

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20978

研究課題名(和文) 迅速な機能性人工骨作製による広範囲骨欠損治療法の確立

研究課題名(英文) Development of rapidly constructible bone regeneration materials to treat large bone defect

研究代表者

庄司 真太郎 (Shoji, Shintaro)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：60728202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：外傷や腫瘍搔爬後に生じた広範囲骨欠損は治療に難渋する。本研究ではヒアルロン酸に天然由来架橋基を導入後、酵素試薬と混合することで硬化する局所硬化ゲルを用いた人工骨への成長因子導入法の有用性について検討した。マウスの大腿骨を骨幹部で骨切り後、骨折部周囲の骨膜を電気メスで焼灼することで難治性骨折モデルを作製した。BMP-2含有チラミン架橋ヒアルロン酸溶液にハイドロキシアパタイト(HAp)を浸漬後、ゲル化させることで作製したBMP2/HA/Hap複合体は高い骨形成はマウス難治性骨折モデルにおける骨形成、骨癒合を促進した。本複合材料は広範囲骨欠損治療法として有用かもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

局所硬化ゲルの多孔質材料への成長因子導入法を確立し、その有用性を示した。本方法は骨欠損治療のみならず、再生医療全般に応用できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined the effectiveness of in situ-formed gels (IFGs) consisting of hyaluronan (HyA)-tyramine (TA), horseradish peroxidase and hydrogen peroxide enhance the bone formation ability of hydroxyapatite (Hap)/BMP-2 composites for facilitating osteogenesis in refractory fracture model mice. After establishing the refractory fracture model, animals were either treated at the site of fracture with IFGs-HyA with Hap harboring BMP-2 (IFGs-HyA/Hap/BMP-2). We determined the extent of bone formation at the fracture site according to findings on micro-computed tomography and histological experiments. Animals treated with IFGs-HyA/Hap/BMP-2 demonstrated significantly greater bone volume, bone mineral content and bone union than those treated with vehicle or IFG-HyA/Hap alone. IFGs-HyA/Hap/BMP-2 could be an effective treatment option for refractory fractures.

研究分野：整形外科

キーワード：局所硬化ゲル 多孔質材料 骨欠損治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外傷や腫瘍掻爬後の広範囲骨欠損は治療に難渋する。治療の長期化に伴う患者の社会復帰の遅延は、患者の QOL 低下、医療費の増加、社会経済的損失に直結する。申請者は、早期の治療、社会復帰を実現可能な骨欠損治療法を開発すべく研究を行ってきた。ヒアルロン酸、デキストランに天然由来架橋基を導入後、酵素試薬と混合することで局硬化する新規材料(局所硬化ゲル)の開発に成功した。局所硬化ゲルに成長因子 (bFGF, BMP-2) を含有させることで、マウス骨折モデル、難治性骨折モデル、骨欠損モデルの治療促進が可能であった。しかし、成長因子含有硬化ゲルは骨誘導能を有していたが、骨伝導能を有していなかった。骨欠損治療への臨床応用に向けては骨伝導能を有する材料とともに移植する必要があると考えた。

2. 研究の目的

多孔質人工骨への迅速な細胞、成長因子導入による骨欠損治療法の確立を行うことである。

3. 研究の方法

9 週齢雄性 C57BL/6J マウスの大腿骨を骨幹部で骨切りし、逆行性髓内釘固定を行ったのち、骨折部周囲の骨膜を電気メスで焼灼することで難治性骨折モデルを作製した。BMP-2 含有チラミン架橋ヒアルロン酸溶液にハイドロキシアパタイト (HAp) を浸漬後、過酸化水素水と混和し、ゲル化させることで BMP-2/HA/Hap 複合体を作製した。骨折作製のみ群 (control 群)、骨折部に BMP-2 (2 µg) 含有 PBS に HAp を浸漬後、投与した群 (BMP-2/Hap 群)、骨折部に BMP-2/HA/Hap 複合体を投与した群 (BMP-2/HyA/Hap 群) 3 群を作製した (各群 n=10)。投与後 28 日で屠殺して右大腿骨を採取後、micro CT で撮影して骨折部における骨癒合率、骨量 (BV)、骨塩量 (BMC) を測定した。また、組織学的検討を行った。

