

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Rare/Intractable Diseases

研究開発課題名： (日本語) 広汎型侵襲性歯周炎治療のための内在性/外因性増殖因子を吸着する分解性 α TCPスキャホールドの開発
(英語) α TCP scaffold having high affinity with endogenous/exogenous growth factor for Generalized Aggressive Periodontitis treatment

研究開発担当者 (日本語) 生体医工学部・部長・山岡 哲二

所属 役職 氏名： (英語) Department of Biomedical Engineering, Director, Tetsuji Yamaoka

実施期間： 平成28年4月1日～平成29年3月31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

広汎型侵襲性歯周炎は、急速な歯周組織破壊と家族内発現を認めることを特徴とする歯周炎である。侵襲性歯周炎の細菌学的特徴は限定されていないが、歯周病原細菌の存在が、動脈硬化症の発症・進展に関わっているとの報告もある。対症療法として、疾患のリスクファクターを早期に排除すること、歯周基本治療、歯周外科治療、メンテナンスが重要とされており、根治的歯周組織再生療法等の有効性は必ずしも確立されていない。

本プロジェクトでは、我々が開発したヘパリン化多孔質体 (特願2013-094744) による硬組織再生を基盤技術として、組織再生効率向上のための条件最適化、および、その詳細なメカニズムを解明することにより、広汎型侵襲性歯周炎患者に対する歯周組織再生療法の確立を目指している。本手法の大きな特徴は、あらゆる材質の多孔質体に対して、効率的かつ簡便にヘパリン分子を結合させることが可能なことであり、また、ヘパリンとの静電的相互作用を介して Basic fibroblast growth factor (bFGF) をかつ活性を高度に保持する高活性で固定化することが可能なことである。本表面修飾システムを、生体吸収性を有する α TCP多孔質体に適応し、その組織再生活性を小・大動物により実証するのが目的である。

まずは、調製する修飾 α TCP多孔質体スキャホールドの、物質を特定する必要がある。ペプチド修飾、ヘパリン化処理、bFGF固定化、さらに、bFGFの安定性などを、放射性同位元素トレーサー実験により

定量的に解析した。結果、 α -TCP への bFGF の固定化量は十分量であり。また、固定化後の bFGF リリースは全体の 20%程度とその安定性も確認された。予備的評価として行ったマウス皮下埋入試験の結果によると、ペプチド・ヘパリンを介して bFGF を固定化した際の組織誘導効率の大きな向上が確認され、一方、直接 bFGF を吸着させた α -TCP ではその効果は得られず、これまで、他のマトリックスで確認してきた効果が α -TCP で同様であることが定量的に明確になった。

さらに、 α -TCP をヘパリン化、あるいはヘパリンを介して bFGF を固定化した試料の硬組織再生活性を検討した。ラット頭蓋骨モデルでは、 α -TCP が初期骨再生能を促進させ、また、骨形成の起点部位となる可能性が示された。この結果に基づき、イヌ顎骨再生モデルでは、2 週においては bFGF 群で結合組織が残存 α -TCP 顆粒を取り囲む様に形成され、血管新生と破骨細胞を認め、活発な骨形成を実証することができた。さらに、今年度は、イヌ歯周疾患モデルの作成を完了した。

Bone defects attributed to severe periodontitis, trauma, and injury are frequently encountered in the fields of oral implant and orthopedics. Autogenous bone grafting has several disadvantages including the second surgery and the limited supply of bone, and artificial bone grafts are promising alternatives. Tricalcium phosphate (TCP) is a bioresorbable bone substitute used for oral implants and in orthopedics, which is thermodynamically stable and shows higher solubility than beta-TCP. We have been studying the porous TCP as a scaffold but the osteoinduction for bone-regeneration is not satisfactory. Then we originally developed a novel basic fibroblast growth factor (bFGF) immobilizing technique using cationic peptides and heparin as interface modifiers. The effect of porous alpha-TCP with immobilized bFGF on bone regeneration was proved in rat model preliminary, and more evaluations in rat models and large animal defect models were carried out this year. Each point in the evaluations was reported below.

1) Immobilization process of the surface modifying peptide, heparin, and bFGF onto alpha-TCP was evaluated quantitatively using radioisotope experiments. The peptide immobilization greatly improved heparin immobilization through the electrostatic interaction. The immobilized heparin improved the activity of immobilized bFGF via the biological interaction of heparin and bFGF that is considered to inhibit the inactivation of bFGF.

2) A line of experiments disclosed the following three results: (1) Heparinized alpha-TCP induced superior bone formation than that of intact alpha-TCP; (2) Heparin stained at blue can be a starting point of the new bone formation; (3) Heparin was only conserved at the interface of bone and granules. These results indicate that the heparinization of alpha-TCP might be a usable technique to enhance the bone forming capability of α -TCP.

3) Histological evaluation were performed two, four and eight weeks after implantation. Histological evaluation two weeks after implantation revealed that the porous alpha-TCP had degraded and bone had formed on the surface of α -TCP particles in the bFGF group. At eight weeks, continuous cortical bone with a Haversian structure covered the top of bone defects in the bFGF group.

4) Micro CT analysis showed the two wall bone defects (3.5 x 3.5 x 4 mm) were created. Supporting bone and cementum of the teeth were removed with steel burs and the exposed surfaces of the teeth were smoothed.

5) Human mesenchymal stem cells (hMSC) were well grown on porous alpha-TCP with bFGF bound via heparin (bFGF group) using actin staining image. The gene expression of Runx2 and alkaline phosphatase, which is osteoblasts differentiation in hMSC of the bFGF group is significantly higher than that of control group.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 1 件)

1. Kobayashi N, Hashimoto Y, Otaka A, Yamaoka T, Morita S. Porous alpha-tricalcium phosphate with immobilized basic fibroblast growth factor enhances bone regeneration in a canine mandibular bone defect model. Materials 2016; 9 (10) Article number 853.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Enhanced tissue infiltration into porous scaffolds by active growth factor-immobilizing technology, 招待講演, YAMAOKA T, KAKINOKI S, HASHIMOTO Y, BABA S, 11th International Conference Medical Applications of Novel Biomaterials & Nanotechnology (CIMTEC2016), 2016/6/7, 海外.
2. 多孔質スキャホールド内部への組織誘導に及ぼす表面特性の影響, 口頭, 山岡哲二, 安田裕貴, 神戸裕介, 岩崎靖彦, 柿木佐知朗, 第 45 回医用高分子シンポジウム, 2016/7/25, 国内.
3. 融合ペプチドの修飾によるシルクフィブロインゲルへの血管誘導能の付加, 口頭, 神戸裕介, 村越成恵, 浦川宏, 木村良晴, 山岡哲二, 第 65 回高分子討論会, 2016/9/16, 国内.
4. Peptide modification to enhance the angiogenesis into silk fibroin hydrogels, ポスター発表, Kambe Y, Murakoshi A, Urakawa H, Kimura Y, Yamaoka T, TERMIS-AM, 海外.
5. 虚血性疾患への利用を目指した血管誘導性シルクフィブロインゲルの開発, 口頭, 神戸裕介, 村越成恵, 浦川宏, 木村良晴, 山岡哲二, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/8, 国内.
6. Kobayashi N, Hashimoto Y, Otaka A, Yamaoka T, Morita S, Effect of porous alpha-tricalcium phosphate with immobilized basic fibroblast growth factor on bone regeneration in a canine mandibular bone defect model, IDMC 2016 2016.11.5. Bali, Indonesia. 海外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当無し