

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18068

研究課題名(和文) 骨欠損治療のための薬物治療可能な骨再生能を持つ炭酸アパタイト粒子の創製

研究課題名(英文) Preparation of core-shell particles with bone regeneration for the treatment of bone defects.

研究代表者

小松 周平 (Komatsu, Syuuhei)

東京理科大学・先進工学部マテリアル創成工学科・助教

研究者番号：60843844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「骨欠損の治療を目指した薬物治療可能な骨再生能を持つ炭酸アパタイト粒子の作製」を目的とした。作製した粒子はシェルにCO3Ap、コアは生分解性高分子から構成されている。シェルに骨形成タンパク質、コアに疎水性低分子薬物をそれぞれ担持できた。内包した薬物は、骨リモデリング時のpHでのみ放出された。さらに、MC3T3E-1細胞を粒子存在下で培養すると、種々の骨芽細胞の分化マーカーの発現量が優位に増加した。さらにマウス背中にインジェクトし、新成骨の形成能力を評価すると、骨形成タンパク質と組み合わせた粒子は新成骨の形成が示唆された。以上より、作製した粒子は骨粗鬆症の治療への応用に期待ができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨欠損は、患者のQOLを著しく低下させる重篤な疾患である。骨欠損の治療材料には、薬物内包が可能、新生骨の形成を誘導できる能力、低侵襲性などの特徴を持つものが望ましい。本研究では、骨欠損の治療のための薬物内包可能な骨誘導能を持つ炭酸アパタイト粒子を作製した。作製した粒子は、骨へのインジェクトが可能、粒子の内部と表面にそれぞれ薬物を担持できた。さらに骨誘導能を示し、マウス背中で新成骨形成が示唆されている。そのため、骨欠損を薬物治療と再生を同時にできる材料として期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to fabricate carbonate apatite particles with drug-treatable bone regeneration potential for the treatment of bone defects. The prepared particles consisted of CO3Ap in the shell and a biodegradable polymer in the core. The shell and core were loaded with bone-forming proteins and hydrophobic low-molecular-weight drugs, respectively. The encapsulated drug was released only at pH during bone remodeling. Furthermore, when MC3T3E-1 cells were cultured in the presence of the particles, the expression levels of various osteoblast differentiation markers were predominantly increased. Furthermore, injecting the particles into the back of mice and evaluating their ability to form new bone suggested that the particles combined with osteogenic proteins formed new bone. These results suggest that the particles may have potential for use in the treatment of osteoporosis.

研究分野：生体材料学関連

キーワード：骨欠損治療 有機無機ハイブリッド 薬物放出 骨再生 薬物担体 感温性分解性高分子 液液相分離

1. 研究開始当初の背景

超高齢化が進む我が国では、骨欠損は重篤な疾患であり、患者数は増加すると予測される。骨欠損治療は炭酸アパタイト(CO₃Ap)などの材料により骨再生が行われている。CO₃Apは表面に骨形成タンパク質のBMP-2を付着でき、骨再生を誘導する魅力的な材料である一方、BMP-2は表面への付着であり、持続的な薬物放出が困難かつ欠損種に合わせた薬物治療が必要である。そのため薬物を徐放可能で骨再生能を持つ材料が必要となる。我々は、薬物内包できる高分子層をコア、炭酸カルシウム(CaCO₃)をシェルに持つCaCO₃カプセルを報告している。このカプセルは高分子とCaCO₃を混合させ、結晶成長のみで作製できるが、CaCO₃は骨再生能力が乏しい。そこでCaCO₃をリン酸化させ、CO₃Apに変化させることで、骨再生能力の付与ができると考えた(Fig. 1)。さらにカプセル設計の利点は任意にシェルを変更できる点であり、CO₃Apに加えて単独で骨誘導能を示す炭酸ストロンチウム(SrCO₃)も利用できると考えた。

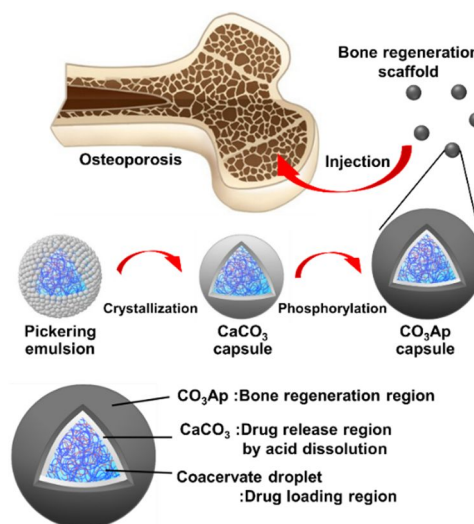


Figure 1 Scheme for illustration of CO₃Ap capsules made from degradable coacervate droplets.

