

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09079

研究課題名(和文) 注入型局所硬化ゲルを用いた幹細胞・成長因子送達による新規難治性骨折治療法の開発

研究課題名(英文) Delivery of Stem cell/growth factor using in situ-formed hydrogels for fracture repair

研究代表者

内田 健太郎 (Uchida, Kentaro)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：50547578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：局所硬化ゲルは過酸化水素とペルオキシダーゼの反応によりゲル化する性質を持つ。本研究ではデキストランおよびチラミンを主骨格にもつ局所硬化ゲルを作製し、成長因子徐放材としての有用性を検討した。その結果、デキストラン局所硬化ゲル(IFH-Dex)、ヒアルロン酸局所硬化ゲルはそれぞれ塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、骨形成蛋白-2(BMP-2)の徐放性に優れていた。bFGF含有IFH-Dexの投与により骨折モデルにおける骨形成が促進された。また、BMP2含有IFH-HAは難治性骨折モデルにおけ骨癒合を促進した。本結果からBMP2/IFH-HAは難治性骨折治療剤として有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

交通外傷による骨折は、骨膜組織の損傷や血流障害を伴い治療に難渋する。治療の長期化に伴う患者の社会復帰の遅延は、患者に肉体的・精神的苦痛を与えるとともに医療費の増加と社会経済的損失に直結する。本研究で開発した局所硬化ゲルは外傷患者の早期治療、早期社会復帰に寄与し得る。

研究成果の概要(英文)：Enzymatic crosslinking strategy using hydrogen peroxide and horseradish peroxidase is receiving increasing attention for application with in situ-formed hydrogels (IFHs). Several studies have reported the application of IFHs in cell delivery and tissue engineering. IFHs may also be ideal carrier materials for bone repair, although their potential as a carrier for basic fibroblast growth factor (bFGF) and bone morphogenetic protein (BMP)-2 has yet to be examined. Here, we examined the effect of an IFH made of dextran (IFH-Dex) and hyaluronic acid (IFH-HA) containing bFGF and BMP-2 in promoting osteogenesis in a mouse fracture model. Fracture sites injected with IFG-Dex/bFGF and IFH-HA/BMP-2 showed significantly greater bone volume, bone mineral content and bone union compared with sites receiving no treatment or treated with IFH alone. IFHs may be an effective growth factor delivery system for fracture repair.

研究分野：整形外科

キーワード：局所硬化ゲル 難治性骨折 骨癒合 成長因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の交通外傷受傷者は年間 90 万人にのぼる。交通外傷による骨折は、骨膜組織の損傷や血流障害を伴い治療に難渋する。治療の長期化に伴う患者の社会復帰の遅延は、患者に肉体的・精神的苦痛を与えるとともに医療費の増加と社会経済的損失に直結する。申請者は、早期治療、早期社会復帰を実現可能な難治性骨折治療法を開発すべく研究を行ってきた。申請者はコラーゲン材料、間葉系細胞、成長因子を駆使してゲル状の局所投与型およびシート状の移植型の骨形成促進剤の開発を行ってきた。前者は患部を展開することなく投与できる点、後者は局所に確実に骨形成促進剤を保持できるという利点があった。申請者等は局所投与型と移植型の利点を併せ持つ局所硬化ゲルの作製に成功した。しかし、難治性骨折治療における有用性は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では生体由来材料に架橋基を導入した幹細胞、成長因子搭載注入型局所硬化ゲルを用いた難治性骨折治療法の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. マウス骨折モデルに対するデキストラン局所硬化ゲルの有用性の検討

9 週齢雄性 C57BL/6J マウス大腿骨骨幹部骨折モデルを用いた。ゲル剤はデキストランまたはヒアルロン酸を主骨格、チラミンを架橋基とし、過酸化水素水と混和することでゲル化するものを用いた。骨折のみの群 (control 群)、骨折部に bFGF を含有 (1 μ g) させた局所硬化デキストランゲルを投与した群 (bFGF+Dex 群) 骨を作成した。各群において、骨折後 4 週で屠殺して大腿骨を採取後 micro CT を撮影し、新生骨量 (BV)、骨塩量 (BMC) を測定した。また組織学的検討を行った。IFH-Dex からの bFGF の徐放性を評価するために、0.5 mL のプラスチック製マイクロチューブに 1 μ g の bFGF を含有させた IFHG-Dex 25 μ L を注入し、次いで 200 μ L の PBS をチューブに追加した。マイクロチューブを 37 $^{\circ}$ C の恒温槽に留置し、開始後 1、4、8、24、48 時間の時点で、PBS を採取して新しい PBS に交換し、開始後 72 時間の時点まで PBS を採取した。bFGF は骨折治療の初期段階において未分化間葉系細胞に増殖促進作用を示すことが報告されているため 14、72 時間後までの観察とした。採取した各時間帯の PBS は -30 $^{\circ}$ C で保存し、市販の ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いて PBS 中の bFGF 濃度を推定した。

