

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 24 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462932

研究課題名(和文) 遺伝子導入とナノバイオマテリアルを応用した新規骨組織再生療法

研究課題名(英文) Tissue engineering using injectable bone substitute material with gene transfer

研究代表者

近藤 尚知 (Hisatomo, Kondo)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：70343150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ナノレベルの骨置換性バイオマテリアルによってスペースメイキングを行うとともに、骨誘導因子により骨芽細胞を直接組織中に誘導し、抜歯後喪失されていく骨量の維持あるいは失われた骨組織を短期間に、低侵襲な方法で再生することにある。

ナノハイドロキシアパタイトと合成ヒアルロン酸を混合し、ゾル・ゲル反応を持ち合わせた材料の調整に成功し、BMP-2を混合することで、マウスの頭蓋骨骨膜下に骨組織が誘導されることも確認できた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate osteogenic differentiation profiles on nano hydroxyapatite and hyaluronic acid composite(nHAP/HLA) with osteoblast differentiation factors, such as BMP-2. Injectable nHAP/HLA was produced and implanted on mouse calvariae without incision. This newly developed nano biomaterial was formed in 37 degree environment and create the additional space for bone induction between bone and periosteum. Ectopic bone formation was observed on calvarial tissue after injection of nHAP/HLA with BMP2.

研究分野：補綴歯科学

キーワード：組織再生 骨組織 バイオマテリアル

## 1. 研究開始当初の背景

研究課題名：遺伝子導入とナノバイオマテリアルを応用した新規骨組織再生療法

歯の喪失による咀嚼障害、構音障害、審美不良は、高齢者のクオリティ・オブ・ライフを著しく低下させる要因である。デンタルインプラントによる機能回復は治療効果も患者満足度も高いが、骨量の不足している場合にはその適用が困難となる。超高齢社会となった我が国では、上記問題の改善が急務となることが予想される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ナノレベルの骨置換性バイオマテリアルによってスペースメイキングを行うとともに、骨誘導因子により骨芽細胞を直接組織中に誘導し、抜歯後喪失されていく骨量の維持あるいは失われた骨組織を短期間に、注射等の低侵襲な方法で再生することにある。

## 3. 研究の方法

基材となる材料にはヒアルロン酸ベースハイドロゲル (Hystem) を用い、それにナノサイズのアパタイト粉末 (40 nm 径品) (n-HAP) と rhBMP-2 (Recombinant ヒト/マウス/ラット型) を混合した。Hystem + n-HAP + BMP, Hystem + n-HAP および Hystem + BMP の3種の試験材を調整し以下の方法で実験を行った (n=6)。ナノサイズのアパタイトには (40 nm 径品) (n-HAP) (ソフセラ社) (図1) を用いた。ゲルにはヒアルロン酸ベースハイドロゲル (Hystem/ESI・BIO社) を用いた。ハイドロゲルは液性の DG Water、固体の

Extralink、Glycosil からなる。DG Water、Extralink、Glycosil を室温に戻し、クリーンベンチ内にて Glycosil に DG water を 5ml 混和し、37℃ 以上にならないように注意し 40 分間振り動かし混和させる (A 液)。その際にはボルテックスは使用しない。また Extralink にも DG water を 2.5ml 入れ同様に混和する (B 液)。AB の 2 液性となった Hystem は混和後ゾル・ゲル反応にて 30 分程度でゲル化する為、最終的な調製は動物実験室にて注入直前に行ない、マウス頭蓋部下、大腿部筋肉内および背部皮下の 3 箇所にて 22G の注射筒を用い、ゾル状の試験材 1~2.5 ml を注入し、生体内でゲル化させた。注入後 1 週、4 週、8 週に渡り  $\mu$ CT にて不透過像の経時変化を観察した。8 週経過時には、残存材料を含む生体組織を摘出し通法に従って、固定、包埋し、組織像の観察を行なった。

また一方で、また、in vivo の実験において、BMP-2 (プラスミド・ベクター) の遺伝子導入を試みたが、有意な効果が認められなかった。本課題を解決するため、BMP-2 の発現ベクター (プラスミド・ベクター) の設計から見直し、株化細胞への遺伝子導入を行い、その導入効率を再評価した。

