

平成 22 年 4 月 26 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390494  
 研究課題名 (和文) 骨／血管新生誘導因子徐放化システムを組み込んだインプラントによる  
 迅速的周囲骨再生  
 研究課題名 (英文) Induction of Bone Regeneration by Controlled Release of  
 Osteogenesis/Angiogenesis Factors from Titanium Implants  
 研究代表者  
 矢谷 博文 (YATANI HIROFUMI)  
 大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
 研究者番号：80174530

研究成果の概要 (和文)：本研究は、チタンインプラント埋入部周辺の骨組織再生を誘導するための基盤技術を確立することを目的に行われた。チタンインプラントに設けた内空に生理活性物質 (b-FGF) を徐放するゼラチンスポンジ生体材料を組み込むことにより、埋入周囲における骨組織新生の誘導が可能であることが明らかとなった。また、骨組織再生を誘導する合成ペプチドおよび小分子化合物を特定し、これらの骨組織再生における役割を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：The aim of this study is to establish a novel technology to achieve efficient bone regeneration by controlled release of bioactive factors from titanium implants. We designed a titanium implant chamber which contains a biodegradable material releasing bioactive factor (b-FGF). We found that this system induces bone regeneration around the implant in an animal model. We also identified osteogenesis inducible peptide and small molecule, and elucidated mechanisms of these molecules on bone regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：インプラント、骨再生、薬剤徐放、小分子化合物、ペプチド、骨芽細胞、破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、歯科インプラントの適応症例拡大に対する社会的要求から、治癒期間を短縮するためのチタン表面改質技術のみならず、埋入部位周辺に必要な移植骨片、添加代用骨部位

の骨新生・再生能を向上する技術革新が求められている。

チタンは高い生体親和性を有することからインプラント材料として広く用いられているが、それ自体は組織再生能を持っていな

い。従来のインプラント研究開発では、チタン表面の改質に着目したものがほとんどであり、アパタイト析出促進や細胞接着および細胞増殖能向上を主たる目的として検討されてきたが、未だ生体内において能動的に骨形成を誘導するには至っていない。

我々は生体吸収性水和ゲルを利用した生体活性物質の放出制御技術（ドラッグデリバリーシステム）をインプラント体に組み込むことを着想した。連携研究者の田畑泰彦教授（京都大学・再生医科学研究所）は、骨新生および血管新生作用を有する塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を酸性ゼラチン水和ゲルから徐放するシステムを開発してきた。このシステムの骨再生医療への応用はすでに臨床治験の段階であり、生体内での有用性は実証されつつある。

ただし、bFGFなどの成長因子は分子量の大きな蛋白質であるため、実際の臨床応用を考えた場合には安全性や費用対効果の点で問題が残る。したがって、b-FGFの代わりとなる骨組織再生を促進する小分子生理活性物質の発見が期待される。

申請者はこれまでに、合成ペプチド Ser-Val-Val-Tyr-Gly-Leu-Arg (SVVYGLR) が間葉系幹細胞の増殖能を促進し、骨髄組織内で血管新生作用を介した骨新生作用を有するという知見を得ている。

以上を学術的背景とし、本研究では骨再生を促進する新規の生理活性物質を探索すると共に、生理活性物質の徐放化システムを組み込んだインプラント体が周囲骨再生に及ぼす影響を検討した。

## 2. 研究の目的

(1) 骨/血管新生誘導因子（bFGF、機能性ペプチド）の徐放化システムを組み込んだインプラント体を用いて、迅速的オッセオインテグレーションおよび埋入部周辺の骨再生を誘導する技術を確立すること。

(2) 合成ペプチド SVVYGLR が骨組織再生に及ぼす効果を検討すること。

(3) 骨組織再生を促進する新規の生理活性物質を探索すること。

## 3. 研究の方法

(1) bFGFおよびSVVYGLRペプチド徐放化について、田畑がこれまでに開発した化学修飾の異なる5種類の「ゼラチン水和ゲル」あるいは「ポリ乳酸」の粒子のなかから、最も相互作用が高く適した吸収性生体材料を検索する。次に、純チタン円柱に内空を設け、チタン表面に通じる細孔が付与されたインプラント体を作製し、このチタンインプラント体の内空に、bFGFあるいはSVVYGLRペプチド含有水和ゲルを填入することで、徐放化システムを組み込む。これをラット大腿骨に埋入

し、埋入部位におけるオッセオインテグレーションおよび骨組織の新生を評価する。

(2) SVVYGLRペプチドが、骨芽細胞および破骨細胞に及ぼす影響を細胞接着、増殖、分化について検討したうえで、ラット頭蓋骨欠損部位における骨再生作用を評価する。

