

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16625

研究課題名（和文）細胞移植を必要としない骨再生治療の創出-新規開発骨誘導型コラーゲンをを用いた挑戦

研究課題名（英文）Development of bone regeneration therapies that do not require cell transplantation

研究代表者

深瀬 直政（Fukase, Naomasa）

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：60579324

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ラット大腿骨骨欠損モデルを用いて骨欠損部に新規開発低接着性コラーゲンスキャフォールドを移植すると、細胞や成長因子を用いずに骨再生が促進されるという仮説を検証しました。放射線学的、遺伝子学的、病理組織学的、力学的試験による解析の結果、新たに開発した低接着性コラーゲンスキャフォールド150mg/mlを移植したグループは、同50mg/mlを移植したグループおよび何も投与しなかった対照群に比べて、骨再生が著しく進行していました。本研究より、新規開発低接着性コラーゲンは細胞や成長因子を移植することなく骨再生を促進することが分かり、骨欠損治療のための画期的な足場として臨床応用が期待されます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、新規開発低接着性コラーゲンスキャフォールドを移植したグループでは、骨再生が有意に促進されることが示されました。そのメカニズムは未だ不明ですが、新規開発低接着性コラーゲンスキャフォールドにおいては、骨形成過程を誘導・刺激し骨再生が促進されると考えられました。またコラーゲン濃度を高めることで、骨再生が進行することも分かりました。本研究からは、新規開発低接着性コラーゲンスキャフォールドを骨欠損部位に移植することにより、細胞や成長因子を移植することなく骨再生を促進することを示し、骨欠損治療のための革新的な足場として臨床応用の可能性を示唆するものです。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed basic studies on the bone regenerative potential of a newly developed low-adhesion type I collagen scaffold that has the ability to promote osteogenic differentiation. We examined the hypothesis that transplantation of a newly developed low-adhesion collagen scaffold into bone defects promotes bone regeneration without the use of cells or growth factors in a rat femoral bone defect model. Radiological, genetic, histopathological, and mechanical analyses showed that bone regeneration was significantly enhanced in the group transplanted with 150 mg/ml of the newly developed low-adhesion collagen scaffold compared to the group transplanted with 50 mg/ml and the control group that received no transplantation. This study shows that the newly developed low-adherent collagen promotes bone regeneration without transplantation of cells or growth factors, suggesting its potential clinical application as an innovative scaffold for the treatment of bone defects.

研究分野：骨再生

キーワード：骨再生 コラーゲンスキャフォールド 骨誘導能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨腫瘍や骨髄炎、矯正骨切りの手術において広範に骨欠損を生じた場合には、完全な自己再生は困難であり、従来自家骨や同種骨を用いた骨再生治療が行われている。自家骨移植は自分の骨の一部を採取する必要があるため、採取できる骨量に限界があり、同種骨移植は他人の骨を用いるため感染症などのリスク、宗教上の理由で日本では一般的ではない。そこで、骨欠損部の再建、再生のための一時的な足場 (scaffold) となる材料に関する研究が世界的に行われ、ハイドロキシアパタイト(HA)やリン酸3カルシウム(-TCP)など様々なバイオマテリアルが開発され臨床応用されてきた。しかしそれらのバイオマテリアルは自ら新たに骨を作る骨誘導能を有しておらず、骨形成速度は自家骨に比べ大幅に劣るため、巨大な骨欠損に対する補填材料としては不適格という問題点が残った。そこで幹細胞と scaffold を組み合わせた組織工学的手法を用いた骨再生の研究が盛んに行われているが、幹細胞の移植にあたっては細胞培養施設の設置や細胞培養にかかる費用が膨大であり、かつ高度な細胞の品質管理や安全性の担保が要求され、厳格な法規制もあいまって施設限定的な治療と言わざるを得ず、細胞移植を必要としない骨再生法の開発が急務である。