## 4. 研究成果

我々は、ナノハイドロキシアパタイト (nanoHAP) とヒアルロン酸ベースハイドロゲル (Hyste) m をある比率で混合し、架橋材を添加する事により、目的のゾル・ゲル反応を持ち合わせた材料の調整に成功している。本バイオマテリアルは、温度の上昇と時間の経過とともに、硬度と弾力を増すことが確認された。

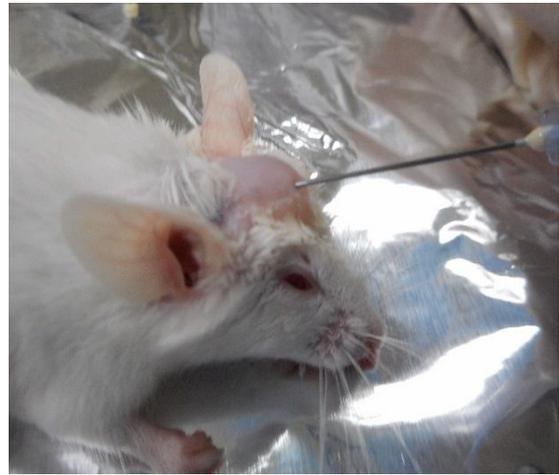


この反応の過程では SH 基によりヒアルロン酸が不可逆的なゾル・ゲル反応を起こすため、指で持つ事が出来る程度までゲル化し、十分な弾力と高度を保持している。したがって、骨膜下に新生骨を誘導するために骨膜と上皮の圧力に抵抗し、骨誘導スペースを確保することができる。



今

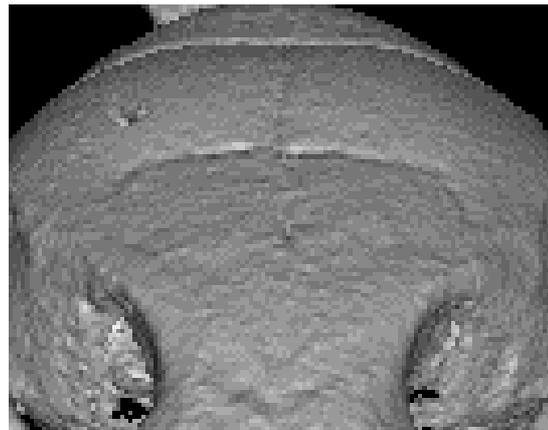
回開発したバイオマテリアルは、頭蓋骨上に新生骨を誘導することができる可能性が高い(日本口腔インプラント学会誌 2016)。



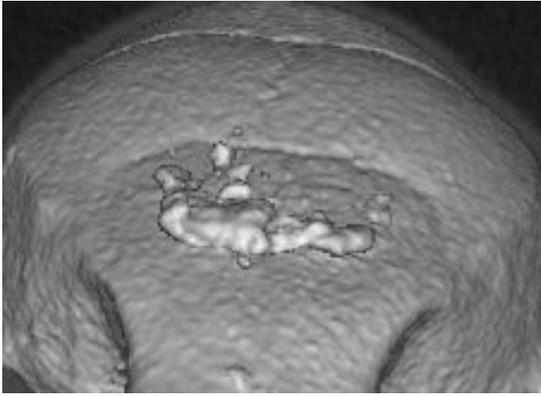
また、本研究においては、Hystem + n-HAP + BMP、Hystem + n-HAP および Hystem + BMP の3種の試験材を調整し、注射によって、骨膜下に本バイオマテリアルを注入した。

注入後、1週、4週、8週後に、マイクロCT

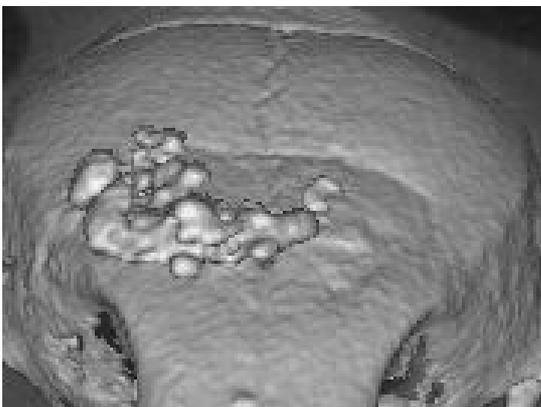
によって、骨組織の状態を観察したところ、Hystem + n-HAP + BMP のサンプル(nanoHAP に骨誘導タンパク(BMP-2)を混合)において、マウスの頭蓋骨骨膜下に骨組織が誘導されることが確認できた。



