

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10968

研究課題名(和文)骨再生療法への炭酸ガスの応用

研究課題名(英文)Application of carbon dioxide to bone regeneration therapy

研究代表者

新倉 隆宏(Niikura, Takahiro)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40448171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：難治性骨折や骨欠損の治療には非常に難渋するが、実臨床で使用可能な骨修復促進法は非常に少なく、新たな治療法の開発が切望されている。本研究では、実用可能な新規骨修復促進法へと発展させるべく、「現在臨床使用されている既存の治療手段に炭酸ガス経皮吸収療法を組み合わせることで、骨再生に相加・相乗効果が得られる」という仮説を検証した。骨延長術に炭酸ガス経皮吸収を併用すると血管新生、軟骨内骨化の促進によって骨再生が加速することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全骨折の5-10%は治療過程が遷延したり、あるいは治癒しないと言われている。超高齢社会を迎えているわが国では骨粗鬆症患者の増加と共に、骨折患者が更に増加していくことが見込まれている。今後骨折患者は増加が見込まれているため、全骨折の5-10%が難治化すると、その患者数は相当なものとなる。このような難治性骨折あるいは骨欠損の治療には非常に難渋するが、実臨床で使用可能な骨折治療促進法は非常に少なく、新たな治療法の開発が切望されている。本研究では骨延長術と炭酸ガス経皮吸収療法の併用が有効な、新規治療法になる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：It is challenging to treat intractable fracture nonunions and bone defect. Clinically available methods to treat these cases is limited and to develop a new approach is desired. The purpose of this study was to examine a hypothesis that a combined therapy of distraction osteogenesis and carbon dioxide therapy exerts synergistic or additive effects to regenerate bone. Our results of the investigation revealed that an addition of carbon dioxide therapy to distraction osteogenesis accelerated bone regeneration via up-regulation of angiogenesis and endochondral ossification compared to distraction osteogenesis alone.

研究分野：骨再生

キーワード：炭酸ガス 骨再生 骨延長

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全骨折の5-10%は、治癒過程が遷延(遷延治癒)したり、あるいは治癒しない(偽関節)と言われている。超高齢社会を迎えているわが国では骨粗鬆症患者の増加と共に、骨折患者が更に増加していくことが見込まれている。高齢は骨折治癒遷延の危険因子の一つであり、その他、生物学的活性が低下し骨折治癒遷延・不全の危険因子となるものには災害や交通事故、労災事故といった高エネルギー外傷、さらには喫煙、糖尿病という生活習慣・生活習慣病も関与する。今後骨折患者は増加が見込まれているため、全骨折の5-10%が難治化すると、その患者数は相当なものとなる。このような難治性骨折の治療には非常に難渋するが、実臨床で現在使用可能な骨折治癒促進法は非常に少なく、新たな治療法の開発が切望されている。

我々は、新開発の炭酸ガス経皮吸収システムを用いて、その生体へ及ぼす作用について研究してきた。このシステムは炭酸ガスを効率よく経皮吸収するよう開発されたハイドロジェルを皮膚に塗布し、炭酸ガスを作用させるだけという非常に簡便なシステムであり、したがって臨床応用もし易いという特徴がある。我々はこれまでに、この炭酸ガス経皮吸収システムをヒトに用いると、生体内で Bohr 効果を介して局所組織内での酸素化が促進されること、局所への血流が増強することを報告している[1]。

骨折治癒において局所の血流は、骨折部への栄養供給やガス交換のみならず、骨折治癒を左右する全身因子の供給源でもあり、重要な役割を果たしている。したがって、骨折へ炭酸ガス経皮吸収を適用すると、骨折局所の血流を増強し、骨折治癒に有利に働くことが期待される。また、炭酸ガス経皮吸収によって褥創など創傷治癒が促進されることが知られている。我々が報告した Bohr 効果を介した局所酸素化促進作用はその基礎的な裏付けとなっており、骨折治癒においても治癒促進に働くことが期待される。このような背景のもと、我々は骨折治癒における炭酸ガス経皮吸収の影響を検討すべく、ラット大腿骨骨折モデルを用いて炭酸ガス経皮吸収を行う群と行わない対照群で骨折治癒過程を比較検討した。その結果、炭酸ガス経皮吸収によって骨折局所での血流増強、血管新生増強を伴い軟骨内骨化が加速され、骨折治癒が促進されるという結果が得られた[2]。この成果は複数の国際学会にて発表するとともに、2013年の第39回日本骨折治療学会での発表は独創性あふれる研究と評価され、学会賞を受賞するに至った。また、骨折患者に対する臨床試験を実施し、炭酸ガス経皮吸収は骨折患者に対して安全に、患肢血流を増加させることを報告し[3]、2017年の第43回日本骨折治療学会でも学会賞を受賞している。