2. 研究の目的

本研究では、「骨欠損の治療を目指した薬物治療可能な骨再生能を持つ炭酸アパタイト粒子の作製」を目的とする。

3. 研究の方法

高分子水溶液にCaCO₃、1.0 mol/L CaCl₂を加え、30°Cで2h攪拌し、Pickering emulsionを調製したのちCaCO₃を結晶成長させカプセルを得た。その後0.5 mol/Lリン酸水素二ナトリウム水溶液にカプセルを浸漬しリン酸化を行い、CO₃Apカプセルを調製した。調製したカプセルを、BMP-2含有PBSに浸漬させ、BMP-2を付着させた。MC3T3-E1細胞をCO₃Apカプセル存在下で所定時間培養し、骨分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)、オステオカルシン(OCN)、オステオポンチン(OPN)、コラーゲンType I(Col)の発現量を定量し骨再生能を評価した。さらにシェルの変更を行うため、SrCl₂中でPickering emulsionを結晶成長させ、SrCO₃カプセルを調製した。

4. 研究成果

作製したCaCO₃カプセルは球状であり、内部に高分子濃厚層、シェルにCaCO₃を有していた(Figure 2a)。CaCO₃カプセルをリン酸化させ、表面がCO₃ApのCO₃Apカプセルを作製した(Figure 2b)。CO₃ApカプセルのXRD測定により、CO₃Ap由来のピークが確認でき、リン酸化時間に伴い、ピーク強度は増加した(Figure 2c)。さらに粒径もリン酸化時間で制御できた。次にCO₃Apカプセルへの薬物内包試験を行った。低分子薬物モデルのRhodamine B、モデルタンパク質のFITC-BSAを用いた。Rhodamine BとFITC-BSAを含有したPBS中にCO₃Apカプセルを浸漬させた結果、カプセル内部にRhodamine Bが内包され、カプセル表面にFITC-BSAが吸着した。すなわち低分子は内部、タンパク質は表面に担持した。続いて、BMP-2を吸着させた結果、76.4 μg/g-capsulesとなり、吸着効率率は96%程度であった。以上より、複数薬物の同時担持が可能であった。さらに、PBS(pH 7.4)

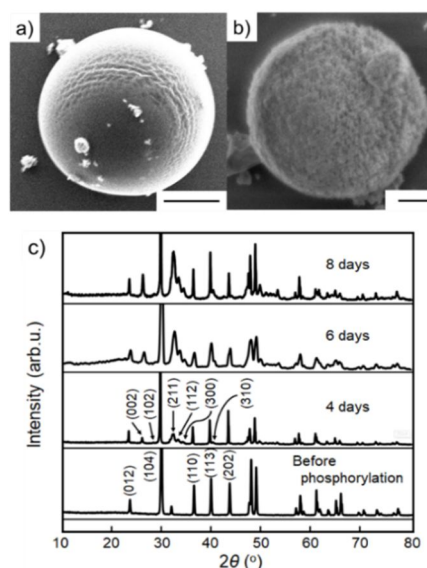


Figure 2 SEM image of (a) CaCO₃ capsules (scale bar is 10 μm) and (b) CO₃Ap capsules (scale bar is 2 μm). (c) XRD spectrum of CO₃Ap capsules.