3-2. マウス難治性骨折モデルに対するデキストラン局所硬化ゲルの有用性の検討

マウス単純骨折モデルと同様の手順で骨切りおよび髓腔内固定を行ったあと、骨折部を中心に約 3 mm 幅の骨膜を全周性にバイポーラピンセットを用いて 1.2 W の電力設定で 10 秒間焼灼した。本研究の予備研究では、非焼灼モデルでは 4 週目に骨癒合が得られたが、焼灼モデルでは、焼灼部位での骨形成は不良であり、骨折後 6 週時点でも骨癒合は得られなかった。したがって、本研究ではこの骨膜焼灼モデルを難治性骨折モデルとした。焼灼のみの群 (control 群)、焼灼部に IFH-HA 25 μ L のみを投与した群 (IFH-HA 群)、2 μ g の BMP-2 含有 IFH-HA 25 μ L を投与した群 (IFH-HA /BMP 群) を作製した (各群 n = 16)。BMP-2 の投与量は過去の報告に準拠した 54。処置後 6 週で屠殺して大腿骨を採取後、各群とも 10 匹分の大腿骨は micro CT を撮影し、骨膜焼灼部における BV、BMC を測定したほか、骨癒合率の評価や組織学的評価を行った。残りの 6 匹分の大腿骨は新生仮骨における骨形成マーカー発現を real time PCR 法を用いて評価した。IFHG-HA からの BMP-2 の徐放性を評価するために、0.5 mL のプラスチック製マイクロチューブに 2 μ g の BMP-2 を含有させた IFHG-HA 25 μ L を注入し、次いで 200 μ L の PBS をチューブに追加した。マイクロチューブを 37 $^{\circ}$ C の恒温槽に留置し、1、4、8、24、48、96 時間、1、2、3 週間の時点で、PBS を採取して新しい PBS に交換し、開始後 3 週間の時点まで PBS を採取した。BMP-2 ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いて PBS 中の BMP-2 濃度を推定した (n = 5)。

4. 研究成果

bFGF+Dex 群は、control 群、Dex 群と比較して、BV、BMC とも有意に高値であった (p < 0.05)、control 群、Dex 群の間に BV、BMC の有意差はなかった。3D-CT 像では、bFGF+Dex 群は、control 群、Dex 群と比較して大きな新生仮骨を認めた (図 1)。組織学的評価では、bFGF+Dex 群は、control 群、Dex 群よりも大きい新生仮骨の形成を認めた。control 群、Dex 群の新生仮骨の大きさは同等であった。bFGF は最初の 4 時間のあいだに多く徐放され、その後の徐放量は低下するが、開始後 72 時間時点でも徐放は続いていた。

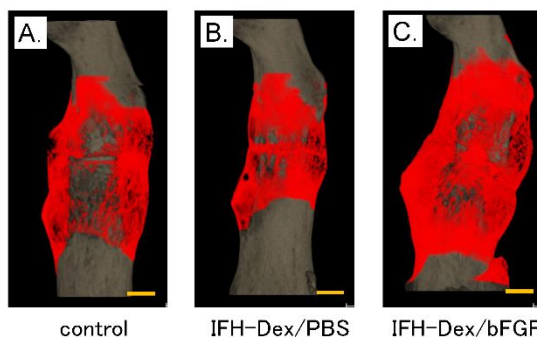


図 1. IFH-Dex/bFGF 投与後の μ CT 像

本研究では、1 μ g の bFGF と IFH-Dex を併用することで、マウスの単純骨折モデルにおいて骨形成促進し、大きな新生仮骨が形成された。先行研究では、マウス単純骨折モデルにおいて、

1 μg の bFGF と人工コラーゲンゲルを併用しても骨形成の促進には至らないことを示した。また、10 μg の bFGF と人工コラーゲンパウダーを骨折部位に投与しても骨形成は促進されなかった。本研究で用いた IFH-Dex は、局所硬化することで bFGF の拡散を最小限に防ぎ、その結果骨形成を促進し大きな新生仮骨を形成した可能性が考えられた。したがって、IFH-Dex は骨形成促進剤としての bFGF の担体として有用である可能性が示唆された。

IFH-HA/BMP 群は、control 群、IFHG-HA 群と比較して BV、BMC とも有意に高値だった ($p < 0.05$)。IFHG-HA/BMP 群は、micro CT 画像および組織切片標本において新生仮骨による骨折部の架橋を認め、骨癒合率も有意に高かった(図 2)。一方、control 群、および、IFH-HA 群では骨膜焼灼部における新生骨はほとんど認められなかった。骨膜焼灼部における新生骨の断面積は、IFHG-HA/BMP 群が有意に高かった。新生仮骨中の骨形成マーカー Alpl、Bglap、Osx の発現量は、IFH-HA/BMP-2 群が IFH-HA 群および control 群に比べて有意に上昇していた(図 3, $p < 0.05$)。一方、IFH-HA 群と control 群との間の骨形成マーカー発現量は同等であった。

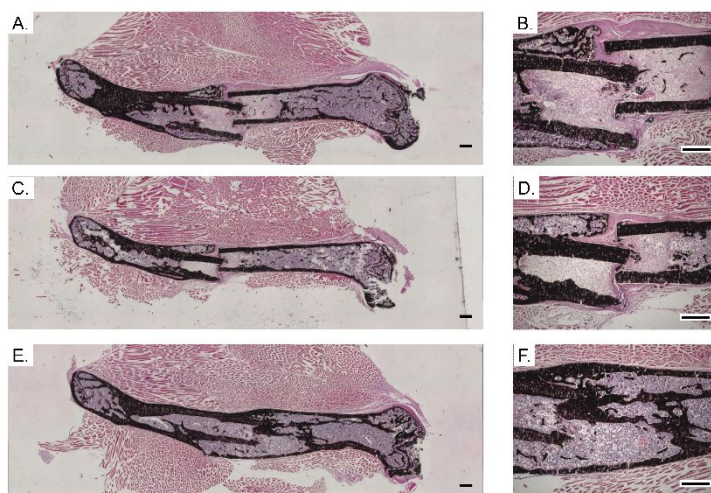


図 2. Von Kossa 染色像

A, B: control 群

C, D: IFH-HA 群

E, F: IFH-HA/BMP 群

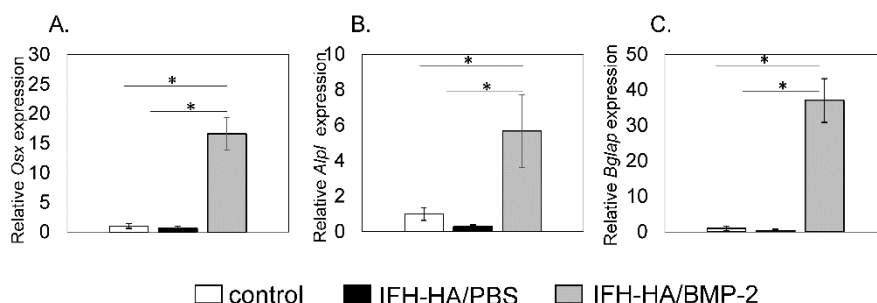


図 3. 仮骨における骨分化マーカーの発現

A. *Osx*, B. *Alpl*,
C. *Bglap*

□ control ■ IFH-HA/PBS ▒ IFH-HA/BMP-2

BMP-2 含有 IFHG-HA は、マウス難治性骨折モデルに対して、骨形成を促進した。IFHG-HA は、注射可能な材料であり、移植可能な材料であるという利点を有しているほか、難治性骨折や巨大骨欠損においても骨形成能を認め、ゲルからの BMP-2 拡散による副作用の発生を最小限に抑えることができる可能性がある。したがって、BMP-2 含有 IFHG-HA は、臨床現場において、難治性骨折治癒を促進するための有望な材料となる可能性がある。

