

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593002

研究課題名(和文)カイコウイルス多角体を用いたBMP-2固定化徐放製剤による新規骨再生療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the newly bone regeneration therapy using polyhedra particles immobilized BMP-2 as a controlled release carrier for BMP-2

研究代表者

大見 寧 (omi, yasushi)

神奈川県立大学・歯学部・助教

研究者番号：10318892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：カイコ(Bombyx mori)サイボウイルスの粒子は多角体と呼ばれる $\mu\text{m}$ サイズのタンパク質結晶に包埋されて長期間の感染性を保つことができる。この多角体の安定性はサイトカイン徐放剤のキャリアに応用できる。本研究では、多角体に包埋したbone morphogenetic protein-2(BMP-2)によって自然治癒不可能な骨欠損を完全に治癒できることを明らかにした。コラーゲンスポンジにBMP-2を含浸させるだけでは、BMP-2の徐放性に劣るため、骨欠損の完全な治癒がみられなかった。これに対して、BMP-2を多角体に包埋後コラーゲンスポンジに含浸させた場合は、完全な骨欠損の再生がみられた。

研究成果の概要(英文)：Bombyx mori cytopovirus particles are embedded in micrometer-sized protein crystals called polyhedra and can remain infectious in harsh environmental conditions for years. But the remarkable stability of polyhedra can be applied on slow-release carriers of cytokines for tissue engineering. Here we show the complete healing in critical-sized bone defects by bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) encapsulated polyhedra. Although absorbable collagen sponge (ACS) safely and effectively delivers recombinant human BMP-2 (rhBMP-2) into healing tissue, the current therapeutic regimens release rhBMP-2 at an initially high rate after which the rate declines rapidly. ACS impregnated with BMP-2 polyhedra had enough osteogenic activity to promote complete healing in critical-sized bone defects, but ACS with a high dose of rhBMP-2 showed incomplete bone healing, indicating that polyhedral microcrystals containing BMP-2 promise to advance the state of the art of bone healing.

研究分野：口腔外科

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：骨再生治療 バイオマテリアル 多角体 BMP-2 徐放 アテロコラーゲンスポンジ

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周疾患や外傷により歯槽骨の吸収や破壊が進行すると抜歯を避けることが出来なくなる。一度失われた骨は再生することではなく、その後の義歯の装用やインプラント治療に大きな支障きたすことも多くなる。

(2) 萎縮した顎骨(堤)の再構築はインプラント治療には必要不可欠なことである。一般に顎骨の再構築を行うためには骨再生治療を行う必要がある。

(3) 骨再生には間葉系幹細胞を積極的に骨芽細胞に誘導分化させる生理活性因子が必要である。多くの生理活性因子のなかで、効率よく骨芽細胞への分化を誘導し、臨床応用が期待できるものに **BMP-2** がある。しかし **BMP-2** は生体内半減期が短いため、骨再生には大量の **BMP-2** が必要になることから膨大なコスト高や、大量投与に伴う予せぬ副作用の発現を招く恐れが考えられる。そのため **BMP-2** を臨床応用するためには生体内での吸収速度を制御する必要性がある。

(4) 多角体とは昆虫ウイルス自らが作りだしたタンパク質結晶で、ウイルスはその中に自身を“包埋”して自らを外部環境から保護するものであるが、ひとたび昆虫体内に入ると多角体は溶解しウイルス粒子は放出される。すなわち多角体はウイルス粒子を包埋し保護するための「入れ物」としての役割とウイルスを生体内に運ぶ「ベクター」としての機能を有する。

2. 研究の目的

**BMP-2** の安定的・継続的な徐放を可能にした **BMP-2** 固定化多角体を用いた骨再生効果を詳細に検討し、**BMP-2** を用いた実用性の高い新規骨再生療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) **BMP2** 固定化多角体の作製

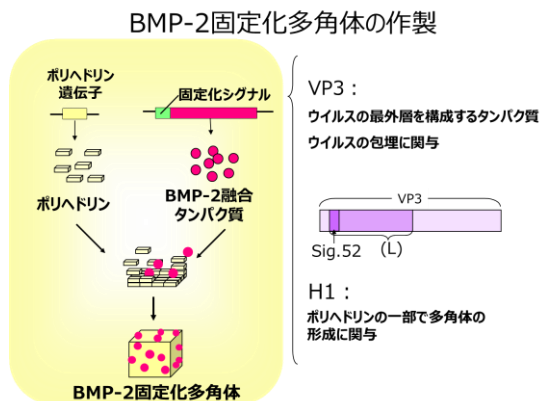
(2) 前駆軟骨細胞(ATDC5 細胞)に対する増殖・分化誘導能についての解析 (in vitro における **BMP2** 固定化多角体の活性評価) : **BMP-2** は **ATDC5** 細胞の軟骨形成に関する初期分化と軟骨結節の肥大化および石灰化に関する後期分化を誘導する。