我々の炭酸ガス経皮吸収療法は血流・血管新生促進、局所酸素化という創傷治癒における基礎とも言える作用を持つことから、単独だけでなく、既存の骨折治癒促進法とうまく組み合わせることで相加・相乗効果が期待できる。また、他の新規骨折治癒促進法を一から開発するよりも既存の確立された手段を有効活用し、さらに改良するアプローチの方がより確実性が高く、より早い臨床応用が期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床における新たな骨折治癒促進法へと発展させるべく、「難治性骨折の治療目的で現在臨床使用されている既存の治療手段に、我々の炭酸ガス経皮吸収療法を組み合わせることで骨再生に相加・相乗効果が得られる」という仮説を検証することと設定した。

#### (1) 骨延長術

仮骨を延長することで体内で新生骨を形成する臨床で骨欠損治療に実用されているものである。外傷をはじめ、骨感染症、骨腫瘍等により骨を失った患者に対して骨延長術は有用で確立された治療法であるが、長い治療期間を必要とすることが欠点である。患者は治療期間中、患肢に創外固定器の装着を強いられ、その間日常生活動作が著しく制限される。骨延長術による骨再生を加速できれば、治療期間を短縮でき、早期に創外固定器を外すことができ、患者にとって大きな利益となる。骨延長術に炭酸ガス経皮吸収療法を組み合わせることで骨再生が促進できるという仮説を検証することを、平成29年度から30年度にわたる研究目的とした。

#### (2) 低出力超音波パルス

現在日本の実臨床で最も多く使われている骨折治癒促進法である。骨折部に、パルス状に射出され、低出力であるという条件の超音波を照射すると、骨折部の細胞の分化を促進し骨折治癒促進に寄与すると報告されている。患者に侵襲を加えない手段であるので、治癒しづらい骨折症例ではよくこの治療法が適用される。しかし、この治療を行えば全ての症例で有効に作用し骨が治癒するわけではなく、その効果は限定的である。ただし侵襲の無い治療法というのは大きなメリットであるため、この効果を補助することができれば、多くの患者で骨折を治癒させるための手術を回避できる可能性がある。低出力超音波パルスに炭酸ガス経皮吸収療法を組み合わせることで骨再生が促進できるという仮説を検証することを、平成30年度から31年度にわたる研究目的とした。

### 3. 研究の方法

難治性骨折の治療目的で現在臨床使用されている既存の治療手段である骨延長術と低出力超音波パルスを組み合わせ、骨再生に対する効果を検証した。

#### (1) 骨延長術と炭酸ガス経皮吸収療法の併用効果についての研究

24週齢、メスの New Zealand white rabbit を使用した。片側下肢の脛骨に創外固定器を装着して骨幹部で骨切りを行う。1週間の待機期間を置いた後、1日1mm、計10mmの骨延長を行った。

患側下肢に炭酸ガス経皮吸収促進効果を有するハイドロジェルを塗布し、1日20分間、週5日間、炭酸ガスを経皮吸収させた。延長完了時、完了後2週、4週で安楽死させ、経皮吸収を行った炭酸ガス群20羽と行わなかった対照群20羽で、骨形成をX線学的、組織学的に、骨強度を力学試験にて評価し、比較検討を行った。また、治療部位の血管新生を組織学的に調べ、骨延長による再生の局所におけるmRNA (messenger ribonucleic acid)発現も検討した。

#### (2) 低出力超音波パルスと炭酸ガス経皮吸収療法の併用効果についての研究

12週齢、オスのSprague-Dawley ratを使用した。ラットの大腿骨にキルシュナー鋼線を髓内釘として挿入後、重錘落下による三点曲げで閉鎖性骨折を作成した。骨折後に処置を加えない群、超音波骨折治療のみ行う群、炭酸ガス経皮吸収のみ行う群、両方の治療を行う群という4つの実験群を作成した。これらにおいて骨折治癒過程をX線学的、組織学的に評価し、骨折部新生組織におけるmRNA発現、さらに骨強度を評価して4群での比較検討を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 骨延長術と炭酸ガス経皮吸収療法の併用効果についての研究

