

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11901

研究課題名(和文) 超分子ポリロタキサンを用いた成長因子活性亢進型骨補填剤の創製と骨再生療法の確立

研究課題名(英文) The development of supramolecular polyrotaxane-based architectures enhancing growth factor activity for bone regeneration.

研究代表者

山口 聡 (YAMAGUCHI, Satoshi)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・非常勤講師

研究者番号：00280628

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)：生体内分解吸収性、分子可動性を有する超分子ポリロタキサン(PRX)を用いた新たな骨再生療法を目指し、以下の研究成果を得た。1) BMPシグナル阻害分子nogginのsiRNAをPRXを用いて細胞導入し効率良くnogginの発現を抑え、骨芽細胞分化促進に成功した。2) 難水溶性ホルモン分子メラトニンとPRX構成成分 β -CDとの包摂錯体は骨芽細胞分化を促進した。3) BMP2活性亢進型PRXゲル作成のためアニオン性修飾基としてカルボン酸に着目した。BMP/カルボン酸複合体は骨芽細胞分化を促進した。4) 低分子可動性PRX基盤にVEGFを導入したところ組織再生に重要である血管ネットワーク形成を促進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯牙欠損、疾患(腫瘍、嚢胞など)に対する手術、歯周病などにより生じた顎骨骨量減少は自然回復が見込めない。そのため機能回復、審美的回復のために自家骨移植が行われているのが現状である。手術侵襲を伴う骨移植に代わる骨再生医療開発の意義は大きく、盛んに研究が行われており実用化に近づいている。超分子ポリロタキサンを応用した骨再生医療はこれまでに無い新しい方法であり、骨再生を促す成長因子の効率、効果を上昇させ得ることが本研究により実証された。ポリロタキサン使用により成長因子使用量減少が期待でき、新しい治療法の安全性向上、対価減少に繋がる。3年間の本研究により臨床応用の可能性が具体化したと考える。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop supramolecular polyrotaxane(PRX)-based architectures enhancing growth factor activity for bone regeneration. We've achieved the following results during the 3 year research period. 1) The gene silencing of noggin by GALA/DMAE-SS-PRX/siRNA ternary polyplexes enhanced osteogenic differentiation efficiency of BMP2 through the suppression of noggin expression. 2) The inclusion complex of melatonin(MLT) with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) was prepared to improve the water solubility. Its complex promoted osteogenic differentiation in MC3T3-E1 cells. 3) Polycarboxylates, especially poly(glutamic acid), showed their capability to intensify the osteoinductivity of BMP2. 4) The VEGF-immobilized supramolecular PRX surfaces with low mobility stimulated network formation in vascular endothelial cells.

研究分野：口腔外科 再生医療

キーワード：骨再生 ポリロタキサン BMP Noggin siRNA VEGF メラトニン カルボン酸

1. 研究開始当初の背景

顎骨骨量減少は自然回復が見込めない為に機能回復、審美性回復を目的とした顎骨再建は歯科、口腔外科において重要なテーマである。実際には自家骨移植による顎骨再建が主流であるが、手術侵襲を伴い患者にとって大きな負担となっている。そこで新しい骨再生療法が待ち望まれているのが現状であった。

骨形成を促進する成長因子であるBone Morphogenetic Protein 2 (BMP2)は骨再生医療分野では活発に研究されている。BMP2は生体内で不安定なため投与後の失活などが問題となり、生体内での骨形成には大量のBMP2を必要とする。しかし、BMP2大量投与による炎症反応の惹起、異常骨形成などが報告されており臨床応用には困難をきたしていた。

