

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390443

研究課題名(和文) NF- κ B デコイをバイオプロセッシングした新しい核酸医薬型人工骨の創製研究課題名(英文) Development of novel nucleic acid medicine artificial bone using bioprocessed NF- κ B decoy

研究代表者

久保 隆靖 (KUBO, TAKAYASU)

広島大学・大学病院・講師

研究者番号：60240876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：核酸医薬であるNF- κ B デコイを用い、破骨細胞を抑制および骨芽細胞の活性化を促進させるポリリン酸を新規で組み合わせた新規有用型人工骨の開発を目指した。in vitroの細胞実験においてNF- κ B デコイは顕著な破骨細胞の活性化を抑制したことをTRAP染色ならびにTRAP陽性細胞数測定にて確認した。また、ポリリン酸の骨芽細胞活性化も確認した。in vivoにおいて、ポリリン酸吸着人工骨およびNF- κ B デコイによる骨形成を促進する効果を確認した。これにより破骨細胞と骨芽細胞に作用する新規人工骨開発の有意な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop the newly useful artificial bone material combined the NF- κ B decoy which is known as nucleic acid medicine with the polyphosphoric acid reported that is restrained the osteoclasts and promoted the activity of the osteoblasts. It was clarified that the NF- κ B decoy was restrained strongly the activity of the osteoclasts in vitro by the TRAP staining and the measurement of TRAP positive cells. It was clarified also that the polyphosphoric acid was promoted the activity of the osteoblast in vitro. Furthermore, it was confirmed that the artificial bone with the polyphosphoric acid and the NF- κ B decoy was promoted the bone formation in vivo. In the results of this study, we were able to acquire the significant knowledge about the development of the newly artificial bone which is influenced both of the osteoclasts and the osteoblasts.

研究分野：補綴系歯学

科研費の分科・細目：歯学，補綴系歯学

キーワード：NF- κ B デコイ 連通多孔性アパタイト ESCA 骨髄由来破骨前駆細胞 TRAP RANKL 破骨細胞

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症のように破骨細胞が活性化している部位で骨再生を達成するためには、骨芽細胞と破骨細胞との両者を標的とする必要がある。

申請者は破骨細胞の分化因子として RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) を標的とした NF- κ B デコイの特性に着目した。この NF- κ B デコイは RANKL におとりとして結合し、その活性反応を抑制できる効果を持つ。また、骨再生ではその足場となる空間の確保も重要であることから、我々は多孔性アパタイトの各気孔がさらに連通している連通多孔性アパタイトに着目し、これまで研究を進めてきた。さらに、骨形成促進効果を持つポリリン酸にも注目し、ポリリン酸とバイオプロセッシングさせることで破骨細胞の制御と骨形成の促進が同時に確実に得られるのではないかと着想するに至った。

そこで申請者らは、連通多孔性アパタイトに NF- κ B デコイをバイオプロセッシングする全く新しい「核酸医薬型人工骨」の開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、破骨細胞を抑制する NF- κ B デコイを用いて、細胞レベルでの破骨細胞活性抑制効果の評価、ならび動物実験における骨再生促進効果を評価することにより、破骨細胞を標的とした核酸医薬型人工骨の有効性を明らかとすることである。

3. 研究の方法

研究は下記の通り 3 ステップで行った。

NF- κ B デコイの連通アパタイトへの吸着状態の観察

NF- κ B デコイ溶液に連通多孔性ハイドロキシアパタイト (IP-CHA) を浸漬させ、遠心分離後、スピードバック法により急速凍結乾燥させた。この操作により NF- κ B デコイ吸着アパタイトを製作し、走査型電子顕微鏡 (SEM) 像ならびトルイジン染色により吸着状態を観察した。さらに吸着デコイ量の溶出測定を行った。

NF- κ B デコイの破骨細胞活性抑制効果の検討

破骨細胞の活性化評価のためラット頭蓋骨から骨髄細胞を分離し RANKL およびマクロファージ活性化因子を添加し、破骨細胞へ分化させた。培養中に、NF- κ B デコイ添加群、ポリリン酸添加群、コントロール群に各条件設定を行い、TRAP 染色性ならびに TARP 陽性細胞数の測定を行い、破骨細胞活性抑制効果の試験を行った。また骨芽細胞活性化評価としてマウス骨芽細胞用細胞を用いて、培養中に NF- κ B デコイ添加群、ポリリン酸添加群、コントロール群に各条件設定を行い、アルカリフォスファターゼ活性およびオステオカルシン、オ

