

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861900

研究課題名(和文) bFGF徐放化HA/ゼラチン複合体と熱可塑性メンブレンとの新規骨誘導再生法

研究課題名(英文) New guided bone regeneration by bFGF controlled release of HA / gelatin composite and thermoplastic membrane.

研究代表者

浅野 一成 (ASANO, KAZUNARI)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：10632531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ハイドロキシアパタイト(HA)顆粒とゼラチンハイドロゲルとの塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)徐放可能な複合体化と熱可塑性GBR用メンブレンを併用した新規骨誘導再生法の有用性を報告する。約250 $\mu$ mの遊走・接着・増殖可能な気孔が確認できた。bFGFの徐放により細胞増殖能は有意に高く、骨分化能は低値を示し、アパセラム-AXの方が高値を示した。動物実験では、bFGFの徐放群が骨形成効果が高く、アパセラム-AXの方が高値を示した。骨欠損部に填入された複合体は優れた足場としてだけでなく、細胞増殖因子の徐放担体として機能することで、機能的な自家骨の再生を誘導し、失われた骨組織の再構築が期待される。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to develop a composite of bone graft substitute which is prepared from gelatin hydrogel and hydroxyapatite (HA) granules and capable for the controlled release of basic fibroblast growth factor (bFGF) and thermoplastic membrane. The average pore sizes of composites were about 250  $\mu$ m. The composites showed the compressive strength of about 1 MPa and maintained their structural shape even after water swelling. When implanted into the bone defect, the gelatin and HA composites incorporating bFGF induced bone regeneration although the extent depended on the degradability and physicochemical properties. The composites prepared from HA granules and gelatin hydrogels possessed adequate mechanical strength and could release bFGF to induce the bone regeneration. The bone regeneration was achieved with the biodegradation of composites without induction of any adverse responses. It is concluded that the composite are promising for bone tissue engineering.

研究分野：骨再生

キーワード：骨再生 骨補填材 DDS

### 1. 研究開始当初の背景

これまで代表者らが作製したβ-TCP/ゼラチン複合体の解析の結果から、十分な強度(1.5MPa)と細胞・組織の侵入可能な連通気孔構造(平均気孔径 340 μm)とを有し、動物実験においてbFGFの徐放による骨形成促進効果を持つことを明らかにした。また、現在本学附属病院にて本研究と同じ材料を使用した臨床研究も行ってきた。しかし、β-TCPは生体内で吸収するため、個体差による新生骨の形成量にバラつきが大きい結果となった。そのため、より効率的な材料を検討した結果、非吸収性のHAに着目した。さらに代表者らは、GBRのための熱可塑性メンブレンをポリL乳酸(PLLA)を用いて作製し、その有用性も検討してきた。その結果、十分な機械的強度を持ち、12週以上付与した形態を維持し、誘導された新生骨は吸収することなく、新生骨量にも有意差を認められた。そこで、複合体とPLLAメンブレンを併用したGBRのための新規治療法として研究を進展すべく本研究を着想した。

理活性物質の徐放担体として優れるゼラチンハイドロゲルを、HA顆粒と複合体化することにより増殖因子徐放化骨補填材の開発ができれば、大量投与に伴う副作用やコストの問題から臨床適用が遅れている細胞増殖因子を用いた骨再生治療において、非常に意義のある成果を提供できると考えられる。更に十分な強度と連通気孔構造を有し、局所停滞性と組織の浸潤性の高い徐放化複合体を用いて細胞増殖因子を安定投与することは、信頼性の高い骨再生(環境の差異例えば、出血の多寡、骨欠損のタイプの差異に左右されない臨床効果)が期待できる。

また、本研究に使用する材料はすべて、すでに臨床に使用されており、かつ安価でその操作も非常に簡便であるため、口腔外科領域だけでなく一般臨床に携わる歯科医師でも容易に扱える材料を提供することが出来るためそのブレイクスルーの可能性は十分あると考える。

