

氏 名	佐 竹 通 子
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 691 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	RANKL 結合ペプチドと BMP-2 併用による骨再生のための新規足場材料開発 一穴あき CHPA ハイドロゲルの分解挙動と骨伝導能一
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 竹 下 克 志 (委 員) 教 授 吉 村 浩太郎 教 授 秋 山 達

論文内容の要旨

1 研究目的

我々は、局所の骨再生に BMP(Bone morphogenetic protein)-2 に receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) 結合ペプチドを併用することで、高用量の BMP-2 を使用する際に懸念されたリスクを抑制しながら、低用量の BMP-2 で骨を造成する技術を開発してきた (Sugamori et al. BioEssays. 2016)。RANKL 結合ペプチドは、骨形成シグナル[Ikebuchi et al.Nature. 2018]、さらに morphogenetic protein (BMP) -2 による骨形成を促進する[Sugamori et al. BioEssays. 2016]。また、BMP-2 シグナルと骨形成遺伝子の発現を増強し、骨芽細胞分化と異所性骨形成を促進することもわかっている [Furuya et al. J. Biol. Chem.2013]。

ペプチドを徐放できる足場材料としてアクリロイル基置換コレステロール置換ナノゲル (CHPOA) が知られており、CHPOA は RANKL 結合ペプチドの凝集を抑制しながら、ペプチドを活性型に変化させる作用をもっている。今回、CHPOA にアクリル酸を用いてアクリロイル基を修飾した、新しいナノゲルである CHPA が開発された。CHPA は CHP-OA に比べて分解速度が速く、これまで舌組織の再建に用いられたが、CHPA が十分な骨伝導能を有するかどうかについては、わかっていない。そのため本研究では、第一に CHPA と CHPOA の分解挙動を明らかにすることとした。第二に、足場材料として CHPA を用いた際に、CHPA が足場材料として有用であるかを検証し、第三に、歯科用 CAD/CAM (Computer - aided design / computer - aided manufacturing) 装置で足場材料の鋳型を作成することで、足場材料に 300~400 μ m の穴を付与し、穴の有無が足場材料の有用性を高めるか否か、の 3 点について検証することを目的とした。

2 研究方法

【実験 1】CHPOA と CHPA の分解速度解析

pH7.4 の緩衝液に CHPOA と CHPA を 100 倍の体積で浸漬し、CHPA は 10 日目まで、CHPOA は 55 日目まで経時的にナノゲルの分解挙動を解析した。その後、pH6.0、7.4、8.0 の 3 種類の緩衝液に同様の体積比で浸漬し、CHPA は 10 日目まで、CHPOA は 65 日目まで経時的にナノゲルの分解挙動の解析を行い、pH による分解挙動の違いについて検証した。それぞれ分解されたナノゲルの定量は、フェノール硫酸法により評価した。

【実験 2】CHPA に付与した穴の有無による足場材料の有用性の違いについての検証

CHP-A に 300~400 μ m の穴を付与し、穴の有無による骨再生の評価を行った。直径 3.5mm のマウスの頭蓋骨欠損部に足場材料を静置し、6 週間の観察期間を設け、実験を行った。

実験群は以下の通りに設定した (n=4)。

1. Control 群：足場材料を静置しない
2. CHPA (穴あり/なし) + 溶媒 (LF6 buffer 2 μ L+ DMSO 5 μ L)群
3. CHPA (穴あり/なし) + BMP-2 2 μ g,群
4. CHPA (穴あり/なし) + OP3-4 0.66 mg 群
5. CHPA (穴あり/なし) + BMP-2 2 μ g + OP3-4 0.66 mg 群

in vivo μ CT による X 線学的評価を行い、さらに、in vivo IVIS による分解速度の解析、蛍光色素によるラベリングを行い、安楽死後、 μ CT、pQCT などによる X 線学的解析と組織学的解析を行った。

3 研究成果

CHPA は CHPOA より速く分解された。2 つの足場材料は pH 値が高いほど速く分解され、酸性下ではほとんど分解しなかった。CHPOA は中性下においても 40 日間ほとんど分解されなかったが、CHPA は 3 日目から分解が始まり、その後急速に分解が加速し、10 日目に 60~70%に達した。CHPA に 300~400 μ m の穴を付与する群と付与していない群について比較すると、穴を付与した群は、OP3-4 と BMP-2 を併用した群では有意に再生骨の増加が認められ、骨代謝活性、骨伝導においても有意に増加が認められた。また OP3-4 と BMP-2 を併用した群において穴のある CHPA は穴のない CHPA よりも分解速度が遅かった。

