

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19750134
 研究課題名 (和文) ナノ粒子固定化リン酸オクタカルシウム担体による骨再生遺伝子治療法の開発
 研究課題名 (英文) Nanoparticle immobilized octacalcium phosphate scaffolds for bone regeneration
 研究代表者
 穴田 貴久 (ANADA TAKAHISA)
 東北大学・大学院歯学研究科・助教
 研究者番号：30398466

研究成果の概要：

本研究は、骨再生用担体材料 (リン酸オクタカルシウム;OCP) の開発および OCP と遺伝子導入法を一体化することにより、これまでにない迅速で安全性の高い新規骨再生遺伝子治療法の開発を行うことを目的とした。二年間の研究期間において OCP とアテロコラーゲンを複合化した OCP/Collagen 担体を作製と担体表面に特異的に吸着するナノ粒子の検討を行った。これまでにナノ粒子の作製に成功し、担体への吸着法を確立した。また、OCP 及び OCP/Collagen 担体の骨再生担体としての基礎的知見を得ることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：再生医工学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体機能材料

1. 研究開始当初の背景

疾病や事故などによる大きな骨欠損の再建・修復には自家骨移植が多く行われているが、骨採取部位への外科的侵襲と採取量に限界があることが問題点である。そのため、自家骨に代わる人工骨再生担体の開発に対するニーズは非常に高い。人工材料としてヒドロキシアパタイト (HA: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) やβ-リン酸三カルシウム (β-TCP: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) は骨親和性に優れており、すでに臨床に用いられているがこれらの既存材料は吸収が遅く、自家骨に比べて

骨再生に長時間を要することが問題点である。我々のグループは、これまでOCPに着目し研究を進めている。これまでに我々は、合成OCPが骨再生担体として既存材料であるHAやβ-TCPよりも優れた骨再生能を有することを見出している。さらに、OCPとコラーゲンを複合化することで生体適合性が向上し、OCPのみ、コラーゲンのみの場合やHA/コラーゲン担体よりも迅速に骨再生を促すことがわかっている。

2. 研究の目的

本研究はこれまでの骨再生医療の問題点の改善、さらに OCP/コラーゲン担体のさらなる機能向上をドラッグデリバリー法と組み合わせることで達成することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) OCP の骨芽細胞分化促進能について *in vitro* 細胞培養系において評価を行った。OCP の用量を変化させて 48 ウェル培養プレートの底面にコーティングを行った。そこへ骨芽細胞様細胞 ST2 を播種し、細胞増殖を測定した。また、骨芽細胞分化の指標であるアルカリホスファターゼ活性、その他分化マーカーの発現を *realtime PCR* を用いて定量した。比較として市販 HA を用いた。

(2) OCP/コラーゲン担体の骨再生のについて基礎的評価を行った。コラーゲンと混合する OCP の量を変化させて、複合体を作製し、*in vitro* 細胞培養試験及び *in vivo* 骨再生試験を行った。

(3) リン酸カルシウム (CaP) に結合するリポソームを合成し、実験を行った。このリポソームの基礎データの収集を行った。

CaP 結合部位を有する新規脂質 (BPA) を合成した。BPA と脂質分子である DLPC とコレステロールを混合することで CaP 結合性リポソームを調製した。リポソームの平均粒径及びゼータ電位の測定を行った。リポソームの CaP への結合能を調査した。リポソーム内へモデル薬剤としてドキシソルピシン (DOX) を内包し、その効率を調べた。