本研究により、骨欠損部に填入された複合体は優れた足場としてだけでなく、細胞増殖因子の徐放担体として機能することで、機能的な自家骨の再生を誘導し、失われた骨組織の再構築が期待される。さらに、熱可塑性PLLAメンブレンは必要な三次元形態に付与することができ、必要期間その形態を維持することから軟組織侵入を防ぐことができる。

以上より、これまでの研究からは不可能であった、より早期により理想的な形態の骨組織の再構築ができ、インプラント治療の発展に与える意義は極めて大きいと思われる。

### 2. 研究の目的

歯槽骨に著しい吸収が存在する場合、インプラント体を埋入することが困難となる。そこで、骨補填材やバリアメンブレンを用いた骨誘導再生(GBR; Guided Bone Regeneration)

が行われている。代表者らは、これまでリン酸三カルシウム(β-TCP)とゼラチンハイドロゲルとの複合体化に成功し、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の徐放による骨再生促進について報告してきた。しかし、β-TCPは生体内で吸収するため、個体差による新生骨の形成量にバラつきが大きく、コントロールすることが困難であった。そこで、β-TCPから非吸収性で歯科適応されているハイドロキシアパタイト(HA)顆粒に変更して、さらに代表者らが開発した熱可塑性のGBR用メンブレンを併用した新規治療法を開発する。

インプラントによる咬合・咀嚼機能の回復は、再現性の高い歯科治療として普及している。しかし、歯槽骨に著しい吸収や萎縮が存在する場合、インプラント体を埋入することが困難である。これまで様々な骨移植材を用いた歯槽増大術が行われている。その際、骨移植材には自家骨や合成アパタイトなどが用いられ、骨形成能を有する細胞の増殖や分化の足場となる。しかし、骨形成前に歯肉上皮や結合組織由来の細胞が侵入してしまうため、必要量の骨再生が難しい。そこで、骨膜下に薄膜の生体材料を設置して、上皮や結合組織の侵入を遮断し、確実に骨を形成するGBRが行われている。

現在、骨移植材として優れた生体親和性及び骨伝導能を有し、生体内で分解され徐々に新生骨に置換するという特徴を有するβ-TCPが臨床に用いられている。しかしながら、分解の遅延が新生骨との置換の点から問題となることが多く、骨形成量をコントロールすることが困難である。また顆粒のみでは、三次元的な形態を保つことが容易ではなく、またスペースメイキング機能を達成するための十分な力学強度も有していない。さらに、従来のバリアメンブレンでは膜自体の機械的強度が不十分なため、求める歯槽形態に骨を誘導再生させることが困難である。

以上のような問題を解決するためには、顆粒状セラミックスに非吸収性のHAを選択し、バインダーとなる材料を併用、複合体化する必要がある。そのバインダーには、増殖因子の徐放担体で、生体吸収性と生体適合性とを有するゼラチンを選択することで、bFGFが徐放されて骨再生の促進が期待できる。さらに成型が自由にでき、必要期間その形態を維持できるPLLAメンブレンを併用すれば、より良い骨新生が期待できる。

### 3. 研究の方法

(1) 作製した複合体を表面構造、気孔サイズを走査型電子顕微鏡(SEM像)にて観察する。

(2) 作製した複合体を圧縮試験機(オートグラフ)にて1mm/minスピードで圧縮試験を行う。

(3) 48well plateに $6.0 \times 10^4$  cells/well (n=4)のマウス骨芽細胞株(MC3T3-E1)

を播種する。コンフルエントになった後、10 ng/ml の bFGF を含浸させた複合体（高さ:1mm）と対照群として PBS を含浸させた複合体とを静置し、経時的にサンプリングを行い、複合体中の細胞増殖数を DNA assay にて測定した。また、静置後 7 日後に通常培地から骨分化培地（通常培地、 $10^{-7}$ M デキサメタゾン、10 mM グリセロリン酸、50  $\mu$ g/ml アスコルビン酸）に変更し、骨分化能を ALP assay にて測定した。