(3) 破骨細胞分化に重要な分子であるNFATの活性をターゲットにした細胞スクリーニングシステムを構築し、これを用いて、破骨細胞分化に影響を及ぼす化合物をスクリーニングする。

## 4. 研究成果

### (1) bFGF徐放インプラントの骨新生作用

チタンインプラントから徐放する生理活性物質として、b-FGFを用いた検討を行った。ラットの大腿骨に埋入したインプラント体から10 $\mu$ gのb-FGFを酸性ゼラチン水和ゲルより徐放させた結果、4週間後のインプラント体周囲には著明な骨組織の新生が認められた（図1）。また、従来のゼラチン水和ゲルを用いたb-FGFの徐放を改良するために、連携研究者の京都大学・田畑泰彦教授の開発した新規 $\beta$ TCP配合ゼラチンスポンジキャリアの利用を検討した。 $\beta$ TCP配合ゼラチンスポンジ薬剤徐放システムを組み込んだインプラント体をラット大腿骨に埋入したところ、インプラント体周囲および埋入方向に対して垂直的にも著明な骨組織の新生誘導を認め、このシステムの周囲骨再生への有効性が示唆された。

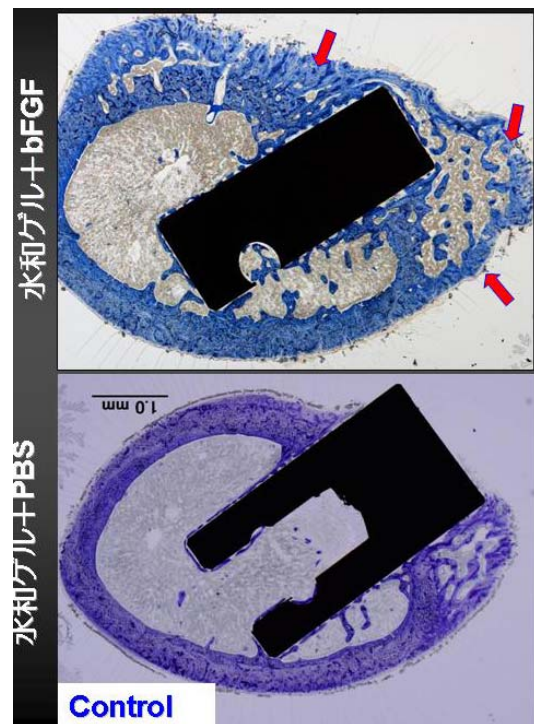


図1：b-FGF徐放による骨増生効果（矢印）。

## (2) SVVYGLR ペプチド徐放インプラントが周囲骨新生に及ぼす影響

チタンインプラントから徐放する生理活性物質として、SVVYGLR ペプチドを用いた検討を行った。同ペプチドを含有したゼラチン水和ゲルをインプラント体に組み込み、これをラット大腿骨に埋入したところ、インプラント体と骨界面には高い骨接触率（オッセオインテグレーション）を認めたが、周囲への骨新生作用は認めなかった。一方で、血流による影響を受けないラット頭蓋骨欠損部位においてこのペプチドをコラーゲンスポンジから徐放すると、骨新生は有意に促進した。顎骨内でこのペプチドの骨新生作用を発揮するためには、血流に左右されない効率的な徐放システムの確立が必要と思われる。

## (3) SVVYGLR ペプチドが骨芽細胞/破骨細胞に及ぼす影響

bFGF などの成長因子は分子量の大きな蛋白質であるため、実際の臨床応用を考えた場合には安全性や費用対効果の点で問題が残る。そこで、b-FGF の代わりとなる小分子生理活性物質として、申請者らがこれまでに有用性を示唆してきた SVVYGLR 血管新生ペプチドに着目し、このペプチドが骨芽細胞および破骨細胞に及ぼす影響を検討した。その結果、同ペプチドは  $\alpha v \beta 3$  インテグリンを介して骨芽前駆細胞の接着・増殖能を促進する一方で破骨細胞の分化を抑制し、ラット生体内で骨組織再生を促進することが明らかとなった（図2：Biomaterial に発表）。

