

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592489

研究課題名（和文） 顎骨再生と腫瘍制御機構を兼ね備えた細胞応答型 DDS 担体の開発

研究課題名（英文） Development of the cell-responsive DDS carrier suitable for bone formation and anti-cancer effects

研究代表者 柏崎 晴彦 (KASHIWAZAKI HARUHIKO)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：10344516

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、1) 顎骨再生に必要な強度と生分解性をもつキトサン・HAP ナノ複合体の作製および最適化を行い、2) 生理活性因子や薬剤（抗がん剤等）の固定および徐放化技術を開発し、3) DDS 担体の生物学的効能や安全性を実証し、顎骨に浸潤する口腔がんを制御する新しい細胞応答型 DDS 担体を開発することである。本研究において、下記の結果が得られた。

1. キトサン・HAP ナノ複合体の作製・最適化

顎骨再生の際には、生体適合材料の強度を保ちながらの分解速度の制御が重要な課題となる。そこで、生分解性のコントロールを、脱アセチル化度制御やナノ繊維化加工、複合素材形成などの技術を利用して確立し、顎骨再生に適した物性を得た。

2. 生理活性因子や薬剤（抗がん剤等）の固定および徐放化(DDS)技術の開発

キトサン・HAP ナノ複合体の移植材料としての適用性を検討した。この素材の微結晶表面積は膨大であるため、生理活性因子や薬剤の徐放材料として期待できる。BMP-2 を含浸させ、ラット頭部に移植すると骨形成がみられた。これはキトサン・HAP ナノ複合体が生理活性因子の徐放担体としての有効であることを示唆している。

3. HOX 遺伝子導入がん細胞の細胞生物学的解析

口腔扁平上皮がんの悪性度と脱リン酸化酵素 PRL-3 の発現レベルとの間に相関関係があることを見出した。大腸がんおよび肝細胞がんの HOX 遺伝子の発現パターンを解析し、HOXD8 が大腸がんの肝転移に対して抑制的に働く可能性があることを見出した。今後、HOX 遺伝子を指標とした細胞応答型 DDS 担体の作製を検討したい。

研究成果の概要（英文）：

The objective of this study was to develop chitosan/ hydroxyapatite (HAp) composite suitable for jaw regeneration, develop DDS technology for growth factors, and estimate bone formation and anti-cancer effects of the composites. By using the co-precipitation and porogen-leaching method, we developed a novel chitosan/HAp composite with various porosities, which was found to be mechanically flexible and easily formed into any desired shape. The composites with rhBMP-2 resulted in active bone formation. These results suggested that the composite was an effective material as a DDS carrier. Misexpressions of PRL-3 genes are implicated in the development of oral SCC. We hypothesized that the misexpression of *HOX* genes was associated with carcinogenesis and malignant progression. We plan to develop DDS materials which will act in the response with *HOX* genes expressions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：顎骨再生, DDS 担体, 歯学

1. 研究開始当初の背景

口腔がんは、しばしば顎骨に浸潤し、さらに進行すると転移し命を脅かす。顎骨に浸潤した口腔がんの標準的な治療法は手術による顎骨切除であるが、しばしば再発し患者のQOLを著しく低下させる。そのため「抗腫瘍効果」と「骨再生効果」を持ちあわせた生体材料を開発し、口腔がん術後の顎骨欠損部に補填して口腔がんの再発を防ぐ治療法の確立が求められている。

申請者達は、これまでに水溶液を用いた穏やかな合成条件下での共沈法(Soft nano-technology)により、北海道産カニ甲羅由来のキトサンとHAP結晶をナノレベルで複合化し、新規の骨再生足場材料を合成することに成功した(J Biomed Mater Res, 55: 20-27, 2001)。図1のように、この新規のナノ複合材料は複雑な形態を呈する顎骨の再生に適した物性(高い弾力性, 操作性)をもつことを示した(北海道歯誌, 28: 6-15, 2007)。また、ラット皮下に移植したところ、新生骨を誘導し骨再生足場材料になることが明らかになった(Biomed Mater Eng, in press)。

一方、口腔がんの分子生物学的な解析が進み、遺伝子発現プロファイルにより特徴的な遺伝子発現パターンが発がんや悪性進展に関連することが解明しつつある。なかでも申請者達は、発生過程において細胞に位置情報を与えるホメオボックス遺伝子群に注目し、その発現異常とがん化あるいは浸潤・転移との関連性を解析してきた。その結果、そのひとつのファミリーで形態形成のマスター因子として知られているHOX遺伝子群(39個のHOX遺伝子からなる)の発現パターンが、口腔扁平上皮がんおよび白板症などの異形性組織では異常であることを見出し、世界にさきがけ発表した(Oncol Res, 6: 217-24, 2006)。この結果は、口腔がんの診断や治療においてHOX遺伝子が標的分子として有用であることを示唆している。HOX遺伝子を標的