(3) ラット頭蓋骨々欠損の再生実験

20 週齢の Wister 系雌性ラットの頭蓋骨に直径 10 mm の骨欠損を作製し、骨再生能についての解析 : **BMP-2** 固定化多角体をアテロコラーゲンスポンジに含浸させたものを骨欠損部に移植して、5 週、10 週そして 15 週後に骨再生の評価を行った。評価方法は①軟エックス線撮影②μCT 撮影③組織学的解析による評価を行った。

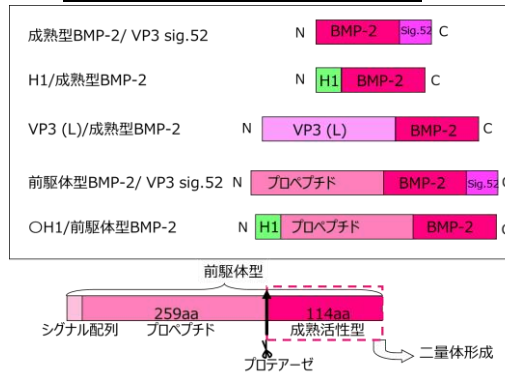
4. 研究成果

(1) **BMP-2** 固定化多角体



多角体タンパク質のポリヘドリンと固定化シグナルの **VP3** または **H1** 遺伝子を **BMP-2** 遺伝子配列の N 末挿入したベクターを昆虫細胞内で共発現することで、**BMP-2** 固定化多角体を作製した。

作製した **BMP-2** 固定化多角体

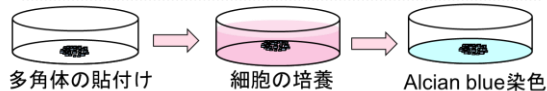


ウェスタンブロット法にて作製した **BMP-2** 固定化多角体の **BMP-2** 固定化を確認したところ、すべての **BMP-2** 固定化多角体に **BMP-2** 融合タンパク質を確認した。

(2) 前駆軟骨細胞(ATDC5 細胞)に対する **BMP-2** 固定化多角体の増殖・分化誘導能について

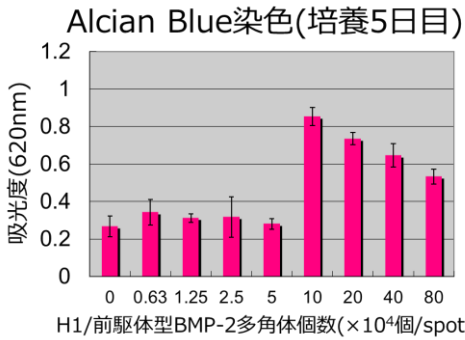
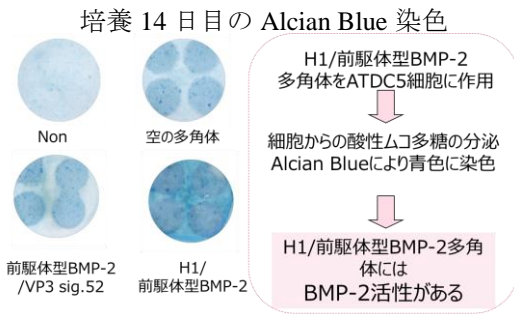
実験方法

初期分化(酸性ムコ多糖の分泌)の観察



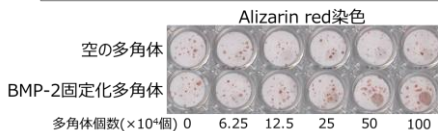
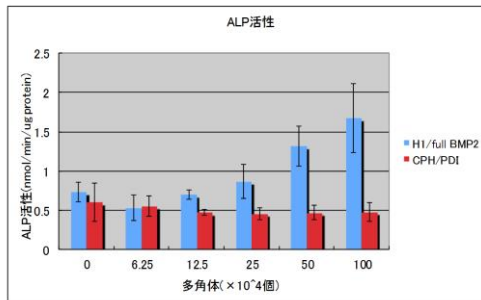
ティッシュカルチャープレート上に **BMP-2** 固定化多角体あるいは空の多角体をスポット状に付着させた後、**ATDC5** 細胞をプレートに播種して 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件で培養を行った。

**ATDC5** 細胞の初期分化におよぼす効果は、細胞から分泌される酸性ムコ多糖を **Alcian Blue** 染色により解析した。その結果、培養 14 日目の細胞において、**H1**/前駆体型 **BMP-2** 固定化多角体に最も強い初期分化誘導能が観察された。

