

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09759

研究課題名(和文) ハイドロゲルと生体吸収性セラミックスを用いた多剤徐放可能な骨置換型人工骨の開発

研究課題名(英文) Development of bioresorbable artificial bone using hydrogel and ceramics

研究代表者

永井 宏和 (NAGAI, HIROKAZU)

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：50282190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リン酸カルシウム系マテリアルとハイドロゲルマイクロ粒子とを複合化した薬剤徐放型人工骨を用いた新しい骨再生医療を目指した。

はじめに、低結晶性炭酸アパタイト顆粒およびハイドロキシアパタイト顆粒にBMP-2を吸着させた複合体を作製してラット背部皮下への移植実験を行い、薬剤徐放効果を確認した。続いて、炭酸アパタイト顆粒あるいはハイドロキシアパタイト顆粒とコラーゲンの複合体を作製してウサギ頭頂骨の欠損部への埋植実験を行い、良好な骨形成を確認した。さらにリン酸カルシウム系マテリアルとゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子との複合体作製を試みたが上手くいかなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨欠損に対する治療のゴールドスタンダードは自家骨移植であるが、自家骨移植では採取できる骨の量や形態に限界がある。また、骨採取に際しては健康部に新たな侵襲を加えるという大きな問題があり、自家骨移植に代わる新しい骨再生医療への期待は大きい。本研究では、リン酸カルシウム系マテリアルとハイドロゲルマイクロ粒子とを複合化した薬剤徐放型人工骨を用いた新しい骨再生医療を目指した。リン酸カルシウム系マテリアルからの薬剤徐放効果が確認でき、コラーゲンとの複合体の移植実験では良好な骨形成が確認できたが、リン酸カルシウム系マテリアルとゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子との複合体作製が上手くいかなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we try to develop a novel bone regenerative therapy using a drug sustained-release artificial bone composite of calcium phosphate-based materials and hydrogel microparticles. First, low-crystalline carbonate apatite granules or hydroxyapatite granules adsorbed with BMP-2 were prepared and transplanted subcutaneously in rats, and the effect of drug sustained release was confirmed. Subsequently, a complex of collagen and low crystalline carbonate apatite granules or hydroxyapatite granules were prepared and implanted in the defects of the rabbit parietal bone, confirming good bone formation. Furthermore, we try to prepare a composite of calcium phosphate-based materials and gelatine hydrogel microparticles, but it did not work, and the subsequent experiments were not carried out.

研究分野：外科系歯学

キーワード：骨再生

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域では、腫瘍や外傷、骨髄炎など種々の疾患によって骨欠損が生じる。骨欠損に対する治療のゴールドスタンダードは自家骨移植であるが、採取できる骨の量や形態、移植後の感染や吸収など様々な問題がある。また、骨採取に際しては、健常部に新たな侵襲を加えるという最大の問題があり、自家骨移植に代わる新しい骨再生医療への期待は大きい。再生医療は、細胞、scaffold、分化増殖因子の3大要素から成るが、骨再生を考えた場合、scaffoldとなる生体材料は完全に骨と置換することが望ましい。また、細胞源としては自分の細胞が理想的である。ES細胞やiPS細胞(Takahashi K, *J Clin Invest*, 2005)が再生医療の細胞源として研究されているが、倫理的な問題やがん化の問題、分化制御の難しさなど多くの問題がある。そこで、本研究では体内に存在する自分の間葉系幹細胞を効率よく骨欠損部に呼び寄せる(動員)という発想に至った。

申請者は骨リモデリングに同調して骨に置換される生体材料である低結晶性炭酸アパタイト(CAp)の研究を行ってきており、本研究では、CApを含む生体吸収性マテリアルとゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子という2種類のDDS担体を複合化することで、複数の薬剤が徐放可能な骨置換型人工骨を開発する。さらに、SDF-1/CXCR4システムを応用して骨再生医療の細胞源となる自己間葉系幹細胞を骨欠損部に動員し、その上で骨形成を増強する成長因子を徐放するという新しい骨再生医療を目指す。

2. 研究の目的

本研究の学術的独自性と創造性は、(1)生体吸収性マテリアルを人工骨としてだけでなく、DDSの担体として利用すること、(2)SDF-1/CXCR4システムを応用して自己間葉系幹細胞を骨欠損部に動員すること、(3)生体吸収性マテリアルとゼラチンやコラーゲンとの複合体にハイドロゲルマイクロ粒子を吸着させることで新しい薬剤徐放性の骨置換型人工骨を創製することである。生体吸収性マテリアルとハイドロゲルマイクロ粒子という2種類の担体を用いることで異なる薬剤の徐放化が可能となり、骨形成は飛躍的に増強すると考えられる。また、SDF-1の徐放による自己間葉系幹細胞の動員は、課題である再生医療の細胞源を解決でき、安価で安全な骨再生医療の実現をもたらすものと考えられ、自家骨移植に変わる新しい骨再生医療を提供できるものと確信している。