2. 研究の目的

大腿骨など荷重負荷がかかる部位へ埋植するスキャフォールドは、初期強度がないと術後早期に破綻する可能性が高い。コラーゲンスキャフォールドは天然高分子材料であり、細胞親和性が極めて高く細胞への能動的な働きが期待できる一方、材料強度が低く、それ単独では骨組織の構造支持体として用いることは困難であった。そこで HA や -TCP などの合成高分子材料との複合体として利用されてきた。HA や -TCP は生体に存在する骨形成細胞による骨欠損修復の足場となる、すなわち“骨伝導能”を有するものの“骨誘導能”は臨床的に無く、自家骨移植に取って代わるまでには至っていない。骨誘導能、材料強度を具備したコラーゲンスキャフォールドを開発できれば、これらの課題を解決でき、細胞移植を必要としない簡便で安全性の高い骨再生治療法が実現できる可能性がある。本研究の目的は、ラット大腿骨骨欠損モデルにおいて、新規開発低接着性コラーゲンの骨補填剤としての有用性、骨再生能を検証することである。

3. 研究の方法

ラット大腿骨骨欠損モデルの作成方法：実験は全て、動物実験施設にて行った。全身麻酔下に、約 12 週齢のラット(Fisher344)の大腿骨の近位と遠位にそれぞれ 2 本ずつ直径 1.4mm の K-wire を挿入し、これらを独自に開発したラット用創外固定器で連結した。その後、大腿骨の骨幹部中央において小型ボーンソーを用いて骨切除を行い、大腿骨骨欠損モデルを作成した。骨欠損長は全て 1mm とした。(図 1)

1. 欠損骨形状と同サイズの 50mg/ml の新規開発低接着性コラーゲンスポンジを移植したグループ (低接着性コラーゲン-50 群)
 2. 欠損骨形状と同サイズの 150mg/ml の新規開発低接着性コラーゲンスポンジを移植したグループ (低接着性コラーゲン-150 群)
 3. 何も移植していないグループ (対照群)
- 以上の 3 群に分けた。

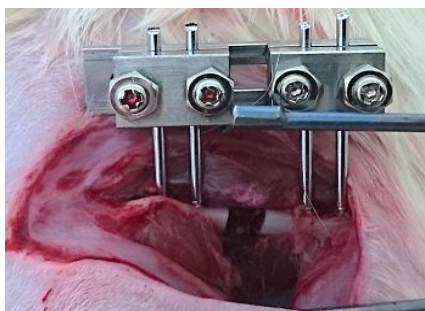


図 1 ラット骨欠損モデル



図 2 コラーゲンスポンジの移植

手術直後、14 日目と 28 日目に X 線撮影し、骨癒合の程度を Modified RUST score を用いて評価した。術後 28 日目に μ CT を撮影し、骨癒合の程度を評価した。さらに、14 日目と 28 日目において、欠損部の組織学的評価を行った。また、対照群および低接着性コラーゲン-150 群 (28 日目) の大腿骨を、力学試験に使用した。力学的評価として 3 点曲げ試験を行い、ultimate stress (N)、extrinsic stiffness (N/mm)、failure energy (Nmm) を評価した。また、21 日目において、低接着性コラーゲン-150 群と対照群で、骨欠損部に再生した組織における、骨芽細胞マーカー (Osx、Runx2、ALP、OC) および軟骨細胞分化マーカー (Collagen-、Collagen-) の mRNA レベルを qPCR で評価した。

4. 研究成果

(1) X線学的評価

単純 X 線上、正面像・側面像における 4 皮質骨すべてで骨性架橋が得られているものを骨癒合と判定した。X 線解析の結果、28 日目において、低接着性コラーゲン-150 群では 83.3%(10/12) が完全骨癒合したのに対し、低接着性コラーゲン-50 群では 45.8%(11/24)、対照群では 12.5%(2/16) しか達成できなかった (図 3, P<0.05)。