中と骨リモデリング時の pH (4.5)において、モデル薬物の Rhodamine B と FITC-BSA の放出試験を行った結果、骨リモデリングの条件下でのみ薬物の放出が生じた。これは、酸性条件下におけるシェル表面の溶解により、BMP-2 は放出されたと考えられる。以上の結果より内包させた低分子薬物モデルは、骨リモデリング時にのみ放出が期待できる。

次に、MC3T3-E1 細胞を CO₃Ap カプセル存在下で培養し、骨形成マーカーの発現量を評価した。その結果、BMP-2 のみや CO₃Ap カプセルと比べて BMP-2 を付着させた CO₃Ap カプセルでは、OCN、OPN (Figure 3)の発現量が増加した。加えてコラーゲン

type1 の発現量を評価したところ、BMP-2 を付着させた CO₃Ap カプセルが多く発現していた。すなわち、骨再生に必要な能力が付与されていることがわかる。

マウス背中に作製したカプセルを注入し、異所性での骨吸収性を評価した。マウス背中に、生理食塩水、BMP-2、CO₃Ap カプセル、BMP-2 を付着させた CO₃Ap カプセルを注入し、3 か月後に CT スキャンを行った。その結果、BMP-2 を付着させた CO₃Ap カプセルのみ背中に存在しており、生体吸収が生じなかった。一方で CO₃Ap カプセルは生体吸収されることが分かり、BMP-2 を付着させた CO₃Ap カプセルが骨再生の材料として有用であることが示唆された。

ここで、作製したカプセルのシェルの種類を選べればシェルの能力を自在に制御できると考えられる。そこで、骨誘導能を持つと知られている Sr に着目し、SrCO₃ カプセルの作製を行った (Figure 4)。方法は Pickering emulsion の結晶成長を SrCl₂ 中で行うことで SrCO₃ カプセルを作製した。その結果、顕微鏡観察より、他のカプセルと同様に SrCO₃ カプセルの作製が可能であり、溶媒を SrCl₂ と CaCl₂ の混合溶媒にすることで、シェル中の Sr の導入量のコントロールが可能であった。以上のことから、作製したカプセルのシェルの組成は、Pickering emulsion の結晶成長時の条件により自在に選択できることが分かり、幅広い機能の付与が容易できると考えられる。

以上より、本研究で作製した有機-無機ハイブリッドカプセルは薬物内包・放出が可能であり、新生骨の形成を促すことができる骨再生足場の新規材料としての応用が期待できる。

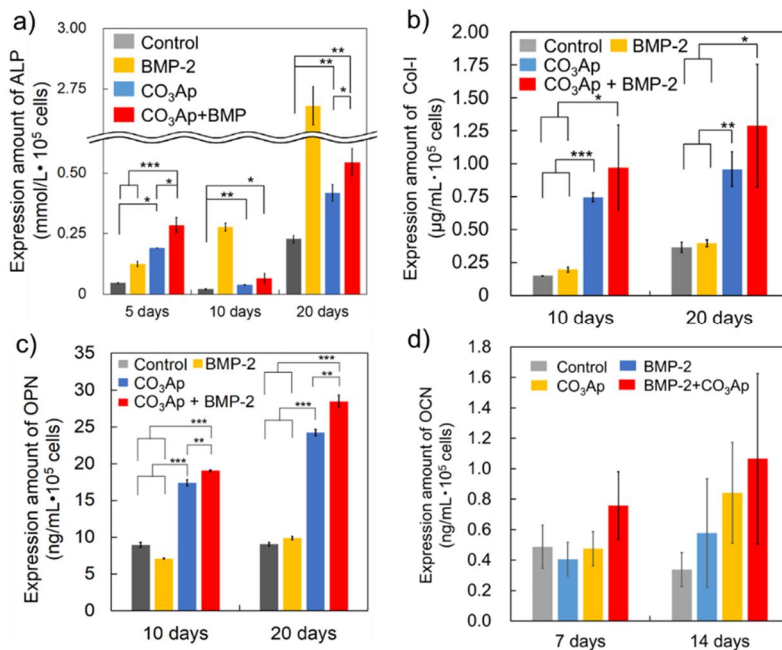


Figure 3 The expression level of osteogenic marker incubated with MC3T3-E1 cells (n=3, means±SD, **: p < 0.01, ***: p < 0.001). a) Alkaline phosphatase b) Collagen type I c) Osteopontin d) Osteocalcin