ステオポンチンの各タンパク発現量を測定した。

NF- κ B デコイ吸着人工骨の骨形成促進効果の評価

担体には円柱状連通多孔性ハイドロキシアパタイト (IP-CHA; 気孔率 75%, 焼結温度 1200 $^{\circ}$ C, 圧縮強度 12Mpa) をカスタムメイドにて準備した。この円柱状 IP-CHA をポリリン酸溶液および NF- κ B デコイ溶液に単独浸漬させることで薬剤を含浸させた下記

の骨移植材を準備した。

NF- κ B デコイ吸着 (10ng/ml) IP-CHA

ポリリン酸吸着 (1 μ g/ml) IP-CHA

IP-CHA, (コントロール群)

; ラット頭蓋骨およびラビット大腿骨で

の検討

全身麻酔下においてラット頭蓋骨およびラビット大腿骨に骨窩をそれぞれ形成し、準備したブロック型各移植材をそれぞれ埋入した。埋入後は吸収性系にて筋膜および粘膜での縫合を行い、感染予防のため抗菌剤を筋肉注射にて投与した。埋入から 2, 4 週後に動物から移植材を含む骨ブロックを採取し、通法にしたがい脱灰薄切標本を製作し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。組織学的評価として光学顕微鏡による観察および組織形態計測評価を行った。組織形態計測学的評価は以下の算定式により求めた。

・新生骨骨面積率 = IP-CHA 気孔内骨組織面積 / 気孔内総組織面積

; インプラント周囲骨欠損部における

GBR への検討

ビーグル・ラブラドル: ハイブドイヌの小白歯部を抜歯し、無歯顎堤の準備を行った。その無歯顎堤部にインプラントを埋入し、その頰側に人為的なインプラント周囲骨欠損を形成した。これを侵襲的炎症性骨欠損モデルとした。

この欠損部位に準備した顆粒型各移植材をそれぞれ埋入し、非吸収性メンブレンにて被覆し、吸収性系にて骨膜で縫合を行った。感染予防のため抗菌剤を筋肉注射にて投与した。埋入から 12 週後に動物から移植材を含む骨ブロックを採取し、通法にしたがい非研磨標本を製作し、トルイジンブルー染色を行った。組織学的評価として光学顕微鏡による観察および組織形態計測評価を行った。組織形態計測学的評価は以下の算定式により求めた。

・再生骨高径率 = 再生骨高径 / 欠損高径

・骨インプラント接触率 = インプラント骨接触長 / 欠損内インプラントスレッド長

4. 研究成果

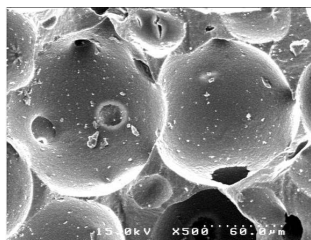
NF- κ B デコイの連通アパタイトへの吸着状態の観察

本研究で用いた吸着法に関して以下の様な方法を用いてデコイ吸着状態を確認した。

まず高分子体のトルイジンによる染色特性の比較において、吸着前後で肉眼的に容易に確認できるデコイの染色が観察された（図1）。SEM像の観察では、NF- κ Bデコイ吸着処理を行った条件でも連通多孔性ハイドロキシアパタイトの構造特性は保持されていた（図2）。溶出試験より吸着させたアパタイトからのNF- κ Bデコイの溶出は比較的早期に大部分が放出されることを確認した。



図 1



NF- κ B decoy/IP-CHA

図 2

NF- κ B デコイの破骨細胞活性抑制効果の検討

破骨細胞誘導試験において、NF- κ Bデコイ添加群はコントロール群に対して顕著な抑制効果を示した（図3）。またポリリン酸添加群も一定の抑制効果を示した。骨芽細胞活性化試験ではポリリン酸添加群はコントロール群に対して顕著な促進効果を示したが、NF- κ Bデコイ添加群は骨芽細胞活性促進効果を示さなかった。

破骨細胞への分化培養実験

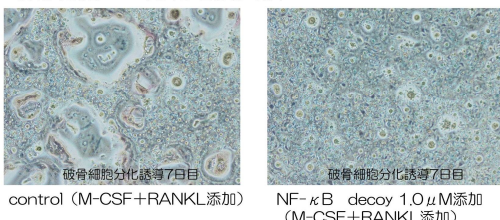


図 3

NF- κ B デコイ吸着人工骨の骨形成促進効果の評価

；頭頂骨での検討

ポリリン酸群のIP-CHA気孔内は底部から上部に向けての新生骨組織の形成が認められた。一方、NF- κ Bデコイでは骨形成は下方部におもに認められた。いずれもIP-CHA群比較し新生骨は多く確認された。

