

令和元年5月22日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06751

研究課題名(和文)臨床応用へ向けた温熱刺激による新規骨形成法

研究課題名(英文)Heat-stimuli-enhanced osteogenesis for clinical application

研究代表者

大田 剛広 (OTA, Takehiro)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30801451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的に使用可能な加温担体、人工骨、加温機器を用いてラット、ウサギ両種における臨床応用に向けた動物モデルを作成した。

週一回、45度15分の温熱刺激においてラット、ウサギ両種でmicroCTや組織学的検査にて有意な骨形成が確認できた。力学的強度も増す可能性が示唆され温熱刺激により石灰化促進効果や骨代謝亢進が生じていると考えられた。

本研究では動物モデルに深刻な副作用は生じず、安全に温熱刺激が行えることが確認されたため、近い将来安全性の確認を主眼においたヒトにおける第一相の臨床研究を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病気や事故により欠損した骨に対する治療方法は現状限られており、早期に骨形成を生じる方法について研究が必要な状態である。

本研究により適切な温度、時間、頻度の温熱刺激が骨形成を促進することが確認された。また、熱傷など明らかな副作用は認められなかった。

複数の動物モデルで骨形成促進効果を確認できたことからヒトでも同様の効果があることが示唆され、将来的に骨欠損の治療方法の新たな選択肢となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We used clinically applicable materials, HA and Ferucarbotran composite, for hyperthermia in the rat and rabbit, and found that once a week hyperthermia (45-degree, fifteen minutes) once a week effectively induced significantly more newly formed bone in the defect. No severe side effects were apparent throughout the experiments. These results show that appropriate heat-stimuli with clinically applicable heating materials can promote enhanced osteogenesis, and that this procedure with combination materials may be a promising treatment option for bone defects in various skeletal diseases in the future.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：骨形成 温熱治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨腫瘍切除や骨折後の偽関節により生じる大きな骨欠損は治療に難渋することが知られている。本邦では骨欠損に対して自家骨移植が第一選択であったが、採取量の制限や採取部位の障害が問題となっており人工骨が広く使用されている。人工骨は有用ではあるものの骨誘導能を有していないため骨形成速度は自家骨移植と比べ劣り、骨性再建における適応は限られているため、新規骨形成技術の開発が必要となっている。我々は、悪性腫瘍に対してマグネタイト(磁鉄鉱)を用いた局所温熱療法の臨床試験を実施していることからその基礎実験において、温熱刺激により抗腫瘍効果以外に旺盛な骨新生がみられることを発見し、「温熱刺激により骨形成が促進される」という仮説を立てた。

In vitro 実験では、温熱刺激による骨芽細胞の活性亢進や骨前駆細胞分化の促進が報告されているものの、生体内で温熱刺激が骨形成に及ぼす効果についてはほとんど研究されておらず、実際に骨形成に有用な温度は不明であった。我々は、ラット脛骨欠損部にマグネタイトを包埋したモデルにおいて、交番磁場下で生じる 43~46 度の局所温熱刺激が生体内で骨形成を促進することを確認し、特許出願および国際特許(PCT)出願を果たしている。

2. 研究の目的

我々は、悪性腫瘍に対してマグネタイト(磁鉄鉱)を用いた局所温熱療法の臨床試験を実施していることからその基礎実験において、温熱刺激により抗腫瘍効果以外に旺盛な骨新生がみられることを発見し、「温熱刺激により骨形成が促進される」という仮説を立てた。

本研究の目的は、今後の臨床応用に向けて、実臨床で使用可能な保険収載されている材料と加温機器を組み合わせ動物モデルを作製し、臨床応用に向けた最適な加温システムを開発することである。本研究では、将来的な臨床応用を見据え、実臨床で使用可能な保険収載されている人工骨、マグネタイト、加温機器を組み合わせた温熱刺激による新規骨形成促進法を確立するために、マウス骨芽細胞株(in vitro)およびラット、ウサギ2種類の動物モデル(in vivo)において温熱刺激の基礎実験を行い、臨床応用に向けた基礎データを蓄積する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラットおよびウサギ骨欠損モデルによる加温法の確立

