはbone waxと同程度の止血効果を示した。

手術後2週間後のCT画像では、sham群、non-pep wax群およびpep wax群で仮骨形成が見られた。また、16週間後では、bone wax群では骨欠損したままだったが、sham群、non-pep wax群およびpep wax群は正常状態に近い骨再生が見られた。

(3) ウサギ胸骨正中切開モデルによる骨再生評価

力学的強度測定では、各平均値sham群146N、bone wax群58N、non-pep wax群108N、pep wax群159Nとなり、bone wax群は他群に比べて有意に低かった。また、pep wax群は、bone wax群およびnon-pep wax群に比べ有意に高かった。

切片染色では、全ての群切開箇所は骨膜に近いところでの内軟骨様骨化や繊維化、炎症性細胞の浸潤が観察された。一方、bone wax群では、緻密骨形成はなく、胸骨縁は形態が大きく崩れていた。non-pep wax群およびpep wax群では、ポリマーが断片化し残存していた。免疫染色では、pep wax群で、切開部分にCollagen I産生骨芽細胞がみられ、non-pep wax群に比べてcollagen I陽性エリアが多く、緻密骨形成が観察された。

以上の結果から、新規骨髄止血材料は、ボンワックスと同様の操作性で骨髄出血を止血することができた。また、ボンワックスは骨再生を阻害したが、一方で、新規骨髄止血材料は骨再生を阻害することなく、さらに骨親和性ペプチドにより骨再生が促進された。したがって、本研究で創出した新規骨髄止血材料は、優れた手術操作性および生体適合性を持つ新たな骨髄止血材として有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 緒方藍歌, 大野司, 成田裕司, 蟹江慧, 加藤竜司, 宇都甲一郎, 荏原充宏
2. 発表標題 生体吸収性・操作性・骨再生促進機能を有する新規骨髄止血材料の開発
3. 学会等名 第40回バイオマテリアル学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Aika Yamawaki-Ogata, Hiroto Suenaga, Tsukasa Ohno, Kei Kanie, Ruji Kato, Koichiro Uto, Mitsuhiro Ebara, Hideki Ito, Yuji Narita.
2. 発表標題 Osteogenic Enhancing Short Peptide with Biodegradable Polymer as a New Bone Hemostatic Material
3. 学会等名 5th Tissue Engineering International & Regenerative Medicine Society, World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kei Kanie, Rio Kurimoto, Jing Tian, Aika Yamawaki-Ogata, Koichiro Uto, Mitsuhiro Ebara, Yuji Narita, Hiroyuki Honda, Ruji Kato.
2. 発表標題 Screening of Osteogenic-Enhancing Short Peptides from BMPs for Biomimetic Material Applications
3. 学会等名 5th Tissue Engineering International & Regenerative Medicine Society, World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蟹江慧、栗本理央、緒方藍歌、宇都甲一郎、本多裕之、成田裕司、荏原充宏、加藤竜司
2. 発表標題 細胞選択的骨化促進ペプチドの探索と機能性評価
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 歯科治療用組成物	発明者 岡本、高橋、林、蟹江、緒方、成田、加藤、荏原、宇都	権利者 名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、2018-205226	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 骨髄止血剤	発明者 蟹江慧，緒方藍歌，成田裕司，加藤竜司，荏原充宏，宇都	権利者 名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、2018-168098	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	荏原 充宏 (EBARA Mitsuhiro) (10452393)	国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテク トニクス研究拠点・グループリーダー (82108)	
研究分担者	碓氷 章彦 (USUI Akihiko) (30283443)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	成田 裕司 (NARITA Yuji) (60378221)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	
研究分担者	緒方 藍歌 (OGATA Aika) (70718311)	名古屋大学・医学系研究科・特任講師 (13901)	
研究分担者	蟹江 慧 (KANIE Kei) (80636407)	名古屋大学・創薬科学研究科・助教 (13901)	

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
---------	---------