我々はBMP2を臨床応用する際に重要となる活性維持と徐放特性を得るために超分子化合物ポリロタキサン(PRX)に注目し研究を進めていた。荷電性官能基として硫酸基を導入した硫酸化PRXの合成方法を確立した。硫酸化PRXとBMPは効率的に静電複合体を形成し、マウス骨芽細胞前駆細胞MC3T3-E1の分化をBMP2単独に比べ有意に促進した。さらにアテロコラーゲンを担体としマウス頭蓋骨欠損モデルによる骨再生実験を行ったところ、硫酸化PRX/BMP2複合体添加群が最も良好な骨再生能を示した。

2. 研究の目的

以上のこれまでの我々の研究成果より、PRXの特性による成長因子使用量減少、PRXと成長因子による強力な骨形成作用の相乗効果を期待し、PRXを応用した成長因子活性亢進型骨再生用移植担体開発を研究目的とした。PRXの特性を活かせるのはBMP2だけではない。PRXの構造を変化させることにより色々な成長因子、さらには核酸にも応用できる。それゆえに本研究ではBMP2以外の因子にも注目し、新たな骨再生療法開発を目指した。

3. 研究の方法

PRX構築におけるその特性(貫通させるCD数、分解特性、両末端置換基、付与する官能基など)は各実験に合わせ設計した(4.研究成果参照)。硫酸化PRXを骨格とした三次元的な厚みを有するゲル状移植担体の作製は硫酸化PRXのジメチルスルホキシド溶液に架橋剤であるカルボニルジイミダゾールを加えて50℃にて静置することでPRX同士が化学的に架橋されたゲルを作製を試みた。骨芽細胞分化実験においてはMC3T3-E1細胞を、血管ネットワーク形成実験にはヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC)を用いた。

4. 研究成果

1) カチオン性ポリロタキサン/siRNA/膜融合性ペプチド複合体による遺伝子サイレンシングを介した骨芽細胞分化誘導能の促進

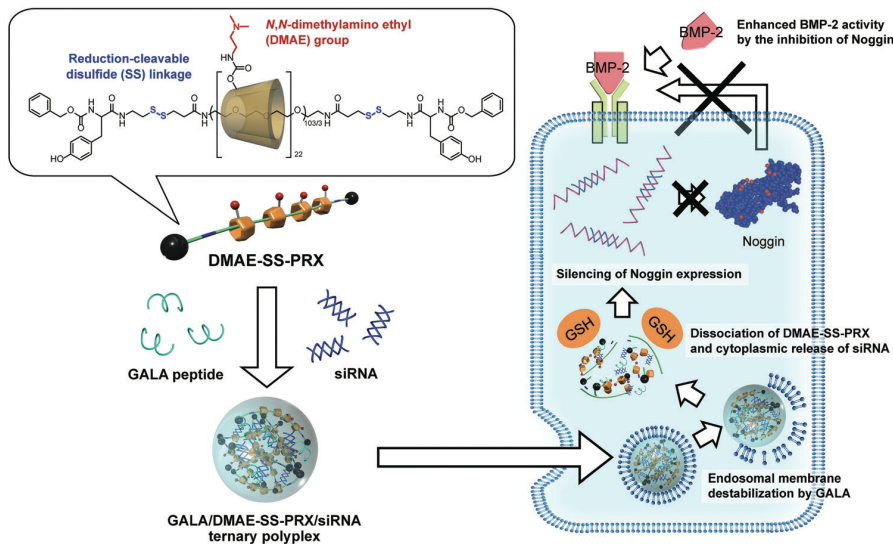
NogginはBMPとその受容体との結合を干渉しBMPシグナル伝達を阻害する。そこでNogginによる抑制作用を減ずることがBMP活性上昇を導き、骨再生におけるBMP使用量低容量化に繋がるとの仮説が成り立つ。そこでsiRNAによるNogginのサイレンシングに着目し、カチオン性分解性PRXによるsiRNA導入を目指した。PRXの構成成分である α -CDにN,N-ジメチルアミノエチルカルバメート(DMAE)を付与しカチオン性とし、PEGにジスルフィド(S-S)結合を導入することにより還元状態であるサイトゾル内にて分解しsiRNAを放出するPRX(DMAE-SS-PRX)を構築した。また、エンドソーム脱出を促進するために膜融合性GALAペプチドを併用することとした。細胞はMC3T3-E1を用いて実験を行い、以下の結果を得た。

