

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09124

研究課題名(和文) 生体吸収性・良操作性・骨再生能を持つ多機能骨髄止血材の開発

研究課題名(英文) Development of a novel biodegradable bone regenerative hemostatic waxy 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまでに創出したポリカプロラクトン(PCL)と骨再生誘導ペプチドによる新規生体吸収性ボーンワックスの品質や操作性向上のための改良を行なった。骨補填材のβ-TCPまたはハイドロキシアパタイトをPCLに混合することで手袋付着が低減した。bone wax材料表面にペプチドを被覆し、かつ骨芽細胞の増殖と分化能を向上させるペプチド配列を新たに取得した。また、電子線滅菌による分子量低下はほとんど見られず、冷暗保存状態では数ヶ月は品質が保持されていることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在臨床で用いられている骨髄止血剤(ボーンワックス)は非分解性・非生体吸収性であるため、生体内残存による骨癒合・治癒障害や術後感染等の合併症を助長する可能性がある。さらに骨癒合・再生の遅延は術後の社会復帰を妨げ、患者のQOLに影響を及ぼす。本研究では、新規生体吸収性ボーンワックスの精密再設計を行い、さらなる分解能や骨再生能向上を図り製品化を目指した。従って、本研究で得られた成果は学術的意義および社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The investigation of this study was to improve the quality and operability of a new bioabsorbable bone wax using polycaprolactone (PCL) and bone regeneration-inducing peptides which were created in our previous study. By mixing β-TCP or hydroxyapatite with PCL, the adhesion to gloves was reduced. We discovered a newly acquired peptide sequence that covers the surface of bone wax material and improves the proliferation and differentiation ability of osteoblasts. It was also found that there was no decrease in molecular weight due to electron beam sterilization, and the quality of the bioabsorbable bone wax was maintained for several months when stored in a cool and dark place.

研究分野：医学

キーワード：骨髄止血剤 生体吸収性 ポリマー ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

心臓外科手術では心臓に到達・露出するために一般的には胸骨正中切開が必要であるが、胸骨切断面の骨髄からの出血は、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。一般的にその止血には、ミツロウを主成分としたボーンワックスを骨切断面にパッキングすることによる物理的な止血法が採用されているが、ボーンワックスは非分解性で、残存により胸骨癒合を妨げ、術後の炎症惹起や感染源にもなりうる<sup>1</sup>。近年、米国では縦隔炎予防の観点からボーンワックスの胸骨切断面への使用について、*class III recommendation* とし、推奨しないことを報告している<sup>2</sup>。また、胸骨癒合・再生の遅延は術後の早期社会復帰妨げ、特に高齢者の場合、患者の QOL に著しく悪影響を及ぼすことから、新たな骨髄止血剤の創出が求められている。

従来のポリカプロラクトン(PCL)やポリ乳酸(PLA)など生体吸収性ポリマーは、弾性率が数百 MPa と硬い物質であり、骨髄止血剤として応用するには手術操作性は不良である。そこで、研究分担者の荏原、宇都ら(独立行政法人 物質・材料研究機構 MANA-ナノライフ分野)は、独自技術で PCL の分子量・分岐数、ポリ D,L-乳酸(PDLLA)やハイドロキシアパタイト(Hap)との混合比などを精密に設計することで柔軟性や分解スピードを変化させ<sup>1</sup>、生体温度領域で適度な柔軟性を示し、ボーンワックスに似た操作性を持つポリマー基材：PCL-PDLLA-Hap による新規骨髄止血材を創出した<sup>2</sup>。

さらに、新規ポリマー基材の骨再生能を高めるため、骨分化に関するタンパクとして Bone morphogenetic proteins (BMPs) のアミノ酸配列に着目し、独自技術「ハイスループットペプチドアレイ細胞アッセイ(PIASPAC)法<sup>3</sup>による骨再生促進ペプチドの探索を行った。骨の再生促進に必要な細胞(骨芽細胞、間葉系幹細胞)に対して選択的に増殖・骨分化を促し、再生促進を阻害する細胞(線維芽細胞)に対しては増殖を抑制する「細胞選択的な骨再生促進ペプチド TLVNSVNSK」を発見した<sup>4</sup>。