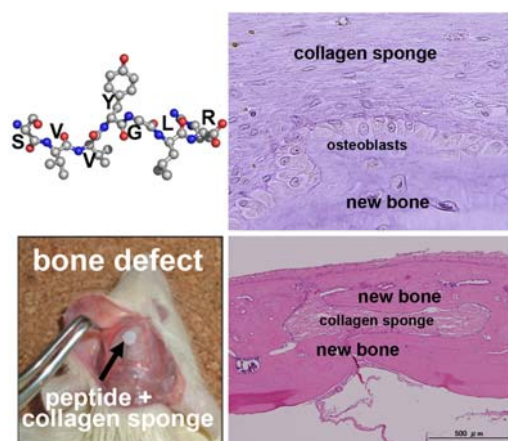


図2：SVVYGLR ペプチド（左上）は、ラット頭蓋骨欠損部位で骨芽細胞を増生し（右上）、骨新生を促進した（右下）。

## (4) NFAT レポーター破骨細胞株の樹立

一般的に、破骨細胞の培養およびその分化の評価方法は確立されているとはいえ、比較的煩雑で再現性も困難である。我々は、破骨細胞分化を容易に誘導でき、破骨細胞分化過程で活性が亢進する NFAT をターゲットとし

たルシフェラーゼレポーターベクターを組み込んだ RAW 細胞株の樹立に成功した（図3）。

この細胞株は、分化誘導によって NFAT 活性を著明に亢進し、これに伴って発光するルシフェラーゼは発光プレートリーダーによって簡単に測定可能であり、非常に感度、再現性が高い。この細胞株は今後の破骨細胞研究において非常に有用なツールとなることが期待される。

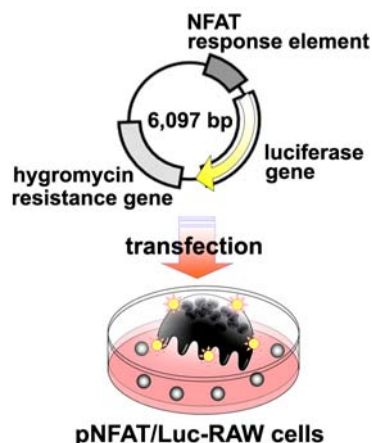


図3：NFAT レポーター破骨細胞株の作製

## (5) 破骨細胞分化に関する化合物

NFAT レポーター破骨細胞株を用いたケミカルコンパウンドライブラリーのスクリーニングから、破骨細胞活性に関わるいくつかの新規因子を特定した。

この因子のひとつハルミンは、RANKL 非依存性に NFAT 活性を著明に促進するが、同時に促進される分化制御因子 Id2 によって破骨細胞分化を抑制し、骨芽細胞に対しては石灰化を促進する機能を有している可能性が示唆された。今後、この化合物が骨吸収抑制剤として利用できる可能性があり、今後の研究の発展が期待される。

## 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3件）

- ① Egusa H, Saeki M, Doi M, Fukuyasu S, Matsumoto T, Kamisaki Y, Yatani H: A small-molecule approach to bone regenerative medicine in dentistry. *Journal of Oral Biosciences*, accepted. 査読有
- ② Egusa H, Kaneda Y, Akashi Y, Hamada Y, Matsumoto T, Saeki M, Thakor DK, Tabata Y, Matsuura N, Yatani H: Enhanced bone regeneration via multimodal actions of synthetic peptide SVVYGLR on

osteoprogenitors and osteoclasts. *Biomaterials*, 30; 4676-4686, 2009. 査読有

- ③ Hamada Y, Egusa H, Kaneda Y, Hirata I, Kawaguchi N, Hirao T, Matsumoto T, Yao M, Daito K, Suzuki M, Yatani H, Daito M, Okazaki M, Matsuura N: Synthetic osteopontin-derived peptide SVVYGLR can induce neovascularization in artificial bone marrow scaffold biomaterials. *Dental Materials Journal*, 26; 487-492, 2007. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- ① Egusa H, Doi M, Saeki M, Kamisaki Y, Yatani H: Chemical library screening of orphan ligands for identifying osteoclastogenesis-related small molecular compounds: *26th Naito Conference on Osteobiology*, 2009 年 11 月 4 日, 兵庫.
- ② Egusa H: Dental Implant Treatment & Regenerative Medicine -The Impact of Biotechnology on Current and Future Oral Implantology-: *Oral Health & Science Seminar in the University of Hong Kong, Faculty of Dentistry*, 2009 年 10 月 28 日, 香港, 中国.
- ③ 江草 宏, 金田善俊, 萱島浩輝, 福安 翔, 明石喜裕, 矢谷博文: 合成ペプチド SVVYGLR の骨組織再生作用: 第 51 回歯科基礎医学会学術大会, 2009 年 9 月 11 日, 新潟.
- ④ 江草 宏, 土居正典, 佐伯万騎男, 矢谷博文: 小分子化合物 harmine は破骨前駆細胞における NFATc1 および Id2 発現を増強する: 第 27 回日本骨代謝学会, 2009 年 7 月 23 日, 大阪.
- ⑤ 土居正典, 江草 宏, 佐伯万騎男, 矢谷博文, 上崎善規: 小分子化合物 harmine は破骨前駆細胞における NFATc1 および Id2 発現を増強する: 第 108 回大阪大学歯学会例会, 2009 年 7 月 16 日, 大阪.
- ⑥ 江草 宏: 再生医学とインプラント治療—近未来のインプラント学におけるバイオテクノロジーのインパクト—: 第 118 回日本補綴歯科学会シンポジウム「インプラントと再生医療」, 2009 年 6 月 6 日, 京都.
- ⑦ Egusa H, Kaneda Y, Akashi Y, Kayashima H, Yatani H: Enhanced Bone Regeneration with Bioactive Synthetic Peptide SVVYGLR. *6th Biennial Congress of Asian Academy of Prosthodontics*, Apr. 25. 2009. Seoul, Korea.
- ⑧ Egusa H, Doi M, Saeki M, Kamisaki Y, Yatani H: Development of