；大腿骨での検討

頭頂骨実験と同様に骨形成はポリリン酸群で最も多くの骨形成が確認された。次いでNF- κ Bデコイ群に多くの骨形成が観察

された。骨面積率の測定結果ではポリリン酸群がcontrol群に対して有意に高い値を示したものの、NF- κ Bデコイ群はコントロール群とのあいだに有意な差は認めなかった。

；侵襲的炎症性骨欠損モデルでの検討

組織所見においてポリリン酸群およびNF- κ Bデコイ群の骨欠損内に多くの新生骨が観察された（図4）。再生骨高径率ではNF- κ Bデコイ群が最も高い値を示し、ポリリン酸群およびコントロール群との間に有意な差を認めた。骨接触面積率においてもNF- κ Bデコイ群およびポリリン酸群はコントロール群に対して有意に高い値となった。

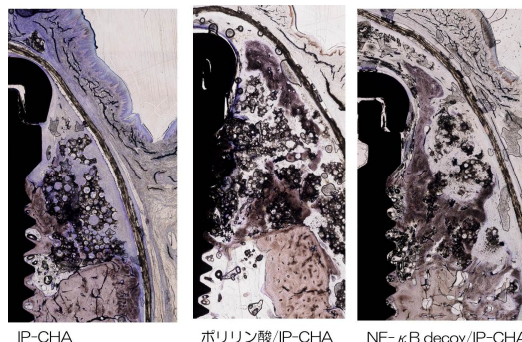


図 4

以上の結果によりNF- κ Bデコイをアパタイトに吸着させることが可能であり、このNF- κ Bデコイは顕著な破骨細胞分化抑制効果を示すことが明らかとなった。また通常の骨欠損部位での骨再生では骨芽細胞へ促進効果を有するポリリン酸と比べ、再生骨再生促進効果は低かったものの、破骨細胞が活性化された炎症性モデルにおいてはNF- κ Bデコイを応用することで高い骨再生が獲得できることを確認した。

これにより破骨細胞を標的とした新規生体材料としてNF- κ Bデコイ吸着連通多孔性ハイドロキシアパタイトの有用性を明らかとした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 3 件）

Inorganic Polyphosphate Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Expression in Macrophages: Harada K, Shiba T, Doi K, Morita K, Kubo T, Makihara Y, Piattelli A, Akagawa Y. PLoS One, 2013;8: e74650

（査読有）

Polyphosphate-mediated inhibition of tartrate-resistant Acid phosphatase and suppression of bone resorption of osteoclasts.: Harada K, Itoh H, Kawazoe Y, Miyazaki S, Doi K, Kubo T, Akagawa Y, Shiba T.: PLoS One , 2013;8: e78612 (査読有)

Inorganic polyphosphate adsorbed onto hydroxyapatite for guided bone regeneration: an animal study.
Doi K, Kubo T, Takeshita R, Kajihara S, Kato S, Kawazoe Y, Shiba T, Akagawa Y.
Dent Mater J. 2014;33:179-86. (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

Development of composite of poly(P) and bFGF with interconnected porous calcium hydroxyapatite: Morita K, Doi K, Kubo T, Kajihara S, Takeshita R, Quan Y, Ping, G, Akagawa Y.: 2012 Sino-Japan Dental Conference, (Chengdu, China), 2012.4,27

補綴治療の向上に貢献する「十分に検証された既存の技術をハイブリッドさせたバイオマテリアルの創生」: 土井一矢: 公益社団法人日本補綴歯科学会 第122回学術大会 シンポジウム(福岡国際会議場), 2013.5,18

連通多孔性ハイドロキシアパタイトによる骨再建部に対するインプラント埋入: 組織学および力学的評価: 牧原勇介, 土井一矢, 梶原志穂, 久保隆靖, 赤川安正: 日本口腔インプラント学会(博多), 2013.9,13

Histological and mechanical evaluation of the implants placed in the

reconstructed bone by interconnected porous calcium hydroxyapatite: Makihara Y, Doi K, Morita K, Kajihara S, Kubo T, Akagawa Y.: The 15th Biennial Meeting of International College of Prosthodontists (Torino, Italy), 2013.9,19

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 隆靖 (KUBO TAKAYASU)
広島大学・大学病院・講師
研究者番号: 60240876

(2) 研究分担者

日浅 恭 (HIASA KYO)
広島大学・大学病院・助教
研究者番号: 60304432

土井 一矢 (DOI KAZUYA)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号: 80444686

赤川 安正 (AKAGAWA YASUMASA)
奥羽大学・歯学部・教授
研究者番号: 00127599