

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月7日現在

機関番号：17501
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591661
 研究課題名（和文）骨折治癒におけるリコンビナント線維芽細胞増殖因子とビスホスフォネートの協調効果
 研究課題名（英文）The synergy between bFGF and bisphosphonate contributes to fracture healing.
 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（和文）：

骨折治癒遷延に対してリコンビナントヒト線維芽細胞増殖因子-2（rhFGF-2）の徐放性製剤を用いた治療法の開発を目指した結果、軟X線撮影、病理組織学的検討ならびに力学的検討においては骨癒合率、骨強度試験ともに有意に改善されていた。さらに rhFGF-2 とビスホスフォネートとの協調効果についても検討を加えた結果、期待通りの結果がえられた。

研究成果の概要（英文）：

Bone repair involves a complex set of regulated signaling pathways that control the formation of new bone matrix and the resorption of damaged bone matrix at the fracture site. The results suggested that the recombinant human fibroblast growth factor (rhFGF-2) increased the bone formation and mechanical strength. The synergic effect of rhFGF-2 and ZA given systemically as a single dose at the optimal time was efficacious for fracture repair and significantly enhanced bone fusion. Our results suggest that this combination facilitates bone healing and has potential clinical application.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2012年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：リコンビナントヒト線維芽細胞増殖因子-2、rhFGF-2、骨リモデリング、ビスホスフォネート、骨強度、骨質

1. 研究開始当初の背景

rhFGF-2は強力な骨折治癒促進作用と海綿骨内骨形成促進作用を有する蛋白質である。これまで rhFGF-2 を骨折治癒遷延例に対する治療薬への応用の試みがなされてきたが、成功していない。その

原因として、適切な drug delivery system (DDS) の開発が不十分であることがあげられる。私は、rhFGF-2 をそのまま投与しても患部にとどまることなく散逸してしまい、効果を発揮できないものと考えている。そこでなるべく患部

において rhFGF-2 を適切な濃度に維持するための薬剤担体を開発し、rhFGF-2 の徐放性を実現することが重要である。骨折の治療に応用しようとした場合、rhFGF-2 の骨折治癒促進作用が骨折初期にみられることから、骨折所期の 2 週間は骨折部位に作用させる必要がある。骨折部の血管から流出した血液によって洗い流されるようでは効果が不十分であると思われるし、ウシ I 型コラーゲンスポンジやラットコラーゲンスポンジを使用した場合、感染症の問題や抗原性の問題、含有容量の問題や価格の問題から臨床応用は難しい。

私はこれまで rhFGF-2 の担体として carboxymethylcellulose を用いてラット大腿骨骨折モデルを用いて骨癒合の状態を観察してきた。しかしながらコントロールが 10% の骨癒合率に対してわずか 30% に上昇したのみであった。しかし、私は最近これに対してハイドロゲル (MedGel[®]) を用い同様な実験をおこなったところ、有意な治療効果がみられることを発見した (投稿準備中)。ハイドロゲルはゼラチンを架橋して水不溶化したもので、ゼラチンとの分子間相互作用により生理的活性物質を保持可能としたものであり、コラーゲナーゼなどの分解酵素によって基材が分解され約 2 週間にわたって生理活性物質が放出される。また生体内で完全に分解吸収され、生体に影響を及ぼさないことも確認されている。ハイドロゲル 1 mg あたり最大 160 mg の蛋白質を保持能力を有しており、臨床応用が可能なレベルと考えている。

2. 研究の目的

ラット大腿骨実験モデルにおいて、ハイドロゲルを徐放担体として rhFGF-2 の骨折治

癒促進効果と安全性を確立することを目的とし、さらに rhFGF-2 とビスホスホネートとの協調効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ラット大腿骨骨折モデルにおけるハイドロゲル+rhFGF-2 の効果の検討