先行研究で確立された加温プロトコールと新生骨の評価法を用いて、ウサギでも同様のモデルを作製し骨形成評価を行う。温熱刺激の回数により標的部位の骨形成能が異なることが予想されるため、単回と複数回の加温プロトコールを検討して、最適な加温条件を抽出する。マグネタイトを陰圧下に浸漬させた人工骨(リジェノス®株式会社クラレ)を移植前に作製する。ラット、ウサギ両種の脛骨(片側のみ)に骨孔(ラット;3mm大、ウサギ;8mm大)を専用ドリルで作製し、マグネタイト浸漬リジェノスを移植する。45度15分間の加温を交番磁場下で行う。

(2) 加温群と対照(非加温)群における新生骨の画像および組織学的評価、分子学的評価

新生骨量を画像および組織学的に評価する。画像評価は、軟X線およびマイクロCTを用いて行い、人工骨内および周囲の新生骨を定量化する。マイクロCTにより標的部位の骨量、骨梁幅、骨梁数など骨構造パラメータを算出し、加温していない対照群と比較する。組織学的評価としては、標的部位を含む切片を作製し、骨欠損部の骨形成について組織染色(ALP、TRAP染色)を行う。また、非脱灰標本による Villanueva Goldner 染色にて骨形成パラメータ(類骨面、骨芽細胞面、骨石灰化面、石灰化速度)、骨吸収パラメータ(骨吸収面、破骨細胞数)を計測し、組織形態学的検討を行う。

標的部位の組織を一部採取して、骨形成マーカーである ALP、osteocalcin、BMP など各 mRNA の発現量を RT-PCR を用いて評価する。

(3) 加温群と対照群における脛骨の力学的解析

標的部位を含む脛骨を切除して、外部検査機関にて3点曲げ試験を行う。骨力学パラメータである最大荷重、剛性、破断エネルギーについて算出し、対照群と加温群の間で比較、検討する。

(4) ヒトへの臨床応用

腫瘍切除後、骨折や偽関節のため骨欠損部に人工骨移植を行う適応の患者に対して、本技術による骨形成促進作用を実証する。人工骨にはリゾビストを浸漬させ、術後にサーモトロン RF8 により温熱療法を開始する。医師主導臨床試験として、生命倫理審査委員会へ臨床研究申請を行う。

4. 研究成果

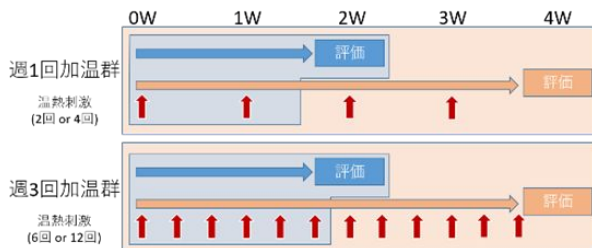
(1) ラットおよびウサギ骨欠損モデルによる加温法の確立

適切な研究が行えるよう複数の加温モデルをラット、ウサギにて構築した。諸条件を変更しながら至適条件を検討し、最終的に下記図 A,B に示す通り加温方法を確立した。

A. ラットモデル作製と加温条件の検討

ラット骨欠損モデル protocol

- SD rat 8週齢 (n=64)
- 脛骨内側に3mm大の骨孔作製
- 加温材料を移植



加温材料作成と温度変化

- リゾビストを濃縮しリジェノスに吸着
 - リゾビスト
 - ✓ 1ml→150 μ l (鉄換算27.9mg)
 - 顆粒状リジェノスを加工
 - ✓ 10粒(100mg)

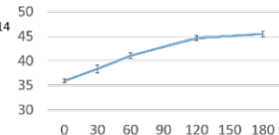


- AMFを用いて加温

➢ 45度 15分間

Ikuta et al. Int J Hyperthermia. 2014

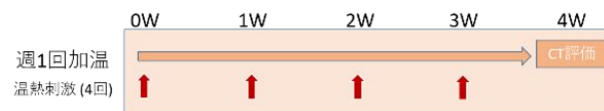
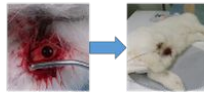
ラット移植時温度変化