##### 1. X線学的評価

単純X線撮影を行い、骨形成を観察した。炭酸ガス群(CO<sub>2</sub>)の方が対照群(control)よりも骨形成が促進されていることが分かった。画像解析ソフトを用いて骨形成の程度を定量化したところ、炭酸ガス群では延長完了後4週で延長部のピクセル値が有意に高かった。マイクロCT評価では延長完了後2週において延長部骨の骨塩量と骨梁幅が炭酸ガス群で有意に高値であった(図1)。

##### 2. 組織学的評価

組織学的評価では炭酸ガス群で軟骨内骨化の促進、血管新生の増加を認めた。炭酸ガス群は対照群に比べて、延長完了後2週での軟骨形成が旺盛であった。炭酸ガス群の方が、骨延長部では延長完了時に、また、骨延長部周辺組織では延長完了時と延長完了後2週で新生血管数が有意に多かった(図2)。

##### 3. 骨強度評価

延長完了後4週に行った3点曲げによる力学試験では炭酸ガス群の方がultimate stressとfailure energyが有意に高かった(図3)。

##### 4. mRNA発現評価

骨折部新生組織において、炭酸ガス群の方が対照群よりもHypoxia inducible factor 1-a (HIF-1a), Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), Vascular endothelial growth factor (VEGF)の発現が延長完了後2週において有意に高かった。VEGF発現については延長完了時においても炭酸ガス群の方が対照群よりも有意に高かった。

炭酸ガス経皮吸収は、骨延長術における骨形成を促進する有用な併用療法として臨床応用が期待できる可能性を示せた。

#### (2) 低出力超音波パルスと炭酸ガス経皮吸収療法の併用効果についての研究

これまでに得られている成果として、ラットの大腿骨骨折部に、ヒトの治療と同様に低出力超音波パルスを照射する手技を確立した。低出力超音波パルスと炭酸ガス経皮吸収の両方を行った群は、どちらも行わない群に比べて骨折治癒が早い傾向をX線学的評価にて認めている。本実験では未だ全ての評価が終了しておらず仮説の検証までには至っておらず、実験を今後も継続していく。

### 引用文献

1. Sakai Y, Miwa M, Oe K, Ueha T, Koh A, Niikura T, Iwakura T, Lee SY, Tanaka M, Kurosaka M. A novel system for transcutaneous application of carbon dioxide causing an "artificial Bohr effect" in the human body. *PLoS One*. 2011;6(9):e24137.
2. Koga T, Niikura T, Lee SY, Okumachi E, Ueha T, Iwakura T, Sakai Y, Miwa M, Kuroda R, Kurosaka M. Topical cutaneous CO<sub>2</sub> application by means of a novel hydrogel accelerates fracture repair in rats. *J Bone Joint Surg Am*. 2014 Dec 17;96(24):2077-84.
3. Niikura T, Iwakura T, Omori T, Lee SY, Sakai Y, Akisue T, Oe K, Fukui T, Matsushita T, Matsumoto T, Kuroda R. Topical cutaneous application of carbon dioxide via a hydrogel for improved fracture repair: results of phase I clinical safety trial. *BMC Musculoskelet Disord*. 2019 Nov 25;20(1):563. doi: 10.1186/s12891-019-2911-7.