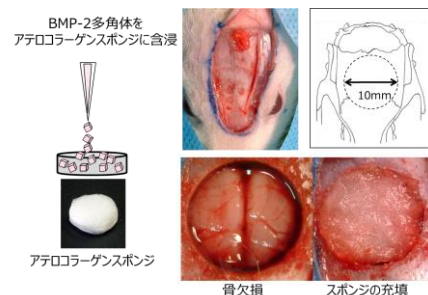


H1/前駆体型 BMP-2 固定化多角体は濃度依存的に ATDC5 細胞の初期分化を誘導した。

次に ATDC5 細胞の後期分化への影響について解析を行った。培養 30 日目に細胞を回収してアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を測定し、また培養プレートをメタノール固定した後、Alizarin red 染色を行い、軟骨結節の石灰化について解析を行った。その結果、H1/前駆体型 BMP-2 固定化多角体の濃度依存的に ALP 活性の上昇を認めた。また Alizarin red 染色においても、ALP 活性の結果と同様に濃度依存的に染色性の増強を認めた。



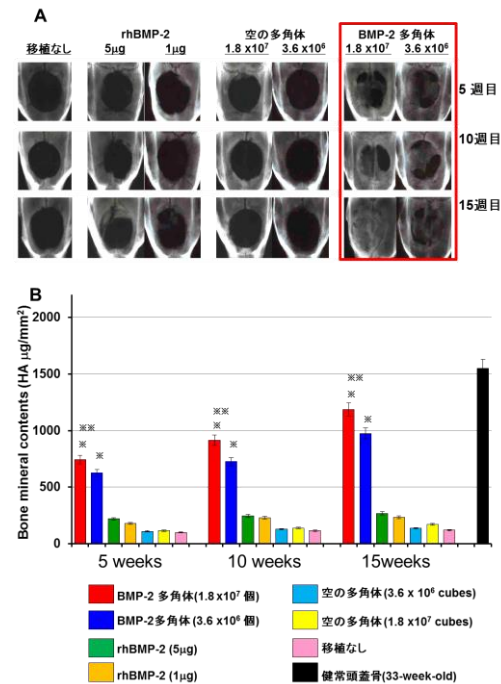
(3) ラット頭蓋骨々欠損の再生効果  
移植実験の概要を下記に示す。



移植 5、10、15 週後にラットを安楽死させ頭蓋骨を摘出して、骨欠損部の軟エックス線解析、 $\mu$ CT 解析および組織学的解析を行った。

### ① 軟エックス線所見

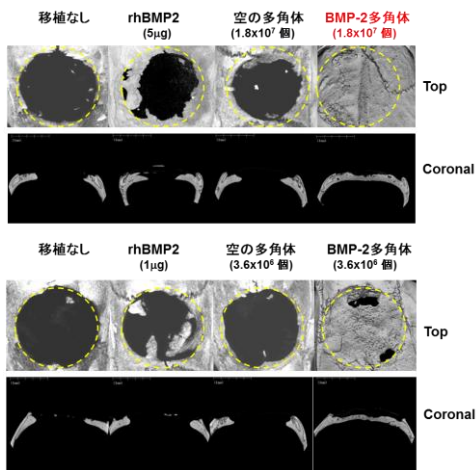
コントロール群(骨欠損のみ)および空の多角体を含浸させたアテロコラーゲンスポンジを充填した群においては 15 週間を通して骨の再生は認められなかった。また  $5\mu\text{g}$  のリコンビナント BMP-2 タンパク質を含浸させたスポンジを移植した場合、15 週までに骨欠損部周囲から中心に向かってわずかに骨の再生が認められたが、 $2\mu\text{g}$  のリコンビナント BMP-2 タンパク質を含浸させた場合、骨の再生はほとんど認められなかった。一方、BMP-2 固定化多角体を含浸させたスポンジを移植した場合、5 週間には骨欠損断端部から中心に向かって骨再生がみられ、15 週後には骨欠損部全体が再生骨により充満される像が認められた。また再生骨の骨質を骨内に含まれるハイドロキシアパタイト(HA)量に換算して比較すると、BMP-2 固定化多角体により再生した骨は、健常部頭蓋骨に含まれる HA と同程度の量であった。