(1) 三元複合体(GALA/DMAE-SS-PRX/siRNA)の形成をゲル電気泳動、動的光散乱法およびゼータ電位測定にて確認できた。

(2) 既存の遺伝子導入試薬(Lipofectamine2000)と比較して、三元複合体の高い細胞内取込みが見られた。

(3) 三元複合体は高いエンドソーム脱出効率を示し、既存の核酸導入法(Lipofectamine2000)と比較して高い遺伝子サイレンシング効果を示した。

(4) 三元複合体によるNoggin遺伝子発現抑制を行った細胞に対してBMP2を作用させたところ、アリカリフォスファターゼ活性が上昇すると共に骨芽細胞分化マーカー(type1 collagen, Runx2, Osterix)の発現も上昇した。



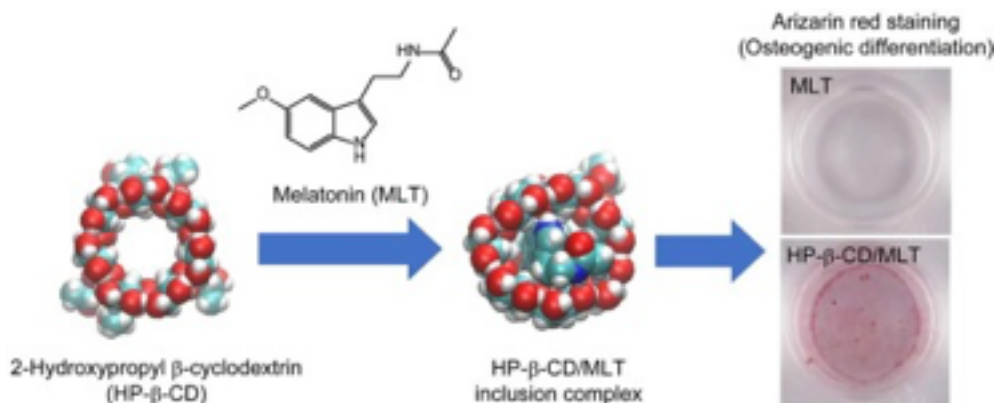
以上の結果より、GALA/DMAE-SS-PRX/siRNA 三元複合体は、細胞内への高い導入効率を維持したままエンドソーム脱出を促進させることが noggin-siRNA において示された。超分子三元複合体を使用した Noggin遺伝子の発現抑制がBMP2による骨誘導能を増加させる可能性を示したもので、本研究成果をさらに発展させることで骨再生医療への応用だけでなく、siRNA による核酸医薬開発の発展にも寄与できると考えられる。

2) メラトニン包接化合物による細胞内取込機能と骨芽細胞分化誘導能

メラトニン(MLT)は松果体より分泌されるホルモンであり、概日リズムの調節に関与している。海外では不眠症治療薬として認可されている。近年、MLTは骨代謝においても注目されている。加齢に伴うMLT分泌量低下が骨粗鬆症と関連があること、骨量増加および骨吸収抑制の両方に効果を及ぼすなどが報告され、骨再生治療薬としての期待が高まっている。しかし、MLTは難溶性であるために骨再生治療薬として考えた場合には細胞内取り込みに問題がある。

そこで我々はPRX構成分子であるシクロデキストリン(CD)に注目した。CDは外表面が親水性、空洞内表面が親水性であり、その空洞部に疎水性化合物を内包し、溶解性、安定性、吸収性を改善することが知られており医薬品、食品分野で既に実用化されている。2-ヒドロキシプロピルβ-シクロデキストリン(HP-β-CD)、MLT、MC3T3-E1細胞を用いて実験を行い、以下の結果を得た。