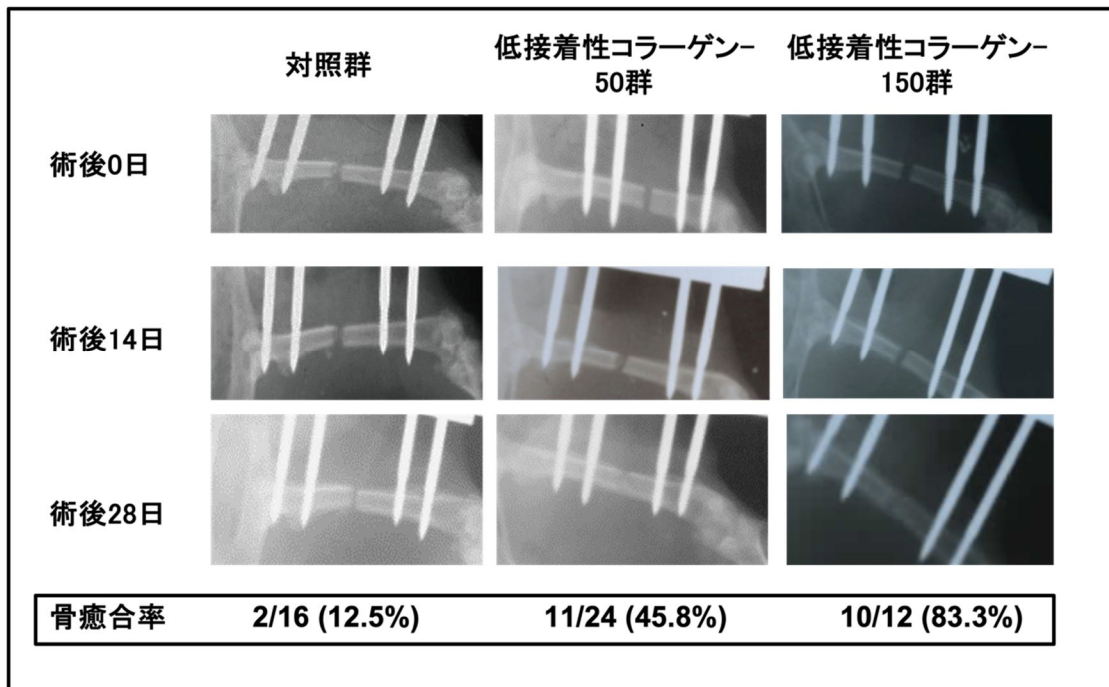


図3 各群の代表的 X 線像と骨癒合率

また、術後 28 日目の Modified RUST score は低接着性コラーゲン-150 群が、低接着性コラーゲン-50 群 および対照群より有意に高かった (P<0.05)。

(2) μ CT による骨癒合評価

術後 28 日の各群の代表的 μ CT 像を図 4 に示す。対照群においては骨癒合不全の所見を示しているのに対し、低接着性コラーゲン-50 群では骨癒合が進行しているが化骨形成には乏しい。一方で、低接着性コラーゲン-150 群においては、完全な骨癒合を認めている。

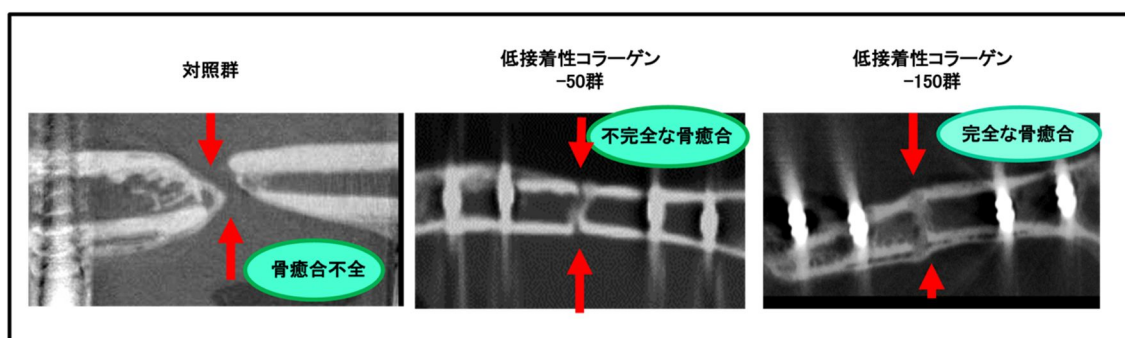


図4 各群の代表的 μ CT 像 (術後 28 日)

(3) 組織学的評価

術後 14 日目に、処理した大腿骨に Safranin-O/Fast Green 染色を行ったところ、全群で軟骨の形成が確認された。28 日目には、低接着性コラーゲン-150 と低接着性コラーゲン-50 の両群で骨結合が観察されたが、対照群では少量の軟骨組織が残存していた (図 5)。骨折治癒の進行度を Allen grading system を用いて組織学的に評価した。(Grade0: 偽関節形成、Grade1: 不完全軟骨性癒合、Grade2: 軟骨性癒合、Grade3: 不完全な骨癒合、Grade4: 完全な骨癒合) 14 日目の Allen grading system の平均スコアは、3 群間で有意差はなかった。しかし、28 日目には、低接着性コラーゲン-150 群の平均スコアが、低接着性コラーゲン-50 および対