4. 研究成果

(1) OCP の骨芽細胞分化への影響

図 1 に OCP または HA コーティングプレートに播種した ST2 細胞の増殖曲線を示す。

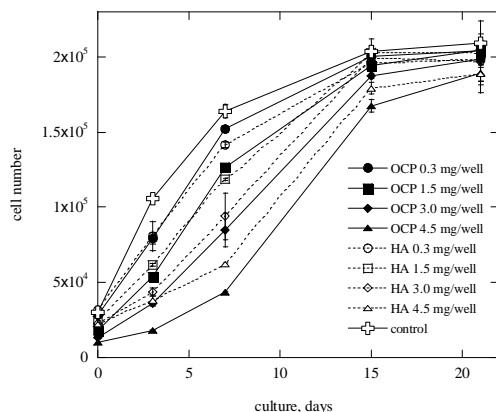


図 1. OCP, HA コーティングプレート上に播種した ST2 細胞の増殖曲線。

OCP コーティングプレートにおいては、培

養初期に他のプレートと比べて細胞数が少なかった。培養中期から後期では、他のプレートとほぼ同様の細胞数まで増殖した。

図 2 に ALP 活性に対する OCP 用量依存性を示す。

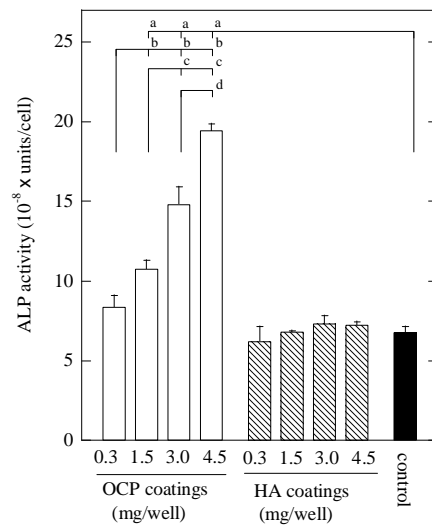


図 2. ST2 細胞の ALP 活性に対する OCP 及び HA の用量依存性。21 日間培養。

図 2 に示すように、OCP コーティング状態で 21 日間培養すると ALP 活性が OCP 用量依存的に高くなることが観測された。HA ではこのような用量依存性は観測されず、OCP では、最大でコントロール (非コーティングプレート) に対して約 3 倍の活性を示した。また、I 型コラーゲン、ALP、オステリクスの発現も OCP 用量依存的に高くなることがわかった。以上の結果から、OCP は培養初期において、細胞増殖を抑制するが、骨芽細胞分化を用量依存的に促進することが確かめられた。

(2) OCP/コラーゲン担体の骨再生

図 3 に作製した OCP/コラーゲン担体のマクロ写真を示す。

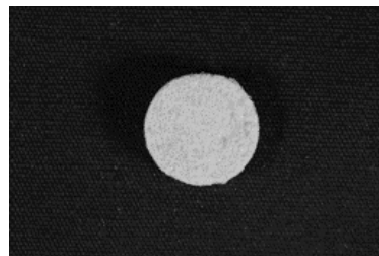


図 3. OCP/コラーゲン担体のマクロ写真。

OCP 単独では、粉体であり、形態付与が難しいが、コラーゲンと混合し、凍結乾燥後に架橋反応を行うことで、骨欠損部に適した形状にすることができる。本研究では、OCP

用量を変化させて複合体を作製した。

図3にOCP/コラーゲン複合体のOCP割合を変化させたときの、ラット頭蓋冠規格化骨欠損部における新生骨量の比較を示す。

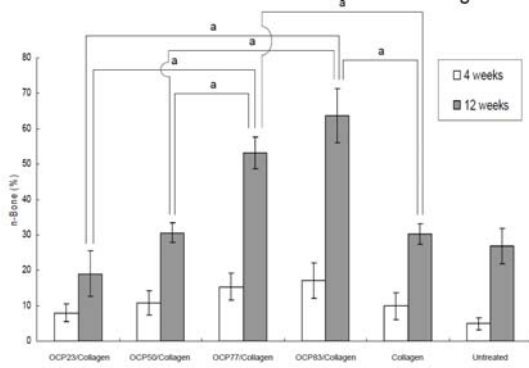


図4. ラット規格化骨欠損部に埋入したOCP割合の異なるOCP/コラーゲン複合体による骨再生能の比較。

図4に示すように、複合体中のOCPの割合が増加するに伴い、骨新生量が増加した。これはコラーゲンが細胞の接着、増殖を促進することに加えて、OCPの骨芽細胞分化を促進したためであると考えられる。

(3) リン酸カルシウム (CaP) に結合するリポソーム

リポソームの平均粒径は約100 nmであった。BPA量を変化させたときのゼータ電位変化及びDOX内包率変化を図5に示した。負電荷を有するBPAの含有量を増やしていくと、リポソームのゼータ電位が負電荷側に大きくなり、合成したBPAが効率よくリポソームに取り込まれることが示された。