9 週齢雄性 C57BL/6J マウスの大腿骨を骨幹部で骨切りし、逆行性髓内釘固定を行い、骨折モデルを作製した。bFGF 含有ゼラチン (GL) 溶液にハイドロキシアパタイト (Hap) を浸漬後、過酸化水素水と混和し、ゲル化させることで bFGF/GL/Hap 複合体を作製した。骨折作製のみ群 (control 群)、骨折部に bFGF を含まない GL/Hap 複合体を投与した群 (GL/Hap 群)、bFGF (2 µg) 含有 PBS をゲル化し投与した群 (bFGF/GL 群)、骨折部に bFGF/GL/Hap 複合体を投与した群 (bFGF/GL/Hap 群) の 4 群を作製した (各群 n=5)。投与後 28 日で屠殺して右大腿骨を採取後、micro CT で撮影して骨折部における骨癒合率、骨量 (BV)、骨塩量 (BMC) を測定した。また、組織学的検討を行った。

4. 研究成果

Xp および組織像では、BMP/HA/Hap 群および BMP/HAp 群で新生骨の形成を認めていたが、BMP/HA/Hap 群の方がより旺盛だった (図 1)。control 群および HA/Hap 群では新生骨形成はほとんど認められなかった。BMP/HA/Hap 群は 10 例中 10 例 union、BMP/HAp 群は 10 例中 X 例 union だったが、defect 群と HA 群は全例 non union だった (表 1)。BMP/HA/Hap 群は他の 3 群と比較して BV および BMC とも有意に高値だった (図 2, 3 p<0.001)。

Xp および組織像では、bFGF/GLHap 群、bFGF/GL 群、GL/Hap 群、control 群のいずれも新生骨の形成を認めていたが、bFGF/GL/Hap 群の方がより旺盛だった。bFGF/GL/Hap 群は他の 3 群と比較すると control 群間で BV および BMC とも有意に高値だった (p<0.05)。