照群の平均スコアと比較して有意に高くなった ($P < 0.05$)。

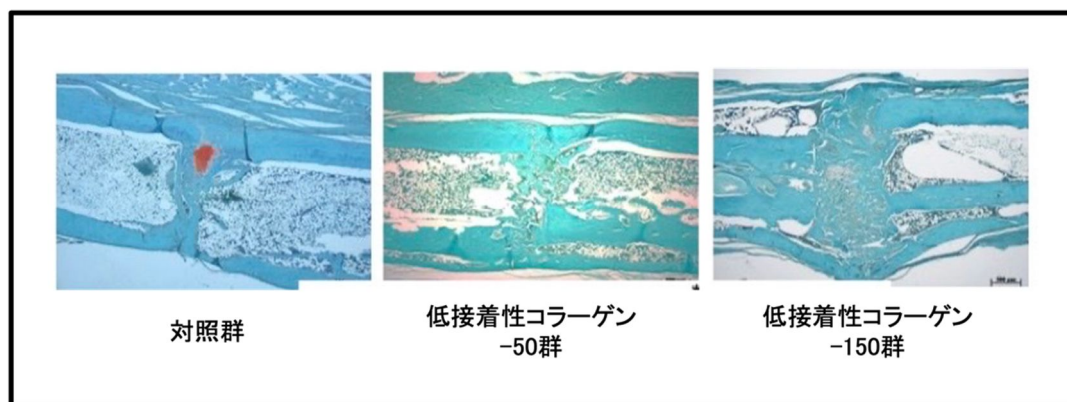


図5 組織学的評価 -Safranin-O/Fast Green 染色-

(4) 力学的評価

術後 28 日目に力学試験をおこなった。すなわち、摘出した大腿骨から創外固定器、K-wire を抜去し、3 点曲げ試験を行った。大腿骨の failure energy ($N \cdot mm$) は、低接着性コラーゲン-150 群で対照群より有意に高かった ($P < 0.05$)。また、低接着性コラーゲン-150 群では、ultimate stress ($P = 0.05$) および extrinsic stiffness ($P = 0.12$) の上昇が認められたが、統計的に有意差は認めなかった。(図 6)

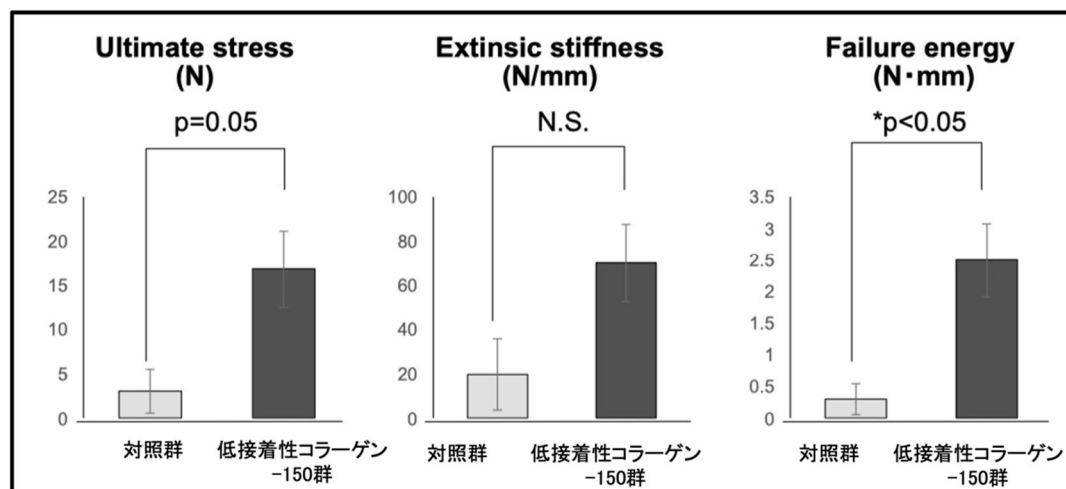


図6 力学的評価 (3 点曲げ試験)