PCL-PDLLA-Hap と骨再生促進ペプチドを混合し、新規生体吸収性骨髄止血材を作製した。この材料の効果を検証するため、ウサギ脛骨骨欠損モデルおよびウサギ胸骨正中切開モデルを用いて評価した。ペプチドを含まない PCL-PDLLA-Hap (non-pep wax) およびペプチドを含む PCL-PDLLA-Hap (pep wax) は、ボーンワックスと同様に物理的止血操作で止血することができた。また、pep wax は、胸骨の骨強度が最も高くなり、早期に骨再生が誘導された<sup>2</sup>。このことから、新規生体吸収性骨髄止血材料の有用性が示されたが、臨床応用を目指すうえで以下の課題が挙げられた。PCL 品質：加水分解を受けるため、保存状態や期間、滅菌によって分子量低下やポリマー表面特性変化(親水・疎水度、液体接触角)が生じることが判明した。分子量が低下すると、物理特性が変化する。すなわち、粘性や手触り、操作性に影響を及ぼす。

### 課題

- (1) PCL 品質：加水分解を受けるため、保存状態や期間、滅菌によって分子量低下やポリマー表面特性変化(親水・疎水度、液体接触角)が生じることが判明した。分子量が低下すると、物理特性が変化する。すなわち、粘性や手触り、操作性に影響を及ぼす。
- (2) ハイドロキシアパタイト：粒径が骨分化誘導に影響することや、含有量によって残存粉末が生じ、炎症を惹起させることがある。安全性を考慮し、生体吸収性の骨補填材  $\beta$ -TCP でも検討が必要である。
- (3) ペプチド：ポリマーにペプチドを混合することにより骨再生促進効果が得られたが、ポリマー材料表面の物理化学的特性(疎水性や電荷など)は細胞に影響を与える。したがって、材料表面の改質や、それによる骨芽細胞への影響を検討しなければならない。

新規生体吸収性骨髄止血材の臨床応用を目指すにあたり、これらの条件を最適化することが必要であると考えた。

## 2. 研究の目的

これまでの研究で、生体吸収性ポリマーと機能性ペプチドによる「新規骨髄止血材料」の可能性を示唆してきたが、臨床応用にはポリマー・ペプチドの設計に関する検討が不十分で改善する必要があることが分かった。本研究では、今まで得た知見をもとに、ポリマー物性やペプチド鎖を新たに緻密設計し、操作性や骨再生のさらなる向上を目指した骨髄止血材の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) 生体吸収性ポリマーの品質や操作性向上のための構造改良として、骨補填材として利用されている  $\beta$ -Tricalcium Phosphate ( $\beta$ -TCP) を用いて手袋付着性を調べた。また、滅菌方法をオートクレーブから電子線滅菌に変更し、滅菌前後の分子量変化を調べた。
- (2) Hap は粒径が骨分化誘導に影響することから、Hap の粒径による骨分化誘導能差を調べた。また、P(CL-DDLA)-Hap-peptide 細胞毒性を調べた。
- (3) 材料表面の物理化学的特性(疎水性や電荷など)は細胞に影響を与えることから、ペプチドによる生体吸収性ポリマー材料界面設計を行い、材料表面の物理化学的特性による細胞への影響を調べた。また、材料表面へのペプチド被覆のための条件検討および被覆量の定量化技術の開発を行った。