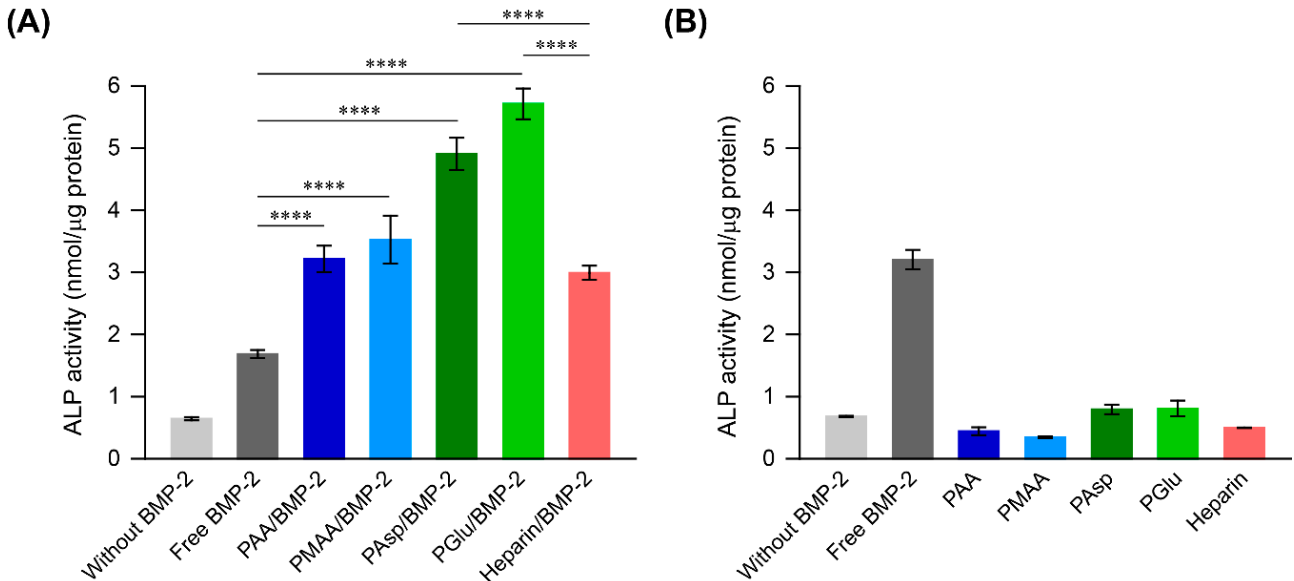
- (1) X線解析、核磁気共鳴測定によりHP-β-CDとMLTの包接化合物形成を確認した。
 - (2) MC3T3-E1細胞内への取り込みはMLT単体に比べHP-β-CD/MLT包接化合物が有意に優っていた。
 - (3) MC3T3-E1細胞内におけるアリカリフォスファターゼ活性、骨芽細胞分化マーカー (BSP,OCN,Osterix) 発現、石灰化いずれにおいてもHP-β-CD/MLT包接化合物はMLT単体よりも有意に高い誘導能を示した。
- 以上の結果よりMLTは難溶性であるが、HP-β-CDと包接化合物を形成することにより有効な骨再生治療薬となり得ることが示された。



3) BMP2活性亢進を目的としたポリカルボン酸との静電複合体形成とその骨芽細胞分化誘

BMP2活性亢進能を有する移植用PRXゲル開発は本研究課題の大きな目標であった。我々はこれまでに硫酸化PRX/BMP2複合体はBMP2単体に比べ有意に高い骨芽細胞分化誘導能を有することを見出した。そこで本研究において硫酸化PRXゲルの作成を試みた。ゲル作成可能であったが、硫酸化PRXゲルは韌性に問題があり、脆いために臨床応用するには操作性に劣ると判断した。この脆さはPRXが架橋結合する際の硫酸基の反応性の弱さにあると考えられる。そこで新たなアニオン性官能基としてカルボキシル基に着目した。まずは4種類のポリカルボン酸、ポリアクリル酸(PAA), ポリメタクリル酸(PMAA), ポリアスパラギン酸(PAsp), ポリグルタミン酸 (PGlu)を評価対象とし、細胞はMC3T3-E1を用い実験を行い、以下の結果を得た。