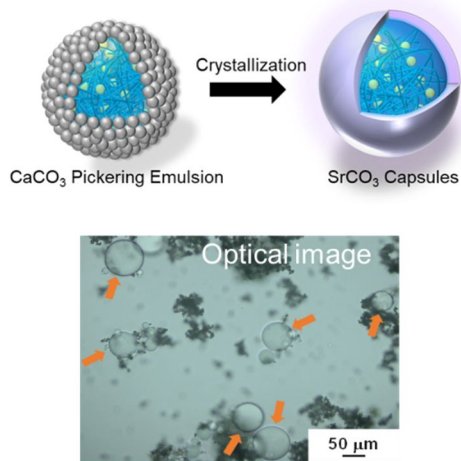


Figure 4 Schematic illustration of SrCO₃ capsules and microscopic image of prepared SrCO₃ capsules.

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 Komatsu Syuuhei	4. 巻 2022
2. 論文標題 Creation of carbonate apatite particles with drug treatable bone reproduction ability for bone defects treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 51 ~ 53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21820/23987073.2022.1.51	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15件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Syuuhei Komatsu, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi
2. 発表標題 Fabrication of dual drug loadable C03Ap particles for bone regeneration
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小松周平、安部秀平、麻生隆彬、菊池明彦
2. 発表標題 分解性高分子濃厚層をコアとする複数薬物担持C03Apカプセルの骨分化誘導能の解析
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水野佑哉、安部秀平、小松周平、菊池明彦
2. 発表標題 分解性感温性高分子コアセルベートとSrxCa1-xC03複合シェルからなるカプセルの調製
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小松周平、安部秀平、麻生隆彬、菊池明彦
2. 発表標題 薬物担持炭酸アパタイトカプセルが与える骨芽細胞への影響
3. 学会等名 第50回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小松周平、安部秀平、麻生隆彬、菊池明彦
2. 発表標題 薬物担持型炭酸アパタイト粒子の調製と細胞に与える骨誘導評価
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Syuhei Komatsu, Shuhei Abe, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi
2. 発表標題 Preparation of carbonate apatite capsules based on degradable coacervate and effect for osteoblast
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相川拓朗 小松周平 麻生隆彬 菊池明彦
2. 発表標題 複数の骨形成薬物担持可能なCO3Ap capsulesの骨形成能力の解析
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水野佑哉 小松周平 菊池明彦
2. 発表標題 生分解性コアセルベートからなるSrxCa1-xCO3カプセルの作製と骨誘導能の解析
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小松周平、麻生隆彬、菊池明彦
2. 発表標題 骨欠損治療のための薬物内包可能な有機-無機ハイブリッドカプセルの調製
3. 学会等名 無機マテリアル学会 第145回 学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 相川拓朗 小松周平 麻生隆彬 菊池明彦
2. 発表標題 複数の骨誘導薬物担持可能な炭酸アパタイトカプセルの骨形成能力の解析
3. 学会等名 第12回 CSJ化学フェスタ2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 相川 拓朗、小松 周平、麻生 隆彬、菊池 明彦
2. 発表標題 薬物担持可能な分解性コアセルベート液滴内包CO3Apcapsulesの骨形成能力の解析
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Syuuhei Komatsu, Takuro Aikawa, Shuhei Abe, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi
2. 発表標題 Preparation of carbonate apatite capsules based on degradable polymer-based coacervates and their osteoinductive effect on osteoblasts
3. 学会等名 The 5th International Union of Materials Research Societies International Conference of Young Researchers on Advanced Materials (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小松周平、麻生隆彬、菊池明彦
2. 発表標題 機能性高分子をベースとした有機-無機ハイブリッドマテリアルの開発
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第131回学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 相川拓朗、小松周平、麻生隆彬、菊池明彦
2. 発表標題 薬物担持可能な高分子-無機ハイブリッドカプセルの骨形成能力の解析
3. 学会等名 第71回高分子学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水野佑哉、小松周平、菊池明彦
2. 発表標題 生分解性コアセルベート液滴と $Sr_xCa_{1-x}CO_3$ シェルからなるカプセルの調製と物性評価
3. 学会等名 第71回高分子学会年次大会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------