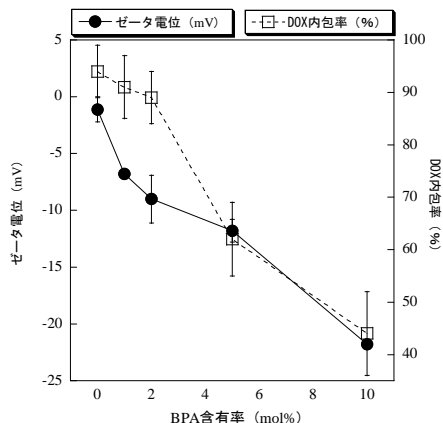


図5. リポソーム中のBPA含有量を変化させたときのゼータ電位変化及びDOX封入効率の変化。

調製した全てのリポソームはDOXを内包

することができたが、BPAの割合が高くなると(5, 10 mol%)内包率が低下することがわかった。これは、BPA含有量が高いリポソームは表面負電荷が大きく、DOXとの静電的相互作用が強くなることでリポソーム内水相への取り込みが阻害されたためであると考えられる。

また、図6にBPA含有量を変化させたときのHA吸着割合の変化を示した。

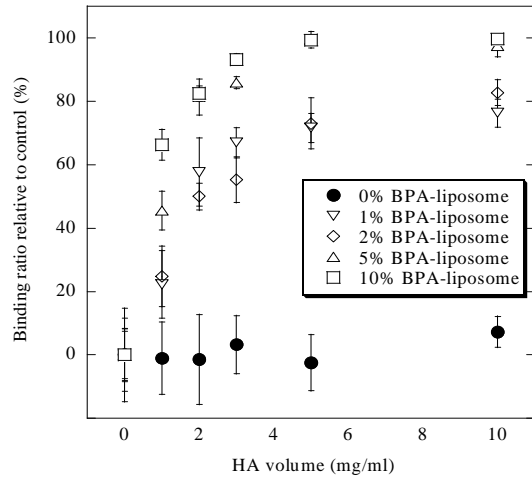


図6. BPA含有量を変化させたリポソームのHAへの吸着割合の変化。

図6に示すように、リポソームのHAへの吸着実験により、リポソーム中のBPA含有量を増やしていくと、HAへの親和性が高くなることがわかった。

以上のように、リン酸カルシウム担体と複合化するためのCaP結合性リポソームの合成に成功した。このリポソームは、リン酸カルシウムに高い親和性を有し、薬剤を内包できることが確かめられた。

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2件)

(1) T. Kawai, T. Anada, Y. Honda, S. Kamakura, K. Matsui, A. Matsui, K. Sasaki, S. Morimoto, S. Echigo, O. Suzuki (2009) Synthetic octacalcium phosphate augments bone regeneration correlated with its content in collagen scaffold. *Tissue Eng Part A* 15, 23-32. 査読有り

(2) T. Anada, T. Kumagai, Y. Honda, T. Masuda, R. Kamiyo, S. Kamakura, N. Yoshihara, T. Kuriyagawa, H. Shimauchi, O. Suzuki. (2008) Dose-Dependent Osteogenic Effect of Octacalcium Phosphate on Mouse Bone

Marrow Stromal Cells. *Tissue Engineering* 14, 965-978.査読有り

〔学会発表〕(計2件)

(1) 穴田貴久、武田陽一、櫻井和朗、鈴木治、リン酸カルシウムに特異的に結合するリポソームの合成と応用, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008, 2008年11月17-18日, 東京

(2) T. Anada, T. Kumagai, Y. Honda, S. Kamakura, H. Shimauchi, O. Suzuki, Osteoblastic cell differentiation of mouse bone marrow stromal cells on synthetic octacalcium phosphate. The seventh Asian Bioceramics Symposium 2007, 2007年9月26-28日, 大阪

〔図書〕(計1件)

T. Anada, H. Imaizumi, S. Kamakura, and O. Suzuki, (2007) Biodegradable synthetic octacalcium phosphate bone substitute. *Environmental Biodegradation Research Focus*, Nova Science Publishers Inc. 259-271.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-kiso.dent.tohoku.ac.jp/cfe/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

穴田 貴久 (ANADA TAKAHISA)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 30398466