- ① 対象: Sprague Dawley ラット 雄、10 週齢、体重 300 g 45 匹
- ② 全身麻酔下、45 匹のラット大腿骨骨折モデルを作成する。
右大腿骨を骨鋸で骨切し、骨膜を骨折部より幅 1 cm にかけて剥離する。Kirschner 鋼線 (1.8 mm) で逆行性に骨髓内に刺入し骨接合を行う。ハイドロゲルは骨折部に置く。
大腿筋膜と皮膚を縫合する。
- ③ 45 匹のラットをコントロール群 (ハイドロゲルのみ)、rhFGF-2 低容量群 (rhFGF-2 5.0 μ g)、rhFGF-2 高容量群 (rhFGF-2 20.0 μ g) の 3 群に分ける。
- ④ 1 週ごとに体重測定する (体重増加の有無はラットのコンディションを反映するため)
- ⑤ 手術 6 週間後に右大腿骨を摘出し、軟 X 線撮影を 2 方向おこない、その後各群から無作為に 3 標本を選び、病理組織標本を作製する (H.E 染色、トルイジンブルー染色)。軟 X 線撮影像から骨癒合の判定の有無 (2 方向撮影のうち骨癒合なければ 0 点、1 方向のみ骨癒合があれば 1 点、2 方向とも骨癒合があれば 2 点として評価する) と骨癒合した標本での仮骨の面積を評価する (専用ソフト analysis FIVE を使用)。さらに病理組織標本から

架橋形成、骨髄の大きさ、細胞浸潤の程度など検討する。

- ⑥ 残った標本を用いて生体力学的試験をおこなう(3点曲げ試験)。(マルトー社製 MZ-500Sを使用)

(2) ラット大腿骨骨折モデルにおけるハイドロゲル+rhFGF-2による新生血管の検討

- ① 上記①-④までは同様の操作をおこなう。(ラット各群10匹)
- ② 手術6週後に、麻酔下に開腹し下大静脈に26ゲージ針を留置後、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。その後チャンバー大腿骨を摘出し、透明標本を作製する。
- 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、各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ハイドロゲル+BMP+ビスホスフォネートの強調効果

上記(1)(2)の実験結果を踏まえたうえで、さらに骨質の改善のためにビスホスフォネートを投与し、ハイドロゲル+rhFGF-2+ビスホスフォネートの協調効果について検討を加える。

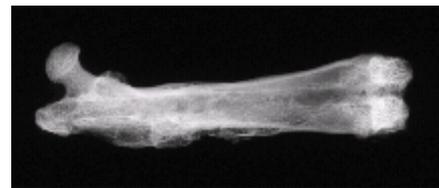
- ① 上記①-④までは同様の操作をおこなう。(ラット各群15匹)
- ② 術後2週でビスホスフォネートとして Zoledronic acid(0.1mg/kg)を皮下投与し、残りの半数は生理食塩水を皮下投与する(ZA(+))群・

C群)。

- ③ 術後6週で大腿骨を摘出し軟X線撮影、病理組織学的検討、生体力学的試験をおこない、ビスホスフォネートの強調効果について検討する。
- ④ 研究成果



コントロール群



rhFGF-2 低容量群

上の写真に示したごとく、明白な違いを示した。SDラット10週齢(雄)の大腿骨骨折モデル(骨膜を完全に剥離した)を作成し、コントロール群にはハイドロゲルのみ、対象群にはハイドロゲル+rhFGF-2(低容量群5 μ g、高容量群20 μ g)をおいた。6週後の大腿骨軟X線撮影結果(図1)ではコントロール群10%、低容量群73.3%、高容量群76.9%であった。

また骨癒合率は コントロール群 10.0%、rhFGF 低用量群 73.3%、rhFGF 高用量群 76.9%、であった。

コントロール群と rhFGF 群とでは有意差を認めたが、容量の違いで有意差はなかった

rhFGF-2の担体として求められる特性として理想的には(i)生体親和性がよく

異物反応、炎症反応を起こさないこと
(ii) 一定期間内に生体内で吸収されること (iii) 免疫原性がないこと (iv) rhFGF-2 の骨誘導活性を損なわないこと
(v) 可塑性があり、rhFGF-2 によって形成される骨の形状制御がしやすいこと
(vi) 生体内での rhFGF-2 徐放速度を制御できることがあげられる。ハイドロゲルはこれらの点においても優れており rhFGF-2 徐放担体としては理想的といえる。

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0件)

なし

[学会発表] (計0件)

なし

[図書] (計0件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

なし

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

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**

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし