

平成21年6月8日現在

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2007年度~2008年度

課題番号:19591724

研究課題名(和文)

骨リモデリングにおけるBMPとビスホスフォネートの強調作用効果の解析

研究課題名(英文)

The study of coordinated effects between BMP and bisphosphonate in bone remodeling.

研究代表者

片岡 晶志(Kataoka Masashi)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号:40301379

研究成果の概要：BMP 単独では骨吸収作用が勝り、骨形成が間に合わない。臨床例においても BMP 使用の失敗例が報告されている。一方 BMP と ZA を組み合わせると、BMP の骨吸収作用と ZA の骨吸収抑制作用がうまく打ち消しあい、かつ BMP の骨新生形成作用が働いて、理想的な結果が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,500,000	450,000	1,950,000
20年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・整形外科学

キーワード:①骨移植 ②BMP ③ビスホスフォネート ④ボーンチャンバー ⑤血管新生

1. 研究開始当初の背景

近年、医療の高度化、高齢化にともない大腿骨頭壊死症やペルテス病、人工関節周囲の緩み、骨延長術、骨移植術、難治性骨折などの治療に関する問題が多い。いずれも局所では骨芽細胞と破骨細胞が密接に連携しており、外科的手術による物理的操作のみではうまくいかないことが多いのが現状である。

昨年、大腿骨頭壊死症に対するビスホスフォネートによる保存的治療に関する報告が海外からあった(J. Bone Joint Surg87-A, 2155-2159, 2005/J Rheumatol144, 352-359,

2005)。ビスホスフォネートを大量に使用することで骨頭の圧潰変形を阻止することが可能であり、これまで外科的治療しかないといわれていた大腿骨頭壊死症に対して画期的な報告である。ビスホスフォネート投与により壊死骨内新生血管領域の骨吸収を抑制し、新生骨の形成を待つ訳である。しかしながら、長期におよぶ免荷期間やビスホスフォネートの服用量、適応症例(進行の程度や壊死範囲)に制限があり、また成功率も50%程度であることから、この方法には問題点が多い。

我々はBMPのもつ骨形成作用とビスホスフォネートの骨吸収抑制作用をうまく組み合わせることにより骨リモデリングにおける理想的な反応を誘導できると確信している。

2. 研究の目的

骨に対して同化作用を有するBMPと異化作用を有するビスホスフォネートを組み合わせることにより、骨リモデリングにおけるこれら2つの協調効果をラット実験モデルにおいて明らかにしたい。さらに骨吸収と骨形成の間には、血管新生が必要であるが未だ血管新生に関しては未知であるので血管新生においても検討したい。

またBMPとビスホスフォネートを組み合わせると、骨吸収とその後の骨新生に関して、これまでにないすばらしい結果を生み出す。しかしながら、この実験モデルにおける骨は強力な骨吸収の抑制と急速な骨形成促進によるものであり、両者によって作り出される新生骨の骨質について検討する必要がある。

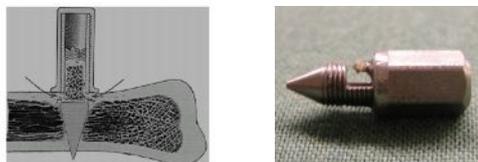
3. 研究の方法

(1) ラットチャンバーモデルにおける移植骨の病理組織学検討と、組織形態計測による検討

- ① 対象：Sprague Dawley ラット 雄、10週齢、体重300g 48匹
- ② 移植骨の準備：24匹を麻酔死させた後、両脛骨近位より移植骨（海面骨）を採取し-80℃に保存する。
- ③ チャンバー設置：全身麻酔下、24匹のラット両脛骨内側に移植骨を中に入れたBCを挿入する（BCの先端は骨髄と交通している）。移植骨には右側のみBMP-7（2μg）を投与し、左側は生理食塩水を投与する。（BMP(+)群・C群）。
- ④ Zoledronic acid(ZA)の投与：手術2週後12匹のラットにビスホスフォ

ネートとして Zoledronic acid(0.1mg/kg)を皮下投与し、残りの半数は生理食塩水を皮下投与する（ZA(+)群・C群）。

- ⑤ 手術6週間後にチャンバー内の骨を摘出しH.E染色による病理組織標本を作製する。専用ソフト（analySIS FIVE）を用いて4つのグループ（C-C群、BMP-C群、C-ZA群、BMP-ZA群）のそれぞれ移植骨全体の面積、骨吸収領域の面積、骨形成領域の面積を求め、統計学的検討を行う。
- ⑥ ラット飼育中の体重変動を記録し、2週間ごとの採尿（代謝測定器使用）による尿中NTX（クレアチニンで補正）を測定する。また手術6週間後屠殺時に採血を行い骨アルカリフォスファターゼアッセイを行う。