4 考察

一般的に、創傷部位は酸性であり、治癒とともに中性に変化していく [Bischoff, D.S et al. J. Cell. Biochem.,2008, Li, S. et al. Exp. Dermatol.2020]。足場材料静置後、足場材料周囲の環境は酸性であり、その後中性に変化していく。実験 1 の結果より、CHPOA は観察期間中、ほとんど分解できず、適切なタイミングでシグナル分子の徐放が行えないのではないかと考えた。一方、CHPA は徐々に分解が進み、適切なタイミングで骨芽細胞を分化でき、再生骨の形成を促進するシグナル分子も徐放できるのではないかと考えた。そのため、実験 2 の足場材料として CHPA を選択し、実験を行った。

実験 2 では CHPA が足場材料として有用であるか否か、また、穴を付与することで、足場材料としての有用性が高まるかについて検証した。その結果、穴を付与した群にシグナル分子として OP3-4 と BMP-2 を併用した群は付与していない群に比べ、分解が遅い一方、有意に骨再生の増加が認められ、骨代謝活性、骨伝導能も上昇していた。これは、穴の付与で、足場材料と生体組織の接触面積が増加し、凍結乾燥によって接触面のゲル密度が増加することで分解しにくくなり [Shimoda, A. et al. Colloids Surf. B Biointerfaces.2012]、この結果、in vitro で分化初期だけでなく分化後期にも骨芽細胞分化を促進することが示されている [Sugamori, Y. et al. BioEssays.2016]、RANKL 結合ペプチドが持続的に徐放できるようになり、骨再生の増加につながったのではないかと考えた。また、OP3-4 と BMP-2 を併用した群は、溶媒のみを含浸させた

群に比べて、分解速度が遅かった。これは、CHPA 作製の最終段階で添加されるフィブロネクチンが、エステラーゼなどの酵素による分解から足場材料を保護しており[Sato et al. Sci. Rep. 2018]、フィブロネクチンにペプチドが添加されることで足場材料表面にタンパク複合体が作られ、さらに分解が遅れる一因になったのではないかと考えた。足場材料の分解が遅いことがどのように骨形成に結びつくかを解明するためには、CHPA 足場材料から徐放されるシグナル分子の徐放挙動についてさらに検証する必要があると考える。

また、骨伝導能においては、BMP-2、OP3-4 いずれか 1 つのみ含浸させた群と、OP3-4 と BMP-2 を併用した群の違いについては穴を付与した足場材料のみで有意差がみられた。なぜ、BMP-2 と OP3-4 を組み合わせた足場材料だけに有意差がみられたかについては今後さらに検討する必要があると考えられる。

5 結論

CHPA は、マウス頭蓋骨欠損モデルにおいて RANKL 結合ペプチドと BMP-2 をシグナル分子として用いる際に、局所的な骨再生に有用な新規足場材料として有用である。

さらに、歯科用 CAD/CAM 装置で作製した鋳型を用いて 300-400 μ m の大きさの穴を付与した CHPA 足場材料は、穴を付与していない足場材料に比べて有用性が高まり、OP3-4 と BMP-2 による局所骨形成に適した構造となった可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

歯科・整形外科などで骨再生の要請の強い疾患は多い。佐竹氏の論文はシグナル分子として BMP-2 と RANKL 結合ペプチドを添加した新規足場材料についての研究である。担体として Cholesterol-bearing pullulan(CHP)ナノゲルのうち、末端チオール化ポリエチレングリコールで架橋し安定化させた CHPOA と更に修飾した CHPA における骨伝導能の比較を行い、最適化された穴の有無による相違について比較した。CHPA で骨伝導能が高く、穴を加えると骨伝導能が高かった。

いずれも今後の臨床応用に際して新しい知見でシグナル分子と足場材料の最適化に向けて寄与する結果である。考察に記されているようにシグナル分子の挙動などの課題が残っており、今後の研究に期待される。実験手法や骨定量評価、結果の解釈も適切であり、学位論文に値する研究である。

最終試験の結果の要旨

佐竹氏の論文はシグナル分子として BMP-2 と RANKL 結合ペプチドを添加した新規足場材料についての研究である。担体として Cholesterol-bearing pullulan(CHP)ナノゲルのうち、末端チオール化ポリエチレングリコールで架橋し安定化させた CHPOA と更に修飾した CHPA における骨伝導能の比較を行い、最適化された穴の有無による相違について比較した。CHPA で骨伝導能が高く、穴を加えると骨伝導能が高かった。新しい知見でシグナル分子と足場材料の最適化に向けて寄与する結果である。

オンライン面接において委員から臨床応用を視野にした質問や実験手法に対する問い、課題への対応についての照会があり、佐竹氏より適切な回答がなされた。医学博士に求められる実験遂行力、科学的思考や議論の能力を備えており、合格と判断する。