high-throughput screening system for identifying osteoclastogenesis related compounds. *87th IADR General Session*, Apr. 3. 2009. Miami, USA.

- ⑨ Kaneda Y, Egusa H, Akashi Y, Ashida S, Hamada Y, Yatani H: Bone regeneration induced by functional peptide SVVYGLR. *87th IADR General Session*, Apr. 1. 2009. Miami, USA.
- ⑩ 土居正典, 江草 宏, 佐伯万騎男, 飯田務, 上崎善規, 矢谷博文: Harmine の NFAT 発現増強作用: 第 50 回歯科基礎医学会学術大会, 2008 年 9 月 25 日, 東京.
- ⑪ 江草 宏: オーフアンリガンドライブラリーを用いた破骨細胞分化関連化合物のスクリーニング: 第 50 回歯科基礎医学会学術大会シンポジウム「硬組織の明るい未来を目指して」シンポジスト, 2008 年 9 月 23 日, 東京.
- ⑫ 金田善俊, 江草 宏, 濱田吉之輔, 矢谷博文: 機能性ペプチド SVVYGLR を用いた骨組織再生の試み: 第 117 回日本補綴歯科学会学術大会, 2008 年 6 月 7 日, 名古屋.
- ⑬ 金田善俊, 江草 宏, 濱田吉之輔, 松浦成昭, 矢谷博文: 機能性ペプチド SVVYGLR が歯周組織細胞へ及ぼす影響: 第 104 回大阪大学歯学会例会, 2007 年 7 月 19 日, 大阪.
- ⑭ Kaneda Y, Egusa H, Hamada Y, Ashida S, Kobayashi M, Yatani H: Effects of osteopontin-derived peptide SVVYGLR on cells from mesenchymal tissues. *85th IADR General Session*, Mar. 21. 2007. New Orleans, USA.

[図書] (計 1 件)

- ① 矢谷博文, 中村隆志, 瑞森崇弘, 石垣尚一, 山田真一, 江草 宏: 大阪大学出版会, 顎口腔機能の再建をめざして「生命歯科医学のカッティング・エッジ」米田俊之編: 2008, 167-179.

[その他]

学術賞受賞

- ① 江草 宏: 日本補綴歯科学会 特定推進研究優秀論文賞受賞, 日本補綴歯科学会, 平成 22 年 6 月 13 日受賞式.
- ② 江草 宏: 第 27 回日本骨代謝学会 優秀ポスター演題賞受賞, 日本骨代謝学会: 平成 21 年 7 月 23 日.
- ③ Egusa H: 第 6 回アジア補綴歯科学会 最優秀ポスター発表賞, Asian Academy of Prosthodontics: 平成 21 年 4 月 26 日.
- ④ Kaneda Y, Egusa H, Yatani H et al.:

Arthur R. Frechette Prosthodontic  
Research Award Finalist, 国際歯科研究  
学会：平成 21 年 4 月 3 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢谷 博文 (YATANI HIROFUMI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：80174530

(2) 研究分担者

江草 宏 (EGUSA HIROSHI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：30379078  
田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)  
京都大学・再生医科学研究所・教授  
研究者番号：50211371  
(H20→H21：連携研究者)

(3) 連携研究者

田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)  
京都大学・再生医科学研究所・教授  
研究者番号：50211371