(注入後、第1週)

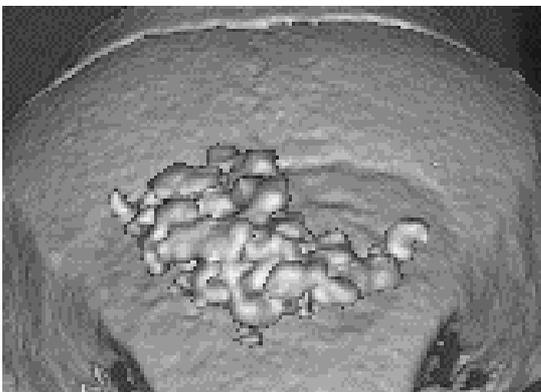


(注入後、第2週)



(注入後、第8週)

マイクロCTの結果から、本バイオマテリアル注入後1週では、異所性骨化すなわち新生骨を示唆するような不透過像は観察できなかったが、2週後、8週後において、新生骨と思われる不透過像を認めた。12週後の観察では、さらにその不透過像の体積は増加しており、新生骨の誘導とその骨組織の成長が示唆された。



(注入後、第12週)

また、*in vivo*の実験において、BMP-2(プラスミド・ベクター)の遺伝子導入を試みたが、有意な効果が認められなかった。本課題を解決するため、*in vitro*の実験において、BMP-2(プラスミド・ベクター)の株化細胞への遺伝子導入を試みた。導入効率という問題を解決し、より効率的な骨誘導を可能とするため、今まで用いてきたBMP-2の発現ベクターを、設計の段階から見なおした。その結果、ヒト間葉系幹細胞(hMSC: UE7T-13)を用いた遺伝子導入実験で、BMP-2の発現ベクターが、細胞の石灰化を促進することを確認している。

#### 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3件)

1. Inoue M., Yamada J, Aomatsu-Kikuchi E., Satoh K., Kondo H., Ishisaki A., Chosa N. SCRG1 suppresses LPS-induced CCL22 production through ERK1/2 activation in mouse macrophage Raw264.7 cells. *Molecular Medicine Reports*. Published online on: April, 2017  
<https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6492>
2. Koji IKEDA, Masayuki TAIRA, Jun YOKOTA, Masayuki HATTORI, Akira ISHISAKI, Hisatomo KONDO Effects of Addition of Nano-hydroxyapatite to Highly-pressed Collagen on Osteogenic Differentiation in Osteoblastic SaOS-2 Cells *Nano Biomedicine* Vol. 8(2016) No. 2: 91-100, Released: February 20, 2017
3. Inoue M., Ohtsu K., Ohtsuka M., Takafuji

K., Harada H., Ishisaki A., Kondo H.  
Healing mechanism surrounding  
transplanted bone using transgenic mice  
expressing red fluorescent protein in vivo.  
*Journal of Oral Tissue Engineering*,  
2016;14(2):74-82.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 井上学、横田潤、高藤恭子、近藤尚知 骨移植における骨再生の細胞動態の解析日本再生歯科医学会第14回学術大会2017年2月24～25日
2. Koji Ikeda, Wataru Hatakeyama, Hisatomo Kondo Bone regeneration using pressed nano-apatite/collagen composites in rat cranial bone defects. Annual Meeting of International Congress of Oral Implantologists 2016. 10月27～29日. Singapore
3. 池田功司, 平雅之, 畠山航, 鬼原英道, 野村太郎, 玉田泰嗣, 米澤悠, 近藤尚知 架橋型ヒアルロン酸・ナノアパタイト・BMPを用いた注入式骨補填材の試作日本口腔インプラント学会第46回学術大会2016年9月16～18日 名古屋

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

近藤 尚知 (KONDO Hisatomo)

岩手医科大学・歯学部・補綴・インプラント学講座・教授

研究者番号: 70343150

(2)研究分担者

平 雅之 (TAIRA Masayuki)

岩手医科大学・歯学部・医療工学講座・准教授

研究者番号: 60179398

石崎 明 (ISHISAKI Akira)

岩手医科大学・歯学部・生化学講座・教授

研究者番号: 20356439

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者( )