B. ウサギモデル作製と実際の加温条件

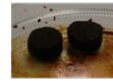
ウサギ骨欠損モデル protocol

- NZ white rabbit matured (n=10)
- 脛骨内側に8mm大の骨孔作製
- 加温材料を移植



加温材料の作成と温度変化

- リゾビストを濃縮しリジェノスに吸着
 - リゾビスト
 - ✓ 1ml→150 μ l (鉄換算27.9mg)
 - ブロック状リジェノスを加工
 - ✓ 2粒(50mg)

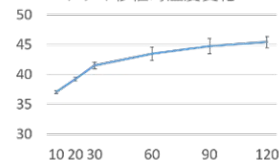


- AMFを用いて加温

➢ 45度 15分間

Ikuta et al. Int J Hyperthermia. 2014

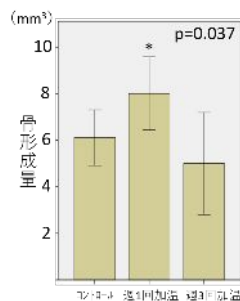
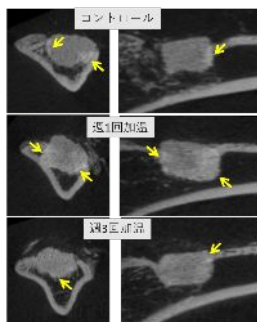
ウサギ移植時温度変化



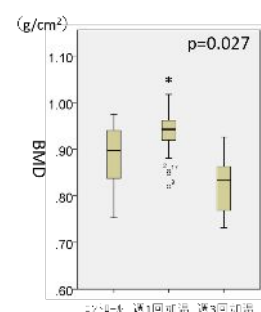
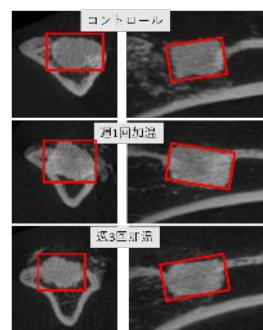
(2) 加温群と対照（非加温）群における新生骨の画像および組織学的の評価、分子学的の評価
作成したモデルを XP, microCT にて画像評価を行った。単純 XP では評価が困難であったため microCT の撮影条件を同条件で数値化、比較検討した。図 A-C でラットでは 2, 4 週で、ウサギでは 4 週で加温骨で有意な骨形成が観察された。また、図 D で示す通り、組織学的検査においても加温群で石灰化骨の有意な増加と骨代謝の亢進が確認できたことから、加温により骨形成が促進されたと考えられた。一方で分子学的評価については測定サンプルの誤差と思われるエラーが多く統一した検討、評価方法が確立できず実施できなかった。