- (1) いずれのポリカルボン酸にも細胞毒性は見られなかった。
- (2) 動的光散乱法による粒子径測定から4種類のポリカルボン酸いずれもBMP2と複合体を形成できることが示された。

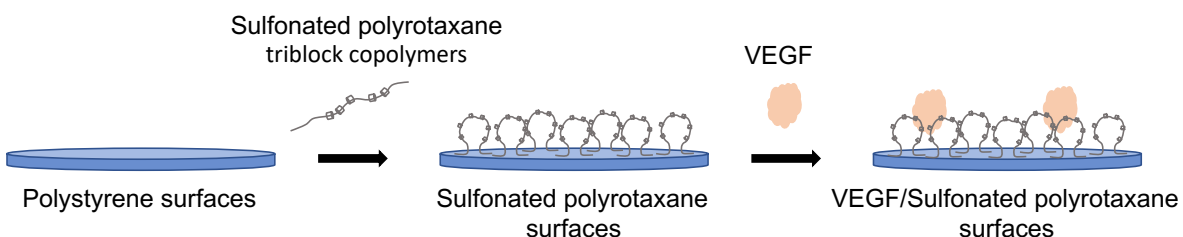


(3) BMP2単体に比べ4種類いずれのポリカルボン酸/BMP2複合体も高いアルカリフォスファターゼ活性を誘導した。なかでもPGlu/BMP2複合体が最も高い活性を示した。PGlu/BMP2複合体は石灰化誘導に関しても最も高い活性を示した。

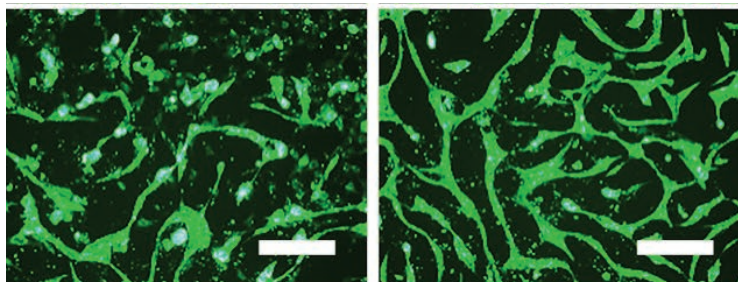
以上の結果よりPGluはBMP2活性亢進型PRXゲル作成への応用が期待される。

4) ポリロタキサンの分子可動性調節と成長因子導入による血管ネットワーク形成の促進

骨再生のみならず組織再生においては酸素および栄養供給の為に血管新生が重要となる。我々の過去の研究においてPRXの分子可動性によるシグナル伝達と成長因子からのシグナル伝達の両方によって骨芽前駆細胞の骨芽細胞分化を促進できることを見出している。そこでPRXの分子可動性と成長因子を応用し血管内皮細胞ネットワーク形成亢進を目的とし研究を行った。PRXのCD部位を硫酸化したPRXトリブロック共重合体を24ウェルプレート上に被膜し、硫酸化PRX表面を作製した。表面の分子可動性はPRXのCD貫通数によって調節した。これらの表面に対してVEGFを静電的相互作用によって導入した。対照群としてVEGF無添加群、遊離VEGF添加群を設定した。血管内皮細胞成長因子(VEGF)とヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて実験を行い以下の結果を得た。