分子として抗がん剤を徐放するようなDDS機能(Drug Delivery System:細胞に応答して薬剤を徐放)をもつマトリックスができれば、口腔がん術後の再発を防ぐ治療法につながる。本研究の目的は、申請者達が開発した骨再生足場材料にDDS機能を付与し、顎骨に浸潤する口腔がんを制御する新しい骨再生・抗がん性マトリックスを開発することである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1)顎骨再生に必要な強度と生分解性をもつキトサン・HAPナノ複合体の作製および最適化を行い、2)生理活性因子や薬剤(抗がん剤等)の固定および徐放化技術を開発し、3)DDS担体の生物学的効能や安全性を実証し、顎骨に浸潤する口腔がんを制御する新しい細胞応答型DDS担体を開発することである。

3. 研究の方法

(1)キトサン・HAPナノ複合体の作製・最適化

顎骨再生の際には、生体適合材料の強度を保ちながらの分解速度の制御が重要な課題となる。そこで、生分解性のコントロールを、脱アセチル化度制御やナノ繊維化加工、複合素材形成などの技術を利用して確立することで、安価な原材料から高度な機能を持つ、骨再生をはじめ各種分野に利用可能な生体適合材料を生み出す技術を確立する。すでに細胞や血管新生に必要なスペースをマトリックス内部に付与した多孔性キトサン・HAP複合体の開発に実験室レベルでは成功しており(特許出願中)、各種因子の固定化やDDS担体としての最適な詳細な加工条件等を詳細に検討していく。次に、様々な条件で作製した複合体上に骨芽細胞を培養後、その細胞よりRNAを抽出し、マイクロアレイ法により骨形成およびアポトーシスに関連する遺伝子発現を解析する。その結果を指標に複合

体の最適化を行う。

(2) 生理活性因子や薬剤（抗がん剤等）の固定および徐放化(DDS)技術の開発

申請者達はこれまでにラミニンペプチドなどの生理活性因子をキトサンチューブに固定する技術を開発し、これが神経再生促進に有効であることを基礎実験で明らかにした(J Biomed Mater Res, 73: 375-82, 2005). この固定化技術を応用すればマトリックス内部に生理活性因子や抗がん剤などの薬剤を導入させることが可能である。細胞の遺伝子発現などを分子生物学的に解析し、選択的な生理活性因子や薬剤の固定・徐放化技術を開発する。また、生理活性因子や薬剤の立体構造情報等をもとに効率的な徐放化方法を検討する。

(3) HOX 遺伝子導入がん細胞の *in vitro* における細胞生物学的解析

臨床検体の口腔扁平上皮がんにおいて発現異常のみられた HOXA1 および C6 遺伝子の細胞生物学的性質を培養口腔がん細胞において調べる。HOXA1 および C6 遺伝子の発現ベクターを作製し、それらの過剰発現させた細胞を用いて、下記のごとく骨組織への浸潤性を調べる。

- ・細胞外マトリックス成分（フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、コラーゲン）に対する接着性
- ・細胞運動性
- ・がん細胞同士の凝集性

(4) DDS担体の生物学的効能や安全性の実証

①培養細胞による評価

DDS 担体上に骨芽細胞、がん細胞を培養後、その細胞より RNA を抽出し、マイクロアレイ法により骨形成およびアポトーシスに関連する遺伝子発現を解析する。その結果を指標に DDS 担体の最適化を行う。

さらに HOXA1, C6 遺伝子の高発現および低発現がん細胞を DDS 担体上で培養し、それらの細胞増殖性やアポトーシスを測定することにより、DDS 担体の抗腫瘍効果と HOX 遺伝子発現との関連性を評価する。

②動物実験による評価

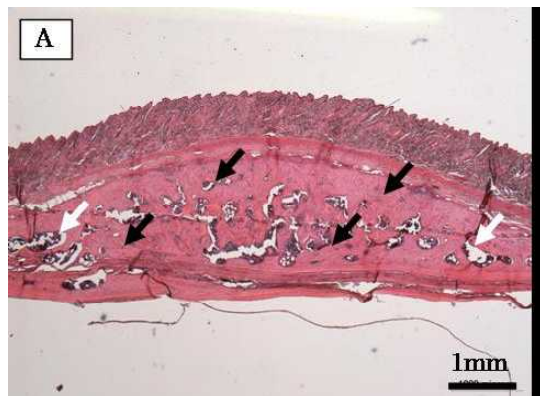
ラット等への移植実験により、生体親和性・生分解性・薬剤徐放性に関する評価、組織病理学的検査を実施して骨再生能およびがん細胞のアポトーシスを総合的に評価・実証する。これらの結果を相互にフィードバックして DDS 担体の最適化、実用化をめざす。

4. 研究成果

(1)キトサン・HAP ナノ複合体の作製・最適化
顎骨再生の際には、生体適合材料の強度を保ちながらの分解速度の制御が重要な課題となる。そこで、生分解性のコントロールを、脱アセチル化度制御やナノ繊維化加工、複合素材形成などの技術を利用して確立し、顎骨再生に適した物性を得た。