3. 研究の方法

- (1) 生体吸収性マテリアルとコラーゲンとの複合化による骨置換型人工骨の創製
リン酸カルシウム(Cp)系マテリアル(CAp, TCP, OCPなど)とコラーゲン(Col)溶液を混和し、チューブに充填した後、凍結乾燥することでCp-Col複合体を作製する。CApの検討からColの濃度は3%以上必要であるためCol濃度は3%とする。顆粒径は100-300 μm, 300-600 μm, 1000-1500 μmの3種類として複合体を作製する。さらに、CpとColの重量比を変えて複合体を作製する。熱架橋の影響についても検討する。それぞれ作製したCp-Col複合体をX線回折(XRD)およびフーリエ変換赤外分光分析(FT-IR)で解析する。
- (2) 骨置換型人工骨による骨再生実験
BMP2あるいはFGF18を吸着させたゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子を(1)で作製したCp-Col複合体に滴下含浸させて凍結乾燥させた薬剤徐放性の骨置換型人工骨を作製し、ラット頭頂骨あるいはウサギ大腿骨に埋植して、(2)と同様にX線評価および組織学的評価を行う。
- (3) 薬剤徐放性の骨置換型人工骨による骨再生実験
(1)で作製したCp-Col複合体をラット頭頂骨あるいはウサギ大腿骨に埋植し、4, 8, 12, 24週後に試料を摘出し、摘出標本のX線評価および組織学的評価を行って、Cpの種類や顆粒径、CpとColの重量比、熱架橋など最適な骨置換型人工骨の条件を検討する。
- (4) BMP2とFGFを徐放する骨置換型人工骨による骨再生実験
BMP2を吸着させたCpとコラーゲン(Col)溶液を混和し、チューブに充填した後、凍結乾燥することでCp-Col複合体を作製し、FGF18を吸着させたゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子を複合体に滴下含浸させて凍結乾燥させ、BMP2とFGF18を徐放する骨置換型人工骨を作製する。(2)と同様にX線評価および組織学的評価を行う。
- (5) SDF-1徐放性ゼラチンスポンジによる骨再生実験
SDF-1溶液を吸着させたゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子を滴下含浸させたゼラチンスポンジを凍結乾燥させ、(2)と同様にX線評価および組織学的評価を行う。
- (6) SDF-1を徐放する骨置換型人工骨による骨再生実験
SDF-1溶液を吸着させたゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子をCp-Col複合体に滴下含浸させた薬剤徐放性骨置換型人工骨を作製し、(2)と同様にX線評価および組織学的評価を行う。
- (7) SDF-1とBMP2を徐放する骨置換型人工骨による骨再生実験

BMP2 を吸着させた Cp とコラーゲン (Col) 溶液を混和し、チューブに充填した後、凍結乾燥することで Cp-Col 複合体を作製し、SDF-1 を吸着させたゼラチンマイクロ粒子を複合体に滴下含浸させて凍結乾燥させ、SDF-1 と BMP2 を徐放する骨置換型人工骨を作製する。人工骨をラット頭頂骨あるいはウサギ大腿骨に埋植して、(2)と同様に X 線評価および組織学的評価を行う。

- (8) 生体吸収性材料とゼラチンとの複合化による骨置換型人工骨の創製
ゼラチン (Gel) 溶液と Cp を用いて Cp-Gel 複合体を作製し、同様に解析する。

4. 研究成果

- (1) Cp 系材料とコラーゲンとの複合化による骨置換型人工骨の創製
Cp 系材料として CAp およびハイドロキシアパタイト (HAp) を用いた。Cp 系材料とコラーゲン (Col) 溶液を混和した後、チューブに充填して凍結乾燥し、円柱状の Cp-Col 複合体を作製した。Cp 系材料の粒径は 100-300, 300-600, 600-1000 マイクロメートルの 3 種類とし、Col 濃度は 1, 2, 3% として複合体を作製した。また、Cp と Col の重量比を 50, 65, 80 wt% として複合体を作製した。粒径、混和するコラーゲン溶液の濃度、炭酸アパタイトとコラーゲン溶液の重量比について検討した結果、粒径は 300-600 μm と 600-1000 μm の 2 種類、コラーゲン溶液の濃度は 3%, CAp とコラーゲン溶液の重量比は 50% と 65% という条件で複合体の作製が可能であった。続いて、熱架橋の有無について検討したが、熱架橋していない複合体は生理食塩水に浸漬すると溶解してしましたが、150 で熱架橋を行うことで溶解性が改善できた。
- (2) Cp 系材料とコラーゲンを複合化した骨置換型人工骨による骨再生実験
(1)の結果から、コラーゲン溶液の濃度を 3% とし、CAp とコラーゲン溶液の重量比を 50% と 65% として、粒径が 300-600 μm (S) と 600-1000 μm (M) の 2 種類の顆粒を用いて、埋植用の CAp-Col 複合体を 4 種類 (50S, 65S, 50M, 65M) 作製した。複合体をウサギ頭頂骨に埋植し、2, 4, 8 週後に摘出して組織学的評価を行った。骨欠損部に試料が緊密に埋植されている個体では骨形成は良好であったが、顆粒が骨欠損部外へ分散してしまった個体では骨形成が不十分であったことから、作製した複合体の操作性と安定性に問題があることが明らかになった。そこで、150 で熱架橋を行った CAp-Col 複合体を埋植したところ、骨形成には影響はなく、操作性と安定性の改善が得られた。
- (3) リン酸カルシウム系材料の薬剤徐放効果
BMP-2 と複合化させた CAp 顆粒および HAp 顆粒をラット背部皮下に埋植し、2, 4, 8, 12, 28 週後に試料を摘出した。HE 染色による組織学的評価では、異所性の硬組織形成が BMP-2 50 μg と複合化した CAp を埋植したラットでアパタイト顆粒を取り囲むようにみられた。Osterix と Runx2 の免疫染色の結果では、埋植後 2 ~ 4 週で炭酸アパタイト顆粒の周囲に多数の発現細胞を認めた。Osterix 発現細胞は、28 週まで顆粒周囲や新生骨周囲に存在したが、Runx2 発現細胞は 8 週以降は減少したことから、異所性の骨形成は 4 ~ 8 週までに活発に行われていると考えられた。
- (4) Cp 系材料とマイクロ粒子との複合化
Cp 系材料にマイクロ粒子を滴下含浸させた後に凍結乾燥させた複合体、あるいは Cp-Col 複合体にマイクロ粒子を滴下含浸させた後に凍結乾燥させた複合体の作製を試みたが、複合化できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------