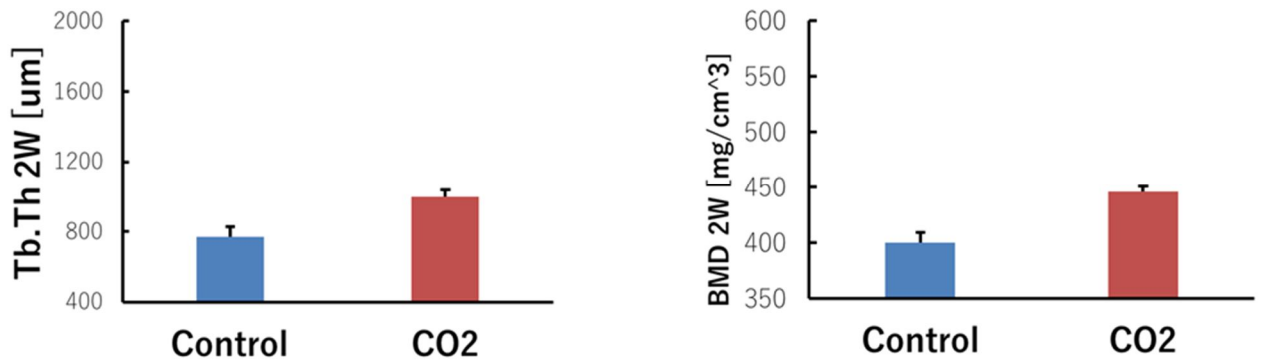


図1: マイクロCT評価では延長完了後2週において延長仮骨の骨梁幅(Tb. Th)と骨塩量(BMD)が、炭酸ガス経皮吸収を行った群(CO<sub>2</sub>)の方が対照群(control)よりも優位に高値であった。

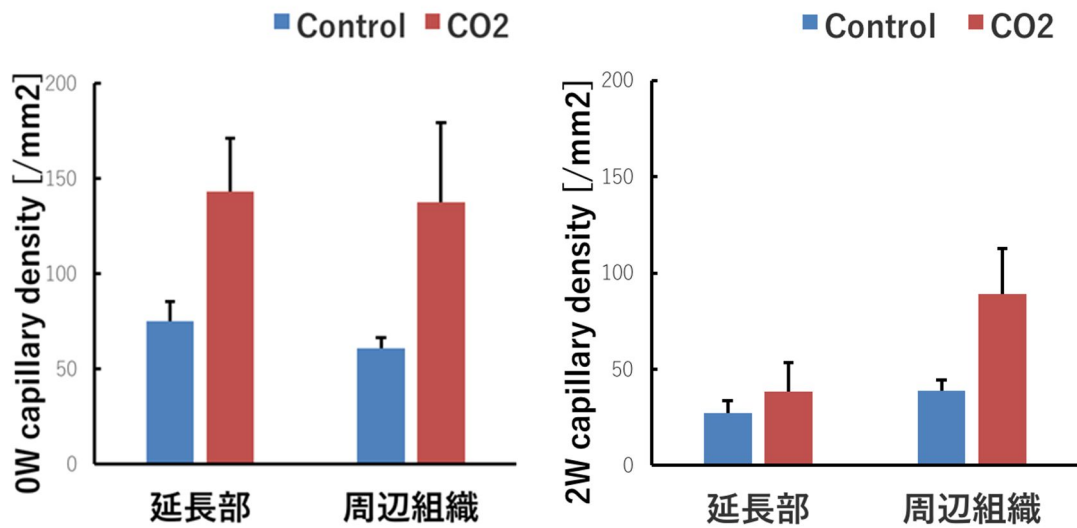


図2: 新生血管数を延長完了時(左)および延長完了後2週(右)に組織学的に評価、測定した。新生血管数は、骨延長部では延長完了時に、また、骨延長部周辺組織では延長完了時と延長完了後2週で炭酸ガス経皮吸収を行った群(CO<sub>2</sub>)の方が対照群(control)よりも有意に多かった。