### ② $\mu$ CT 所見

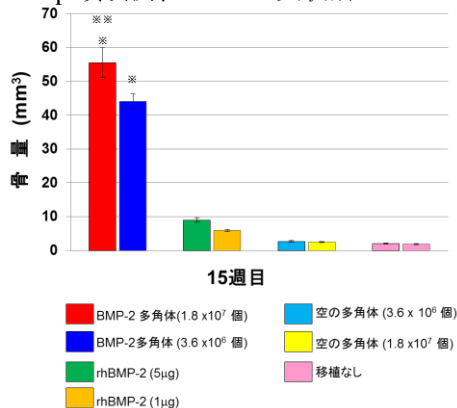
移植 15 日後の  $\mu$ CT 所見は軟エックス線所見と同様に BMP-2 固定化多角体を含浸させたスポンジを移植した場合にのみ、骨欠損部全体に骨の再生が認められた。再生骨を Coronal (矢状断) で観察すると、骨欠損部に再生された骨の厚さは、両端健常部の頭蓋骨の厚さと同程度であった。また再生骨量を比較すると BMP-2 固定化多角体群において、有意な骨量の増加が認められた。





移植 15 週後の  $\mu$ CT 像

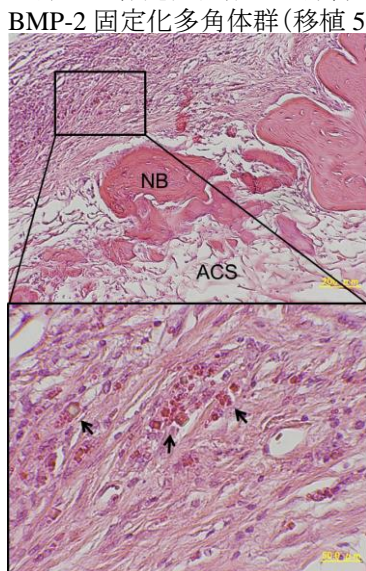
Top: 頭頂側、Coronal: 矢状断



移植 15 週後の再生骨量

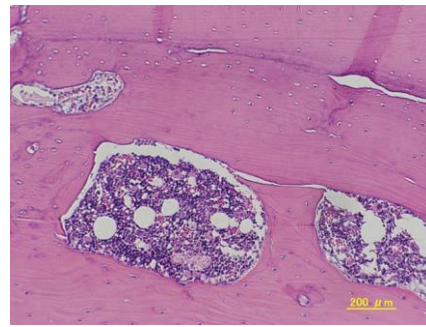
### ③ 組織学的所見

BMP-2 固定化多角体を含浸させたアテロコラーゲンスポンジを移植した場合、移植 5 週間にはスポンジ内からの新生骨の形成がみられた。また新生骨周囲の線維性結合織内には多数の多角体の残存を認めた。移植 15 週間では、再生骨は組織学的にも骨梁構造が明らかな成熟骨に置換されていた。また成熟骨内部には骨髓様組織も一部含まれていた。BMP-2 固定化多角体群 (移植 5 週間後 HE 染色)



NB 新生骨  
ACS コラーゲンスポンジ ↑多角体

BMP-2 固定化多角体群 (移植 15 週間後 HE 染色)



成熟骨内に骨髓様組織がみられる

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Matsumoto G, Hirohata R, Hayashi K, Sugimoto Y, Kotani E, Shimabukuro J, Hirano T, Nakajima Y, Kawamata S, Mori H. Control of angiogenesis by VEGF and endostatin - encapsulated protein microcrystals and inhibition of tumor angiogenesis. *Biomaterials*. 35: 1326-1333. 2014.
- ② Matsumoto G, Sugita Y, Kubo K, Yoshida W, Ikada Y, Sobajima S, Neo M, Maeda H, Kinoshita Y. Gelatin powders accelerate the resorption of calcium phosphate cement and improve healing in the alveolar ridge. *J Biomater Appl*. 28:1316-1324. 2013.
- ③ Matsumoto G, Ueda T, Shimoyama J, Ijiri H, Omi Y, Yube H, Sugita Y, Kubo K, Maeda H, Kinoshita Y, Arias DG, Shimabukuro J, Kotani E, Kawamata S, Mori H. Bone regeneration by polyhedral microcrystals from silkworm virus. *Sci Rep*. 2012. 2:935. doi: 10.1038/srep00935. PubMed PMID: 23226833

[学会発表] (計 1 件)

- ① 松本剛一、下山淳子、久保田英朗、窪田展久、川股 亮太、久保勝俊、木下鞆彦、前田初彦. BMP-2 固定化多角体を用いた新規骨再生療法の開発. 第 65 回日本口腔科学会学術集会 2011 年 4 月 21 日、22 日 東京

[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

<http://www.nature.com/srep/2012/121206/srep00935/full/srep00935.html/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大見 寧 (OMI Yasushi)

神奈川歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10318892

### (2)研究分担者

松本 剛一 (MATSUMOTO Goichi)

神奈川歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：60199867

### (3)連携研究者

なし