- (1) 細胞形態に変化は見られなかったが、細胞増殖には低分子可動性PRXにVEGFを表面導入した群が優れていた。
- (2) 共役転写因子YAPはVEGFによりRhoファミリーを通し活性化され、血管増殖および血管内皮リモデリングに関与されることが知られている。低分子可動性PRXにVEGFを表面導入した群においてYAPの最も高い核移行率が見られた。また、rhoA, pdgf, ang-1, and pecam-1 の遺伝子発現も同群が最も高かった。
- (3) 高分子可動性(α -CD貫通数の少ない)PRX表面と比較して、低分子可動性PRX表面はVEGFを表面導入することにより長く密な細胞ネットワーク化を誘導した。



低分子可動性硫酸化PRX表面の蛍光顕微鏡画像

左：遊離VEGF添加群

右：VEGF表面導入群

Scale bar : 300 μ m

以上の結果より、低分子可動性のPRX表面にVEGFを表面導入することで、PRXの分子可動性によるメカノシグナルと表面導入したVEGFからの液性因子シグナルの両者を効率的にHUVECに伝達しネットワーク化・成熟化を促進できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hyodo Katsuya, Arisaka Yoshinori, Yamaguchi Satoshi, Yoda Tetsuya, Yui Nobuhiko	4. 巻 19
2. 論文標題 Stimulation of Microvascular Networks on Sulfonated Polyrotaxane Surfaces with Immobilized Vascular Endothelial Growth Factor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 1800346-1800353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mabi.201800346	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 Terauchi Masahiko, Tamura Atsushi, Yamaguchi Satoshi, Yui Nobuhiko	4. 巻 547
2. 論文標題 Enhanced cellular uptake and osteogenic differentiation efficiency of melatonin by inclusion complexation with 2-hydroxypropyl -cyclodextrin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 53～60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijpharm.2018.05.063	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 Inada Takasuke, Tamura Atsushi, Terauchi Masahiko, Yamaguchi Satoshi, Yui Nobuhiko	4. 巻 6
2. 論文標題 A silencing-mediated enhancement of osteogenic differentiation by supramolecular ternary siRNA polyplexes comprising biocleavable cationic polyrotaxanes and anionic fusogenic peptides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 440～450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C7BM01100H	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 Terauchi Masahiko, Tamura Atsushi, Tonegawa Asato, Yamaguchi Satoshi, Yoda Tetsuya, Yui Nobuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Polyelectrolyte Complexes between Polycarboxylates and BMP-2 for Enhancing Osteogenic Differentiation: Effect of Chemical Structure of Polycarboxylates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 1327～1338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym11081327	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Terauchi Masahiko, Inada Takasuke, Kanemaru Tomoki, Ikeda Go, Tonegawa Asato, Nishida Kei, Arisaka Yoshinori, Tamura Atsushi, Yamaguchi Satoshi, Yui Nobuhiko	4. 巻 105
2. 論文標題 Potentiating bioactivity of BMP-2 by polyelectrolyte complexation with sulfonated polyrotaxanes to induce rapid bone regeneration in a mouse calvarial defect	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 1355 ~ 1363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.36016	査読の有無 無
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 寺内正彦, 田村篤志, 山口 聡, 依田哲也, 由井伸彦	4. 巻 38
2. 論文標題 硫酸化ポリロタキサンによるBMP2活性亢進と骨再生への試み	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオマテリアル –生体材料–	6. 最初と最後の頁 24-25
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17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Katsuya Hyodo, Yoshinori Arisaka, Satoshi Yamaguchi, Nobuhiko Yui.