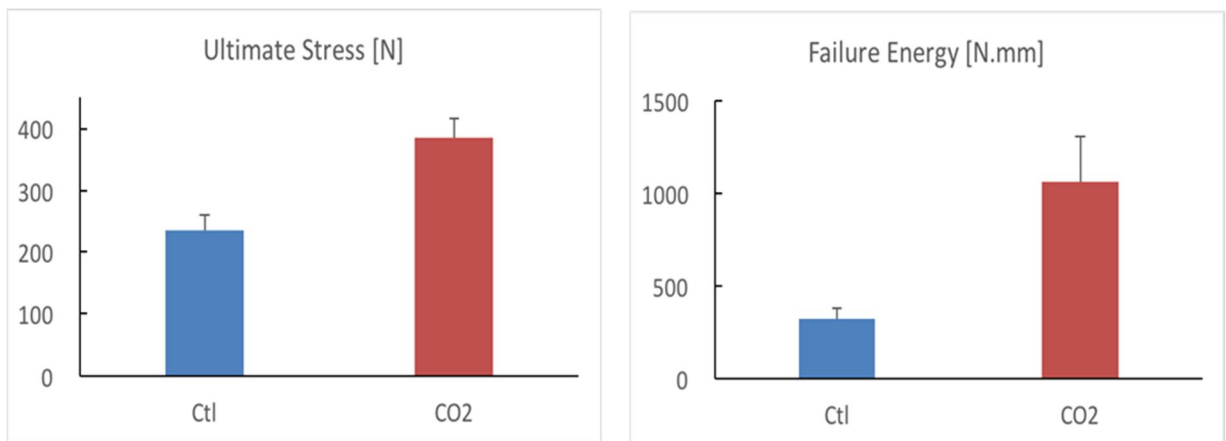


図3: 延長完了後4週に行った3点曲げによる力学試験(骨強度試験)では、炭酸ガス経皮吸収を行った群(CO<sub>2</sub>)の方が対照群(ctl)よりもultimate stressとfailure energyが有意に高かった

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yohei Kumabe, Tomoaki Fukui, Shunsuke Takahara, Yu Kuroiwa, Michio Arakura, Keisuke Oe, Takahiro Oda, Kenichi Sawauchi, Tomoyuki Matsumoto, Takehiko Matsushita, Shinya Hayashi, Ryosuke Kuroda, Takahiro Niikura	4. 巻 -
2. 論文標題 Percutaneous CO2 Treatment Accelerates Bone Generation During Distraction Osteogenesis in Rabbits	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Orthopaedics and Related Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 隈部 洋平、新倉 隆宏、福井 友章、高原 俊介、黒岩 祐、新倉 路生、大江 啓介、小田 崇弘、澤内 健一、黒田 良祐
2. 発表標題 炭酸ガス経皮吸収はウサギ脛骨骨延長術における骨形成を促進する
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Niikura
2. 発表標題 Topical cutaneous application of carbon dioxide by means of a hydrogel: A promising tool to assist fracture repair biologically
3. 学会等名 The 7th Seoul Symposium on Bone Health（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yohei Kumabe, Takahiro Niikura, Keisuke Oe, Tomoaki Fukui, Shunsuke Takahara, Yu Kuroiwa, Takahiro Oda, Kenichi Sawauchi, Ryosuke Kuroda
2. 発表標題 Effect of Transcutaneous Application of CO2 on Bone Regeneration in Distraction Osteogenesis
3. 学会等名 The 4th AOTrauma Asia Pacific Scientific Congress
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 隈部洋平 新倉隆宏 大江啓介 福井友章 高原俊介 黒岩祐 小田崇弘 澤内健一 黒田良祐
2. 発表標題 The effect of transcutaneous CO2 application on distraction osteogenesis of rabbit tibia
3. 学会等名 2018 TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society) World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 隈部洋平 新倉隆宏 大江啓介 福井友章 高原俊介 新倉路生 黒岩祐 小田崇弘 澤内健一 黒田良祐
2. 発表標題 The effect of transcutaneous CO2 application on distraction osteogenesis of rabbit tibia
3. 学会等名 The 16th Biennial Conference of the ISFR (International Society for Fracture Repair) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 隈部洋平 新倉隆宏 大江啓介 福井友章 高原俊介 黒岩祐 小田崇弘 澤内健一 黒田良祐
2. 発表標題 Effect of Transcutaneous Application of CO2 on Bone Regeneration in Distraction Osteogenesis
3. 学会等名 ORS (Orthopaedic Research Society) 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 隈部洋平 新倉隆宏 大江啓介 福井友章 高原俊介 黒岩祐 小田崇弘 澤内健一 黒田良祐
2. 発表標題 骨延長術における炭酸ガス経皮吸収の骨形成促進効果について
3. 学会等名 第32回日本創外固定・骨延長学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 隈部 洋平、新倉 隆宏、福井 友章、大江 啓介、高原 俊介、新倉 路生、黒岩 祐、小田 崇弘、黒田 良祐
2. 発表標題 骨延長術における炭酸ガス経皮吸収の骨形成促進効果について
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大江 啓介  (Oe Keisuke)  (20514623)	神戸大学・医学部附属病院・助教   (14501)	
研究分担者	福井 友章  (Fukui Tomoaki)  (50437688)	神戸大学・医学部附属病院・特定助教   (14501)	
研究分担者	李 相亮  (Lee Sang Yang)  (40533732)	昭和大学・医学部・講師   (32622)	