A. ラット加温群と対照群における新生骨の画像的評価（2 週）

ラット microCT 人工骨内骨形成量 2週

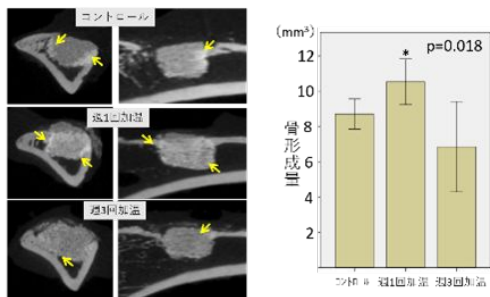


ラット microCT 人工骨内骨形成量 2週

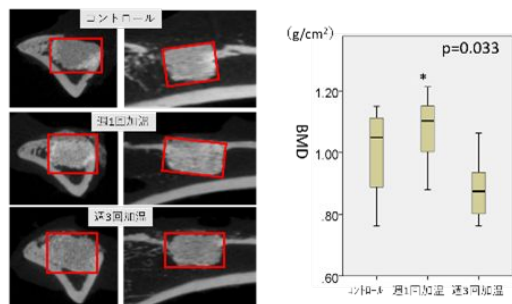


B. ラット加温群と対照群における新生骨の画像的評価（4週）

ラット microCT 人工骨内骨形成量 4週

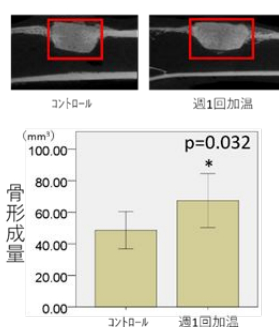


ラット microCT 人工骨内骨形成量 4週

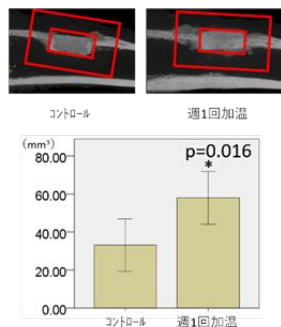


C. ウサギ加温群と対照群における新生骨の画像的評価（4週）

ウサギ microCT 4W 人工骨内骨形成

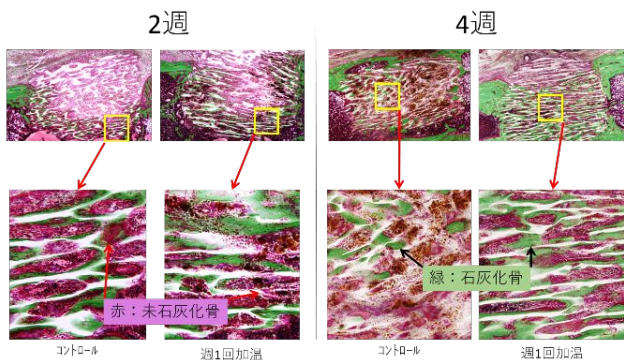


ウサギ microCT 4W 人工骨周囲骨形成



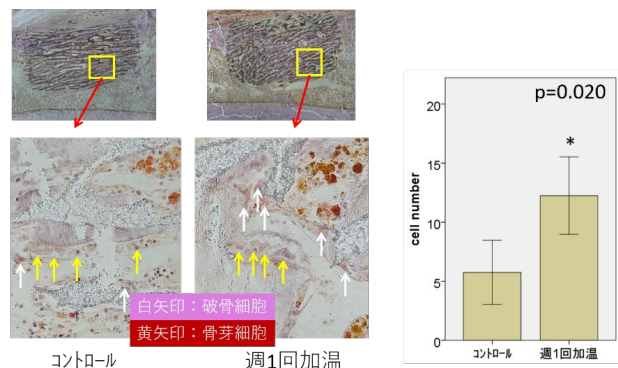
D. 加温群と対照（非加温）群における新生骨の組織学的評価（2週、4週）

ラット Villanueva-Goldner染色



加温群で石灰化が促進

ラット TRAP/ALP染色 4週



加温群において骨代謝が亢進

(3) 加温群と対照群における脛骨の力学的解析

力学的解析については骨形成がある程度進行した実験開始4週後に45度週1回加温群と対照群において行った。下図に示す通り、加温群の方が対照群よりも破断までに要するエネルギーや破断に至るまでの変位が大きいことが確認された。最大荷重や骨の硬さについては有意差を認めなかった。このことから加温群ではこれまでの画像上、組織学的評価上で認められた骨形成促進効果を反映して実際に強度が増強していると考えられた。

最大荷重 (N)	加温あり	なし	破断変位 (mm)	加温あり	なし
	91.82	123.69		2.88	1.41
	86.32	111.11		2.42	2.73
	137.12	81.32		1.79	1.49
平均	105.0867	105.3733	平均	2.363333	1.876667

stiffness (N/mm)	加温あり	なし	エネルギー (N.mm)	加温あり	なし
	128.7	223.3		181.995	93.34
	198.96	184.86		144.61	218.345
	184.85	113.77		130.849	67.635
平均	170.8367	173.9767	平均	152.4847	126.44

(4) ヒトへの臨床応用

本研究を含む基礎研究の結果から適切な加温により骨形成促進効果が得られる可能性が高いと判断し、転移性骨腫瘍切除後欠損部に処理した人工骨を充填して温熱治療を行う特定臨床研究を検討している。実際の加温についてはすでにかんによる温熱治療として保険適応がある加温装置を使用する予定である。また本研究では動物モデルにおいて明らかな副作用は認めなかったものの、特定臨床研究では第一相試験とし、安全性の検証をプライマリーエンドポイントとして研究計画を策定し現在当院 IRB へ申請、審査中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：西田 佳弘

ローマ字氏名：(NISHIDA, yoshihiro)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：病院教授

研究者番号(8桁): 50332698