2. 発表標題 Design of sulfonated polyrotaxane surfaces to activate vascular endothelial cells.
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katsuya Hyodo, Yoshinori Arisaka, Satoshi Yamaguchi, Tetsuya Yoda, Nobuhiko Yui.
2. 発表標題 Induction of vascular network in vitro on polyrotaxane surfaces with vascular endothelial growth factors.
3. 学会等名 13th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiko Terauchi, Atsushi Tamura, Nobuhiko Yui, Satoshi Yamaguchi
2. 発表標題 Inclusion complexation of melatonin with 2-hydroxypropyl β -cyclodextrin for enhancing osteogenic differentiation.
3. 学会等名 13th Asian Congress on Oral & Maxillofacial Surgery (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有坂慶紀, 兵頭克弥, 山口 聡, 由井伸彦.
2. 発表標題 硫酸化ポリロタキサン基材を用いた血管内皮細胞増殖因子の表面導入.
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 兵頭克弥, 有坂慶紀, 山口 聡, 由井伸彦.
2. 発表標題 血管内皮細胞のネットワーク化を亢進するポリロタキサン表面の構築.
3. 学会等名 第47回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 兵頭克弥, 有坂慶紀, 山口 聡, 依田哲也, 由井伸彦.
2. 発表標題 ポリロタキサンの分子可動性調節と成長因子導入による血管ネットワーク形成の促進.
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺内正彦, 山口聡
2. 発表標題 -シクロデキストリン誘導体を用いたmelatoninとの包接錯体形成による細胞内取り込み量と骨分化誘導能の評価
3. 学会等名 第72回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺内正彦, 田村篤志, 山口聡, 由井伸彦
2. 発表標題 骨形成を促進する硫酸化ポリロタキサン/BMP-2複合体による頭蓋骨欠損モデルの再生
3. 学会等名 第47回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺内正彦, 田村篤志, 山口聡, 由井伸彦
2. 発表標題 歯槽骨再生を目指した硫酸化ポリロタキサン/骨形成因子複合体の骨誘導能評価
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺内正彦, 稲田大佳輔, 田村篤志, 山口聡, 由井伸彦
2. 発表標題 硫酸化ポリロタキサン/骨形成因子複合体によるマウス頭蓋骨欠損モデル骨形成促進効果
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 兵頭克弥、有坂慶紀、山口聡、由井伸彦
2. 発表標題 血管内皮細胞を活性化するための硫酸化ポリロタキサン表面の設計
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Terauchi M, Inada T, Tamura A, Yamaguchi S, Yui N
2. 発表標題 Bone regeneration using bone morphogenetic protein-2 with supramolecular sulfonated polyrotaxane in mouse calvarial defect model.
3. 学会等名 7th International Conference on Mechanics of Biomaterials and Tissues. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Terauchi M, Inada T, Tamura A, Yui N, Yamaguchi S.
2. 発表標題 Enhanced bone regeneration of bone morphogenetic protein-2 by the complexation with sulfonated polyrotaxane.
3. 学会等名 30th annual congress of Taiwanese Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 寺内正彦, 田村篤志, 山口聡, 依田哲也, 由井伸彦
2. 発表標題 メラトニン包接化合物による細胞内取込機能と骨分化誘導能評価
3. 学会等名 第36回シクロデキストリンシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲田大佳輔, 寺内正彦, 山口聰, 依田哲也
2. 発表標題 分解性ポリロタキサン/siRNA複合体の遺伝子サイレンシングを介した骨形成促進
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahiko Terauchi, Atsushi Tamura, Satoshi Yamaguchi, Tetsuya Yoda, Nobuhiko Yui.
2. 発表標題 Bone regeneration with bone morphogenetic protein-2 amplified by supramolecular sulfonated polyrotaxane
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 兵頭克弥, 山口聰, 依田哲也
2. 発表標題 分子可動性ポリロタキサン表面への血管内皮細胞成長因子の固定化が血管ネットワーク形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 有機生体材料学分野 www.tmd.ac.jp/org/index.html</p>

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	由井 伸彦 (Yui Nobuhiko) (70182665)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授 (12602)	
研究 協力者	寺内 正彦 (Terauchi Masahiko)		
研究 協力者	稲田 大佳輔 (Inada Takasuke)		
研究 協力者	兵頭 克弥 (Hyodo Katsuya)		