

日本医療研究開発機構 創薬基盤事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：糖鎖を用いた骨 DDS と骨再生

Drug delivery of glycosaminoglycan to the bones to promote bone regeneration

研究開発実施期間：令和 6 年 4 月 16 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：野澤 聡

Satoshi Nozawa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東海国立大学機構岐阜大学医学部整形外科・准教授

Associate professor, Gifu University, Graduate School of Medicine., Tokai National Higher Education and Research System, a National University Corporation.

II 研究開発の概要

橋渡し研究戦略的推進プログラムにおいて、糖鎖（特に、低分子ヘパリン(LMWH)等の多硫酸化糖鎖）にアスパラギン酸オクタペプチド(D8)を共有結合させた LMWH-D8 が骨のハイドロキシアパタイト(HA)特異的に集積することを明らかにしてきた。さらに、BMP-2 を LMWH-D8 と共に人工骨に含浸させることにより、ラット腰椎後側方固定モデル（局所投与）において BMP-2 単体よりも骨形成を有意に増加させることを明らかにし、“LMWH-D8 が BMP-2 を骨に特異的に運び”、骨形成を促進させる臨床応用の可能性を見出してきた。

これらの結果を踏まえ、LMWH-D8 の局所投与及び全身投与での in vivo での有用性を検討することが本研究課題の目的であった。これまでの検討内容を充実させ、人工骨周辺の LMWH-D8 や BMP-2 滞留性を明確化した。全身投与による LMWH-D8 のさらなる応用展開の可能性を考え、経皮投与という新たな試みにより LMWH-D8 が骨へ送達可能かについても評価した。

成果

1) LMWH-D8 の安定的合成に成功

LMWH-D8 の合成方法を秘密保持契約の下で外注先に提供し、合成に成功した。これにより精製度の高い LMWH-D8 を安定して確保できる状況となった。今後のスケールアップ、GMP レベルの薬剤合成にむけて大きなステップアップとなった。

2) LMWH-D8 併用による BMP-2 の局所滞留性への影響を経時的に確認

低分子ヘパリン LMWH が成長因子に結合することを利用し、「骨に結合する低分子ヘパリン(LMWH-D8)が人工骨内で BMP-2 と結合することで BMP-2 の長期局所滞留が得られるのではないかと、それによって BMP-2 の骨誘導能が維持されているのではないかと」という仮説を立て、実験を進めた。人工骨には①PBS, ②LMWH-D8 のみ、③BMP-2 のみ、④LMWH-D8 と BMP-2 の混合液、を人工骨に含浸させ 0, 1, 2, 4 日後の人工骨内部での BMP-2 の滞留状況を、抗

BMP-2 抗体を使用した定量 PID イメージングを用いて解析した。0 日においては LMWH-D8 と BMP-2 混合群において PID 粒子が多く確認された。一方、④群では仮説に反し移植後 1 日目から急速に PID が減少した（図 1）。これは LMWH-D8+BMP-2 混合群では、BMP-2 単独含浸群よりも速く BMP-2 が消費され、BMP-2 シグナルが局所で増強（骨形成促進）していると考えられた。このことは LMWH-D8 併用により、BMP-2 早期徐放にて引き起こされる合併症（創部浮腫、癒合不全、異所性骨化など）が軽減されうると思われた。

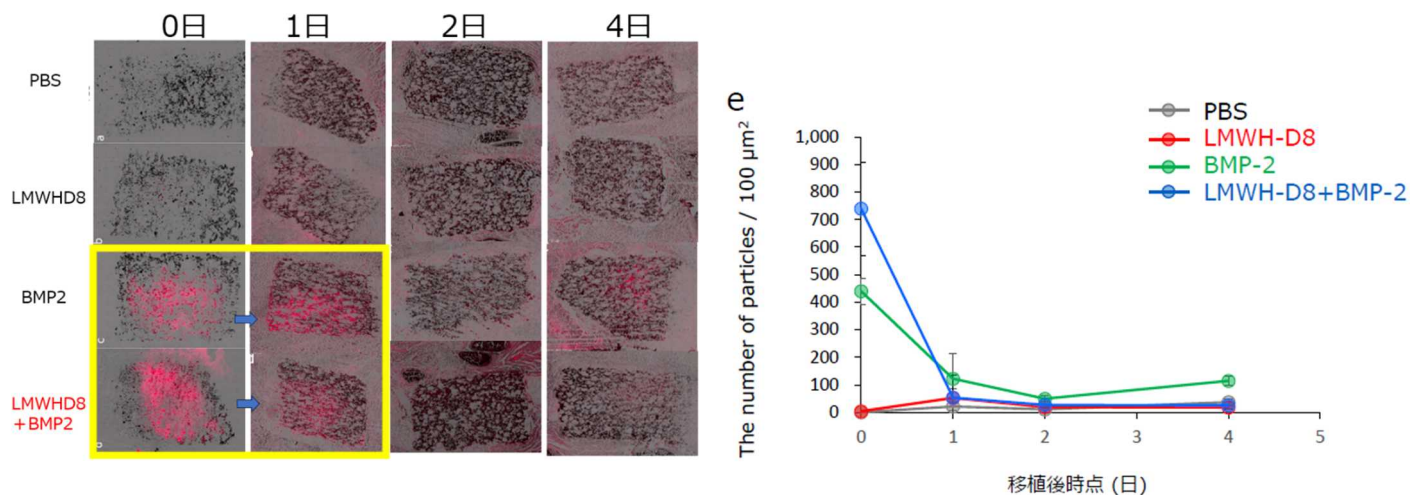


図 1 抗 BMP-2 抗体を使用した PID イメージングを行った。LMWH-D8+BMP-2 混合液を含浸させた群では、BMP-2 単独含浸群に比し(黄色枠)移植後 1 日目から急速に PID (=BMP-2) が減少していた。

3) LMWH-D8 の全身投与で骨に結合することを PET イメージにて確認

PET 評価に向け、LMWH-D8 にキレーター (DF0*) を修飾し、放射性同位体であるジルコニウム-89 (Zr-89) を結合させ LMWH-D8 を PET プローブ化した。静注 24 時間後に骨に送達されていることが確認された（図 2）。

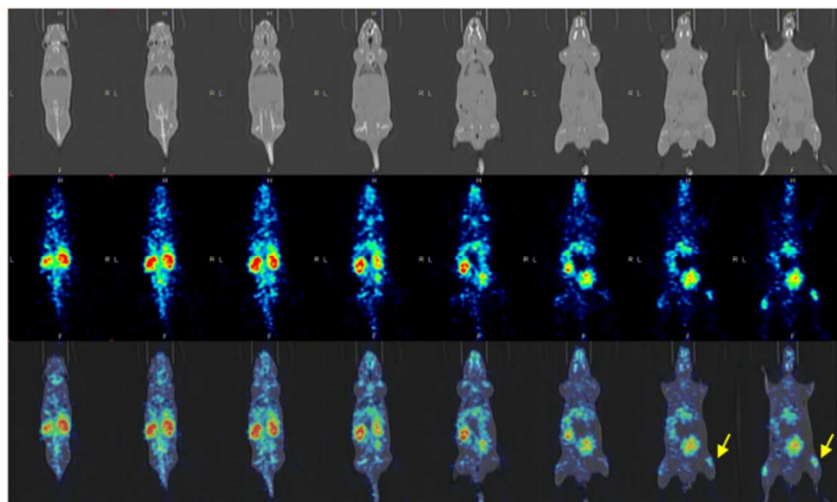
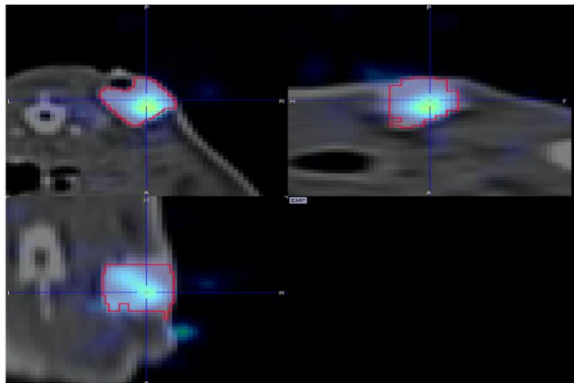


図 2 全身投与

Zr 標識 LMWH-D8 をもちいた PET 試験(マウス): 静注後 24 時間後では腎臓肝臓への集積とともに、骨への集積も認められた(矢印)。

4) 人工骨へ含浸させた LMWH-D8 は人工骨内の滞留率が高いことを PET イメージにて確認

LMWH-D8 および LMWH-D0 (コントロール) を PET プローブ化し、人工骨へ含浸させた後にマウスへ移植した。埋植 1、3、7 日後の PET 撮像により、D8 と D0 間で放射線の消退の差を比較した。人工骨 ROI に限定した解析を行い、LMWH-D8 は D0 に比し埋植 7 日後においても約 1.7 倍の量が人工骨に結合していることが分かった（図 3）。



Artificial Bone Retention of Zr-LMWH-D8 vs D0

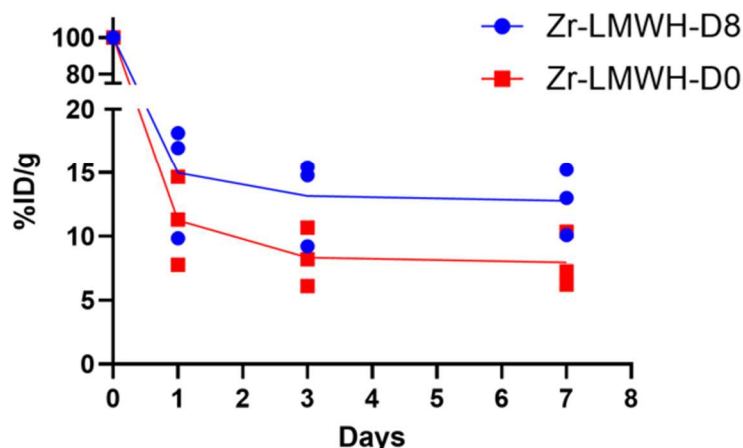
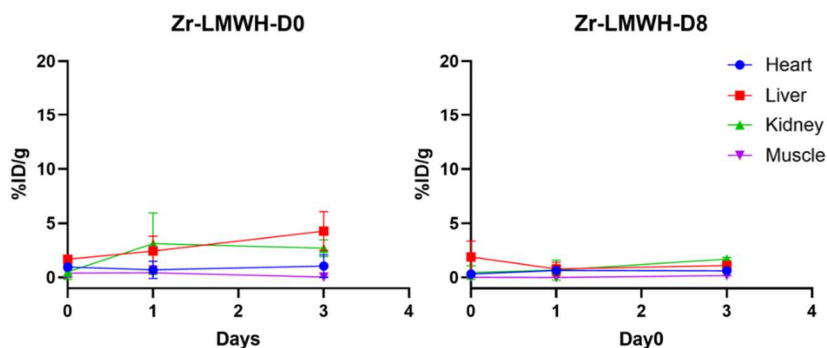


図3 局所投与

人工骨 ROI に限定した解析.
LMWH-D8 は D0 に比し埋植
7 日後においても約 1.7 倍の量が人
工骨に結合していた。
LMWH-D8 では人工骨以外への移
行は殆どみられなかった。

人工骨以外への移行性



5) LMWH-D8 が経皮投与にて骨に送達されることを確認

LMWH-D8 に対し、Solid-in-Oil 化技術および Ionic liquid を適用することで、骨送達性を持った経皮製剤の創製を目指した。皮膚浸透性が最も高かった IL-S/O 製剤を用いて、マウスへ LMWH・D8 内包 IL-S/O 製剤を経皮投与し、骨送達性を評価した。非脱灰切片の蛍光画像（図4）から、LMWH-D8 は経皮投与後に骨まで送達されたことが示された。今後の LMWH-D8 全身投与における低侵襲化の可能性を広げることができた（材料調達難により N=2 で終了）。