BMP-2 のシグナル伝達は骨治癒の初期段階で開始され、炎症反応と骨膜の活性化をもたらす。BMP-2 はさらに、軟骨および骨形成の後期においても重要である。したがって、骨折治癒過程において骨形成を促進するためには、BMP-2 を長期的かつ持続的に徐放させることが重要である。本研究で行った徐放試験では、投与した BMP-2 の 23 %が最初の 4 時間のあいだに IFHG-HA から放出された。その後、徐放率は緩やかなレベルに低下したが、間葉系幹細胞の ALP 活性を高めるのに必要な量に相当する約 100 ng/ml の BMP-2 が、2 週間と 3 週間のあいだに放出された。また、BMP-2 は転写因子オステリックスを介して骨芽細胞の分化を刺激する。本研究では、BMP-2 投与 6 週間後にもオステリックスの mRNA 発現が増加し、分化マーカーであるアルカリホスファターゼとオステオカルシンの発現も増加していた。したがって、BMP-2 含有 IFHG-HA は、骨折治癒過程における後期の段階においても骨形成を刺激している可能性がある。以上のことから、BMP-2 含有 IFHG-HA は難治性骨折における骨形成、骨癒合を促進するための有用な材料である可能性が示唆される。本研究成果は英文学術誌 *Cureus*, *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* に採択された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tazawa R, Minehara H, Matsuura T, Kawamura T, Uchida K, Saito W, Inoue G, Takaso M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of single injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2-loaded artificial collagen-like peptide in a mouse segmental bone transport model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomed Res Int	6. 最初と最後の頁 1014594
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/1014594	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shoji S, Uchida K, Saito W, Sekiguchi H, Inoue G, Miyagi M, Takata K, Yokozeki Y, Takaso M	4. 巻 15
2. 論文標題 Acceleration of bone union by in situ-formed hydrogel containing bone morphogenetic protein-2 in a mouse refractory fracture model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Orthop Surg Res	6. 最初と最後の頁 426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13018-020-01953-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shoji S, Uchida K, Saito W, Sekiguchi H, Inoue G, Miyagi M, Kuroda A, Takaso M	4. 巻 12
2. 論文標題 Acceleration of Bone Healing by In Situ-Forming Dextran-Tyramine Conjugates Containing Basic Fibroblast Growth Factor in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁 e10085
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7759/cureus.10085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 庄司真太郎、内田健太郎、関口裕之、井上玄、宮城正行、村田幸佑、川久保歩、高相晶士
2. 発表標題 塩基性線維芽細胞増殖因子含有局所硬化ヒアルロン酸ゲル、局所硬化デキストランゲルの骨形成促進能の比較検討
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 庄司真太郎、内田健太郎、関口裕之、井上 玄、齋藤 亘、宮城正行、村田幸佑、川久保 歩、高相晶士
2. 発表標題 塩基性線維芽細胞増殖因子と局所硬化デキストランゲルを用いた新規骨形成促進法の有用性
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 庄司真太郎、内田健太郎、関口裕之、井上 玄、齋藤 亘、宮城正行、村田 幸佑、川久保 歩、高相晶士
2. 発表標題 局所硬化デキストランゲルと塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた新規骨形成促進法の検討
3. 学会等名 第37回日本運動器移植・再生医学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 庄司真太郎、内田健太郎、関口裕之、井上 玄、齋藤 亘、宮城正行、村田 幸佑、川久保 歩高相晶士
2. 発表標題 Acceleration of Bone Healing by In Situ-Forming Dextran-Tyramine Conjugates Containing Basic Fibroblast Growth Factor in Mice
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 骨再生用組成物、骨再生用組成物キット、骨再生用部材および骨再生方法	発明者 内田健太郎、齋藤 亘、庄司真太郎、高相晶士 等	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/037277	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 骨再生用組成物、骨再生用組成物キット、骨再生用部材および骨再生方法	発明者 林 英治、舟崎 愛、諫山 純、内田健太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-184885	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 骨再生用組成物、骨再生用組成物キット、骨再生用部材および骨再生方法	発明者 林 英治、諫山 純、舟崎 愛、内田健太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-100652	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	松下 治 (Matsushita Osamu) (00209537)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究分担者	馬淵 洋 (Mabuchi Yo) (50424172)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------