(2) ラットチャンバーモデルにおける移植骨内の新生血管の検討

- ① 上記1. - 4. までは同様の操作をおこなう。
- ② 手術6週後に、麻酔下に開腹し下大静脈にカテーテルを挿入後、2500単位のヘパリンを静脈内投与しつぎにIndian Ink 50mlを130mmHgで静脈内に投与する。その後チャンバーを摘出し、病理学的検討をおこなう。
- ③ 評価は専用ソフト NS2K-Pro を用いて、単位面積当たりの黒さを数値化し、C-C群、BMP-C群、C-ZA群、BMP-ZA

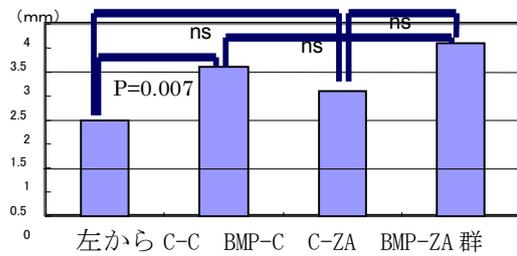
群において統計学的検討を行う。

(3) ラット大腿骨骨折モデルにおける骨質の検討

- ① 対象：Sprague Dawley ラット 雄、10週齢、体重300g 48匹
- ② ラット大腿骨骨折モデル：麻酔下約3cmの皮膚切開の後、大腿骨骨幹部にボーンソーにより骨折を加える。骨膜は可及的に残す。C-wire (0.45インチ)で逆行性に強固な固定を行う
- ③ 24匹にたいし、骨折部にBMP-7(2μg)をカルボキシメチルセルロース(CMC)を担体として投与する。のこり半数のラットにはコントロールとして、CMCのみを投与する。
- ④ BMPを投与した12匹とコントロールの12匹に手術2週間後Zoledronic acid(ZA 0.1mg/kg)を皮下投与し、残りの半数は生理食塩水を投与する。
- ⑤ 手術6週後、大腿骨を摘出し、軟X線撮影後、強度試験(ねじり、圧縮試験)を行う。
- ⑥ 評価方法：レントゲン撮影後、画像をパソコンに取り込み、専用ソフト(analySIS FIVE)を用いて仮骨の面積を求める。また強度試験に関しては骨強度試験機(TK-252C、室町機械株式会社)を用いて測定しC-C群、BMP-C群、C-ZA群、BMP-ZA群において統計学的検討を行う。

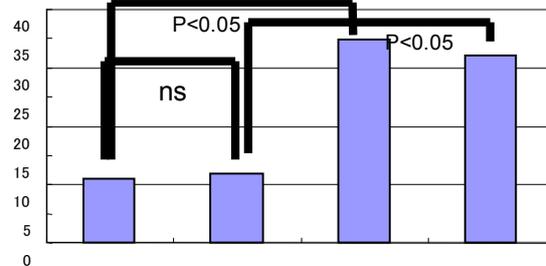
4. 研究成果

(1) Bone ingrowthの結果



C-C BMP-C群間で有意差あり 他はなし

(2) 骨密度の結果



左から C-C BMP-C C-ZA BMP-ZA 群
C-CとC-ZA、BMP-CとBMP-ZA群で有意差あり

結論

- BMPの有無で bone ingrowth に有意差あり
- ZAの有無で骨密度に有意差あり
- BMPとZAの併用で早期の bone remodeling が期待できる

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. Harding AK, Aspenberg P, Kataoka M, Bylski D, Tagil M Manipulating the anabolic and catabolic response in bone graft remodeling: synergism by a combination of local BMP-7 and a single systemic d osis of zoledronate. J Orthop Res 26(9)1245-9, 2008 査読あり
2. Kumagi M, Kataoka M et.al., Total Knee arthroplasty with permanent post-traumatic patellar dislocation. Oitaken seikeigeka igaku kaishi 25:4-8, 2007 査読あり

[学会発表] (計2件)

1. 片岡 晶志 ハイドロゲルの BMP 徐放

担体としての有効性の評価第23回
日本整形外科学会基礎学術総会 2008,
10月23-24日 京都

2. 片岡 晶志 ラット移植骨に対する
BMP-7、Zoledronic acid の効果の検討
第51回 日本リウマチ学会総会・学術
総会 第16回 国際リウマチシンポジ
ウム 2007、4月26日 横浜

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 片岡 晶志 (Kataoka Masashi)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号：40301379