(5) 遺伝子学的評価

低接着性コラーゲン-150 群では、術後 21 日目の骨欠損部組織において、骨芽細胞マーカー (Runx2、OC)、軟骨細胞分化マーカー (Collagen- α 1(I)、Collagen- α 2(I)) の mRNA 発現量が対照群に比べ有意に増加した ($P < 0.05$)。また、低接着性コラーゲン-150 群では、ALP ($P = 0.07$)、OSX ($P = 0.43$) の発現上昇が認められたが、これらの発現上昇は統計的に有意ではなかった。さらに、低接着性コラーゲン-150 群における Collagen- α 1(I) の mRNA 発現量は、対照群の 120 倍以上であった ($P < 0.05$)。

本研究の結果から、ラット大腿骨の骨欠損部位に新規開発低接着性コラーゲンスキャフォールドを骨補填剤として移植した群では、骨再生が有意に促進されることが示された。そのメカニズムは未だ不明であるが、新規開発低接着性コラーゲンスキャフォールドにおいては、骨形成過程を誘導・刺激し骨再生が促進されると考えられた。またコラーゲン濃度を高めることで、骨再生が進行することも明らかになった。本研究成果は、細胞や成長因子を移植することなく骨再生を促進するコラーゲンスキャフォールドの新たな可能性を示すものであり、骨欠損治療のための

革新的な足場として臨床応用の可能性を示唆する重要な知見である。

<参考文献>

1. Allen HL, Wase A, Bear WT. Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta Orthop Scand*. 1980 Aug;51(4):595-600.
2. Takeoka Y, Yurube T, Morimoto K, Kunii S, Kanda Y, Tsujimoto R, Kawakami Y, Fukase N, Takemori T, Omae K, Kakiuchi Y, Miyazaki S, Kakutani K, Takada T, Nishida K, Fukushima M, Kuroda R. Reduced nucleotomy-induced intervertebral disc disruption through spontaneous spheroid formation by the Low Adhesive Scaffold Collagen (LASCoI). *Biomaterials*. 2020 Mar;235:119781. Epub 2020 Jan 11.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takemori T, Fukase N, Kunii S, Morimoto K, Takeoka Y, Yurube T, Kawamoto T, Hara H, Morishita M, Katayama E, Fujiwara S, Niikura T, Akisue T, Kuroda R
2. 発表標題 A newly developed Low Adhesive Scaffold Collagen (LASCoI) accelerates bone healing in a rat femur osteotomy model.
3. 学会等名 65th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 竹森 俊幸, 深瀬 直政, 森本 康一, 國井 沙織, 由留部 崇, 武岡 由樹, 河本 旭哉, 新倉 隆宏, 原 仁美, 秋末 敏宏, 黒田 良祐
2. 発表標題 新規低接着性scaffold collagen(LASCoI)はラット骨欠損モデルにおいて骨癒合を促進する
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～2019年

1. 発表者名 竹森 俊幸, 深瀬 直政, 森本 康一, 國井 沙織, 由留部 崇, 武岡 由樹, 原 仁美, 河本 旭哉, 黒田良祐, 秋末敏宏
2. 発表標題 新規低接着性コラーゲン(LASCoI)はラット大腿骨骨欠損モデルにおいて骨癒合を促進する
3. 学会等名 第55回日本リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Fukase N, Takemori T, Kunii S, Morimoto K, Takeoka Y, Yurube T, Kawamoto T, Hara H, Morishita M, Katayama E, Fujiwara S, Niikura T, Akisue T, Kuroda R
2. 発表標題 Augmentation of Fracture Healing by Low Adhesive Scaffold Collagen (LASCoI) in a Rat Femur Osteotomy Model.
3. 学会等名 64th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 コラーゲン固形物、コラーゲン固形物の製造方法、生体材料、および、生体外材料	発明者 深瀬直政、黒田良祐、竹森俊幸、森本康一、國井沙織	権利者 学校法人近畿大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-081130	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 コラーゲン固形物、コラーゲン固形物の製造方法、生体材料、および、生体外材料	発明者 森本康一、國井沙織、深瀬直政、黒田良祐、竹森俊幸	権利者 学校法人近畿大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/048788	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------