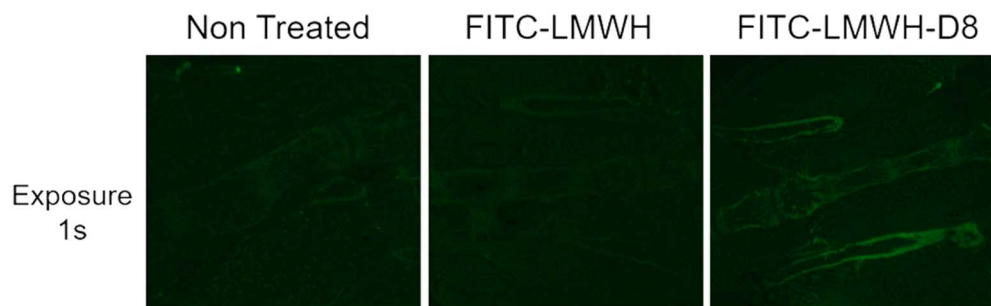


図4 非脱灰切片

LMWH・D8 内包 IL-S/O 製剤を
経皮投与し、骨送達性を評価
した。LMWH-D8 は経皮投与後
に骨まで送達された

In our previous work, we developed a low-molecular-weight heparin–aspartic acid octapeptide conjugate (LMWH-D8) that selectively accumulates in bone through specific binding to hydroxyapatite. Co-impregnation of LMWH-D8 and BMP-2 into artificial bone significantly enhanced bone formation compared with BMP-2 alone in a rat posterolateral lumbar fusion model, indicating that LMWH-D8 can deliver BMP-2 specifically to bone and promote osteogenesis with potential clinical applicability. Based on these findings, the aim of the present project was to evaluate the *in vivo* usefulness of LMWH-D8 after both local and systemic administration, and to explore less invasive systemic delivery routes.

First, we established a robust and reproducible synthetic process for LMWH-D8. The synthesis protocol was transferred to an external contractor under a confidentiality agreement, enabling stable production of highly purified LMWH-D8. This achievement secures a reliable supply of the compound and represents an important step toward future scale-up and eventual good manufacturing practice (GMP)-grade drug manufacturing.

Second, we investigated the effect of LMWH-D8 co-administration on local BMP-2 retention within artificial bone. Taking advantage of the growth factor-binding capacity of LMWH, we hypothesized that bone-binding LMWH-D8 within the scaffold would bind BMP-2, prolong its local retention, and help maintain osteoinductive activity. Artificial bone was impregnated with PBS, LMWH-D8 alone, BMP-2 alone, or LMWH-D8 plus BMP-2, and BMP-2 retention within the scaffold at defined time points was quantified by PID imaging using an anti-BMP-2 antibody. Although the LMWH-D8 plus BMP-2 group showed the highest signal on day 0, the signal decreased rapidly thereafter. These findings suggest that BMP-2 is more rapidly consumed in the presence of LMWH-D8, likely reflecting enhanced local BMP-2 signaling and accelerated bone formation. Such a release profile may help mitigate complications associated with burst release of BMP-2, including wound edema, nonunion, and ectopic ossification.

Third, we evaluated systemic bone targeting of LMWH-D8 using positron emission tomography (PET). LMWH-D8 was modified with a chelator and labeled with zirconium-89 to generate a PET probe, and bone delivery was confirmed 24 hours after intravenous administration. In addition, PET imaging of artificial bone impregnated with LMWH-D8 or a control conjugate (LMWH-D0) and implanted in mice showed that LMWH-D8 exhibited higher retention in the scaffold up to day 7, supporting its superior binding to bone.

Finally, we explored a minimally invasive systemic administration strategy by developing a transdermal formulation of LMWH-D8 based on Solid-in-Oil and ionic liquid technologies. Using an ionic liquid-based S/O formulation encapsulating LMWH-D8, transdermal administration in mice followed by fluorescence imaging of undecalcified bone sections demonstrated that LMWH-D8 successfully reached bone. Although this experiment was conducted in a limited number of animals due to material constraints, the results broaden the potential for low-invasive systemic delivery of LMWH-D8.