### 4. 研究成果

- (1) PCL や PDLA は加水分解を受けるため、保存状態や期間、滅菌によって分子量が低下し、ポリマー表面特性(親水・疎水度、液体接触角)に変化が生じることが判明した。物理特性の変化は、粘性や手触り、手術操作性に影響を及ぼすことから、ポリマー構造改良を行った。PCL-PDLA に  $\beta$ -TCP を複合し、分子量や  $\beta$ -TCP の粒径、複合割合の条件最適化したところ、市販ボーンワックスに似たテクスチャーでありながら低手袋付着性で、物理的止血が可能であった。また、電子線滅菌による分子量の低下はみられず、冷暗保存状態では数ヶ月は品質が保持されていることがわかった。
- (2) Hap の粒径サイズを変え、 $\mu\text{m}$  と  $\text{nm}$  の 2 種類を用いて間葉系幹細胞から骨分化誘導培養を行った。 $\text{nm}$  サイズの Hap に比べ、 $\mu\text{m}$  サイズの Hap で骨分化が促進された。また、PCL-PDLA-Hap-peptide の安全性試験を行ったところ、毒性を示さないことがわかった。一方で、市販ボーンワックスでは中程度の毒性を示した。
- (3) 20 種類のアミノ酸から同アミノ酸を 3 残基に配列したペプチド(例:GGG や AAA など)をアレイ上に固定し、固定化ペプチドアレイを作成した。固定化ペプチドアレイでは、アミノ酸配列により骨芽細胞の細胞接着や細胞伸展に変化がみられた。また、骨芽細胞のミトコンドリア活性もみられた。細胞応答クラスターを物理化学的特性値指標で分類すると、材料表面の物理化学的特性は細胞の応答を制御できる可能性が示唆された。次に bone wax 材料表面のペプチド被覆のための条件検討では、改良 BCA 法によって被覆ペプチドを定量化する条件を見出すことに成功した。しかしながら、DOPA によるペプチド被覆技術では配列によってポリ DOPA 化が生じやすく、また、ペプチド配列によってはペプチドの積層化が生じてしまうことが判明した。そのため、積層化が少ない「安定被覆が可能な配列」を新たに見出すことが求められた。そこで、生体内タンパク質に存在する 3 残基配列を探索するため、高可溶性かつ ECM プロテインにも存在比の多い配列約 80 種類を *in silico* で絞り込んだのち、*in vitro* スクリーニングを行ったところ、骨芽細胞の増殖と分化能を向上させるペプチド配列とその組合せを 2 種類発見した。

### 参考文献

1. Schonauer C, et al. The use of local agents: bone wax, gelatin, collagen, oxidized cellulose. *Eur Spine J.* 2004;13:S89.
2. Lazer H, et al. Prevention and management of sternal wound infections. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2016;152:962.
3. Uto K, et al. Design of super-elastic biodegradable scaffolds with longitudinally oriented microchannels and optimization of the channel size for Schwann cell migration. *Sci Technol Adv Mater.* 2012;13:064207
4. Ohno T, et al. Development of novel waxy bone haemostatic agents composed of biodegradable polymers with osteogenic-enhancing peptides in rabbit models. *Interdiscip Cardiovasc Thorac Surg.* 2023;37:ivad170.
5. Kato R, et al. Peptide array-based interaction assay of solid-bound peptides and anchorage-dependant cells and its effectiveness in cell-adhesive peptide design. *J Biosci Bioeng.* 2006;101:485-95.
6. Kanie K, et al. Screening of Osteogenic-Enhancing Short Peptides from BMPs for Biomimetic Material Applications. *Materials* 2016;9:730.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ohno Tsukasa, Suenaga Hiroto, Yamawaki-Ogata Aika, Kanie Kei, Kato Ryuji, Uto Koichiro, Ebara Mitsuhiro, Ito Hideki, Narita Yuji, Usui Akihiko, Mutsuga Masato	4. 巻 37
2. 論文標題 Development of novel waxy bone haemostatic agents composed of biodegradable polymers with osteogenic-enhancing peptides in rabbit models	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Interdisciplinary CardioVascular and Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/icvts/ivad170	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 -

〔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
研究分担者	荻原 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	宇都 甲一郎 (UTO Koichiro) (30597034)	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・独立研究者  (82108)	
研究分担者	加藤 竜司 (KATO Ryuji) (50377884)	名古屋大学・創薬科学研究科・准教授  (13901)	
研究分担者	成田 裕司 (NARITA Yuji) (60378221)	名古屋大学・医学系研究科・准教授  (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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	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)	近畿大学・工学部・准教授    (34419)	

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