（4）臨界骨欠損モデルを用いて骨形成能を評価する。

New Zealand White 系ウサギ尺骨中央部に、20 mm の全層骨欠損部を作製し、100  $\mu$ g の bFGF 水溶液を含浸させた複合体を欠損部に填塞し、骨膜及び皮膚を縫合する。また、bFGF を含まない複合体を対照として設け、熱可塑性メンブレンを併用することでの骨再生への効果も評価する。

回収した組織に対して、エックス線（マイクロ CT）撮影と、組織切片を作製し骨形成量の評価を行う。

#### 4. 研究成果

HA/ゼラチン複合体の材料学的検討作製した複合体の表面構造を走査型顕微鏡で観察し、両複合体ともに約 250  $\mu$ m の細胞が遊走・接着・増殖可能な十分な気孔が確認できた。機械的強度の測定はオートグラフを使用し圧縮強度を測定し、両複合体ともに約 1.0MPa であり、膨潤状態でも形態を維持することが可能であった。また、三次元培養により、細胞接着能、細胞増殖能は bFGF の徐放により有意に高い値を示し（図 1）骨分化能は bFGF の徐放がない群が高い値を示したが、顆粒間での差はネオボーンと比較してアパセラム R-AX の方が高い値を示した（図 2、3）。以上の結果からウサギ尺骨 20mm 欠損モデルを使用し骨形成効果の評価をおこなった。両複合体ともに bFGF の徐放群が PBS 群と比較して骨形成効果が高く、また HA 顆粒の表面形状が新生骨量に影響し、アパセラム R-AX の方が高い値を示した。

本研究により、骨欠損部に填入された複合体は優れた足場としてだけでなく、細胞増殖因子の徐放担体として機能することで、機能的な自家骨の再生を誘導し、失われた骨組織の再構築が期待される。

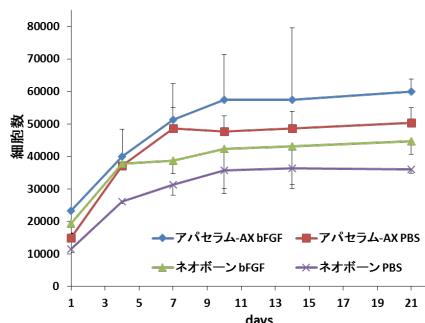


図 1 細胞増殖試験

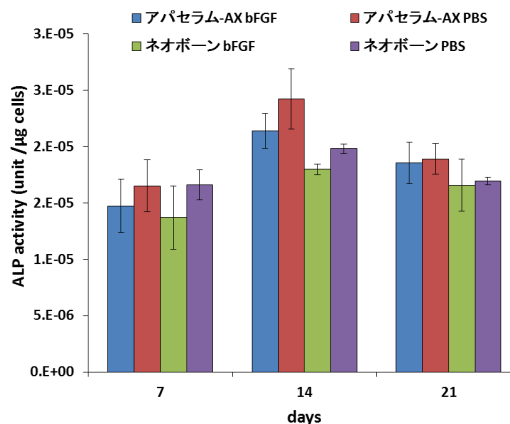


図 2 骨分化試験（ALP 活性）

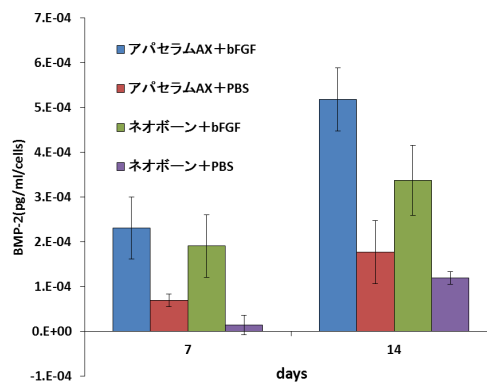


図 3 骨分化試験（BMP-2 発現量）

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

浅野一成、HA 顆粒性状の変化が bFGF 徐放化 HA/ゼラチン複合体の骨誘導再生能へ及ぼす影響について、第 35 回日本炎症・再生医学会、2014 年 7 月 2 日、万国津梁館（沖縄県名護市）

〔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：  
出願年月日：  
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

浅野一成 (ASANO KAZUNARI)  
日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：10632531

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：