本研究結果から、局所硬化ゲルを用いた人工骨への成長因子導入とその複合体の移植は骨欠損治療法として有用である可能性が示唆された。

表 1. 骨折後 4 週の骨癒合率

	Control	BMP-2/HAp	BMP-2/HyA/Hap	p value
骨癒合率	0/10	1/10	10/10	<0.001

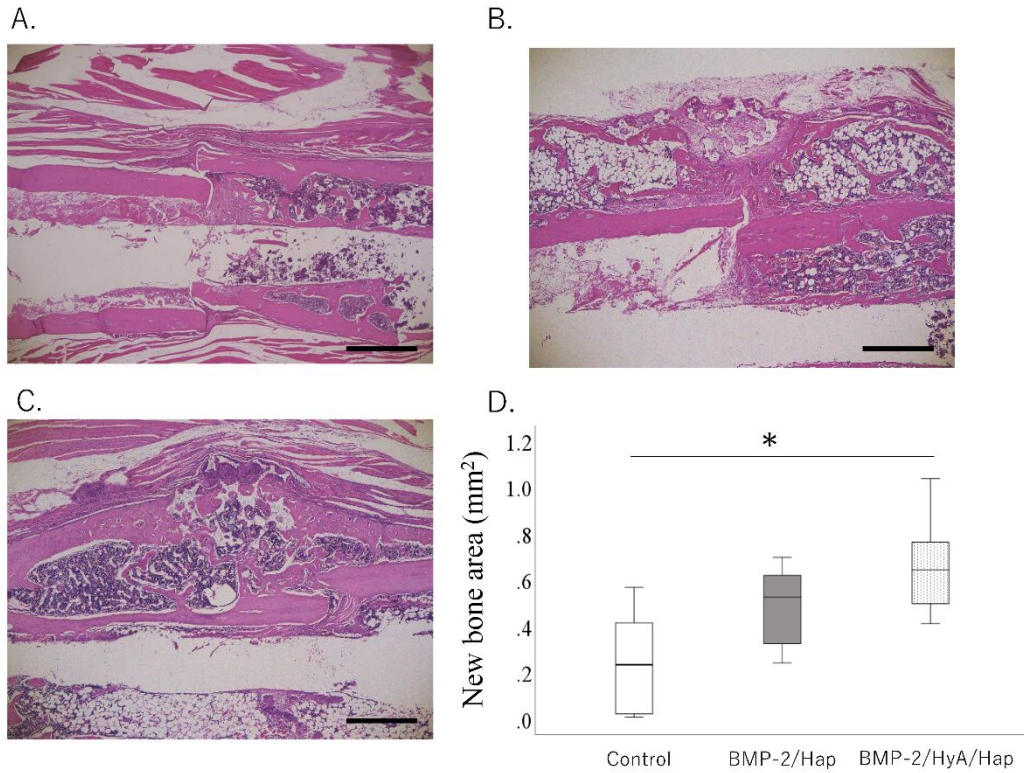


図 1. 骨折後の HE 染色像

A. control, B. BMP-2/Hap, C. BMP-2/HyA/Hap Scale Bar = 1 mm

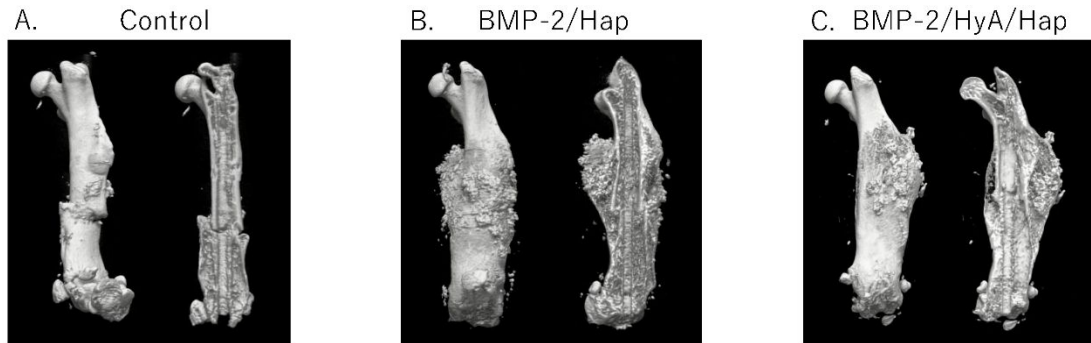


図 2. 骨折後 4 週の μ CT 像

A. control, B. BMP-2/Hap, C. BMP-2/HyA/Hap Scale Bar = 1 mm

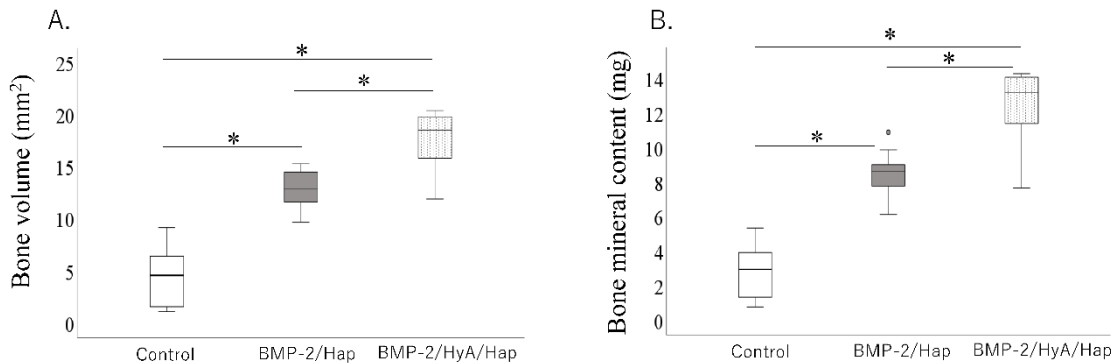


図 3. 骨折後 4 週の骨量 (bone volume) および骨塩量 (bone mineral content)

A. Bone volume, B. bone mineral content

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 Shoji S, Uchida K, Tazawa R, Saito W, Kuroda A, Sekiguchi H, Ishii D, Inoue S, Inoue G, Takaso M	4. 巻 32
2. 論文標題 Acceleration of bone formation using in situ-formed hyaluronan-hydrogel containing bone morphogenetic protein-2 in a mouse critical size bone defect model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomed Mater Eng	6. 最初と最後の頁 207-215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/BME-201172.	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1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、田澤諒、関口裕之、井上 玄、齋藤亘、宮城正行、黒田晃義、高相晶士。
2. 発表標題 BMP-2含有局所硬化ヒアルロン酸ゲルを用いた広範囲骨欠損修復法の有用性
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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