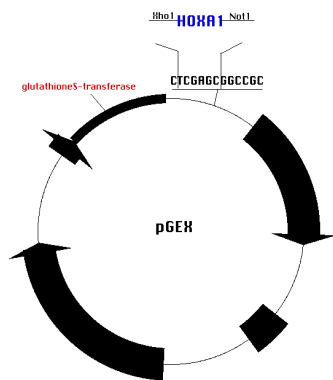
(2) 生理活性因子や薬剤（抗がん剤等）の固定および徐放化(DDS)技術の開発

キトサン・HAP ナノ複合体の移植材料としての適用性を検討した。この素材の微結晶表面積は膨大であるため、生理活性因子や薬剤の徐放材料として期待できる。BMP-2 を含浸させ、ラット頭部に移植すると骨形成がみられた(図 A)。これはキトサン・HAP ナノ複合体が生理活性因子の徐放担体としての有効であることを示唆している。



(3)HOX 遺伝子導入がん細胞の細胞生物学的解析

口腔扁平上皮がんの悪性度と脱リン酸化酵素 PRL-3 の発現レベルとの間に相関関係があることを見出した。大腸がんおよび肝細胞がんの HOX 遺伝子の発現パターンを解析し、HOXD8 が大腸がんの肝転移に対して抑制的に働く可能性があることを見出した。臨床検体の口腔扁平上皮がんにおいて HOX C6 遺伝子の発現異常のみられた。そこで HOXC6 が顎骨浸潤に関与しているのかどうかを調べるために TA クローニング法を用いてヒト HOXC6 発現プラスミドベクターを作製した。HOXC6 にはアイソフォームがあるので2種類のベクターを作った(図. アイソフォーム 1 と 2)。



現在、HOX 遺伝子を強制発現させた癌細胞の顎骨組織への接着性ならび骨芽細胞の培養上清に対する運動性などを検討している。

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 6 件)

① 原田尚樹, 柏崎晴彦, 赤澤敏之, 村田 勝, 相沢智康, 出村 誠, 田中順三, 飯塚 正, 井上農夫男. ラット頭頂骨骨膜下における rhBMP-2 添加多孔性キトサン/ハイドロキシアパタイト複合体による骨形成. 北海道歯誌, 32: 166-176, 2012. 査読有り.

② Kashiwazaki H, Yamaguchi K, Harada N, Akazawa T, Murata M, Iizuka T, Ikoma T, Tanaka J, Inoue N. *In vivo* Evaluation of a Novel Chitosan/ HAp Composite Biomaterial as a Carrier of rhBMP-2. *J. Hard Tissue Biology* 19(3): 181-186, 2010. 査読有り.

③ Yoshioka T, Onomoto H, Kashiwazaki H, Inoue N, Koyama Y, Takakuda K, Tanaka J. *In vitro and in vivo* characteristics of chitosan fiber modified by an alternate soaking process. *Mater. Trans.*, 50(6), 1269-1272, 2009. 査読有り.

④ Kashiwazaki H, Kishiya Y, Matsuda A, Yamaguchi K, Iizuka T, Tanaka J, Inoue N. Fabrication of porous chitosan/hydroxyapatite nanocomposites: their mechanical and biological properties. *Biomed. Mater. Eng.*, 19(2): 133-140, 2009. 査読有り.

⑤ Kashiwazaki H, Hassan NMM, Hamada J, Moriuchi T, Yamazaki Y, Tei K,

Totsuka Y, Inoue N. Gene Expression Profile Changes Correlated with Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Odontology*, 96: 38-43, 2008. 査読有り.

⑥ Hata, S., Hamada, J., Maeda, K., Murai, T., Tada, M., Furukawa, H., Tsutsumida, A., Saito, A., Yamamoto Y. and Moriuchi, T. *PAX4* has the potential to function as a tumor suppressor in human melanoma. *Int. J. Oncol.*, 33: 1065-1071, 2008. 査読有り.

〔学会発表〕(計 3 件)

① Kashiwazaki H, Harada N, Bone augmentation by onlay implant using porous chitosan /HAp nanocomposites with rhBMP-2 on rat parietal bone. 3rd Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry (2009.11.7-8, Hiroshima)

② 柏崎晴彦, 原田尚樹, 赤澤敏之, 村田勝, 飯塚正, 生駒俊之, 田中順三, 井上農夫男 キトサン/HAp 複合体の骨形成および吸収性に関する検討 第 23 回北海道骨粗鬆症研究会 (2011. 1. 15 札幌市教育文化会館 (札幌市))

③ 原田尚樹, 柏崎晴彦, 飯塚正, 村田勝, 赤澤敏之, 田中順三, 井上農夫男. 多孔性キトサン/HAp 複合体の機能設計とラット頭頂骨骨膜下の骨伝導 無機リン学会 (2010.10.7 京都国際会議場 (京都市))

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏崎 晴彦 (KASHIWAZAKI HARUHIKO)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：10344516

(2) 研究分担者

浜田 淳一 (HAMADA JUNICHI)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授
研究者番号：50192703

(3) 連携研究者

()

研究者番号：