

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791644

研究課題名（和文） 自己重合ペプチドスキャフォールドの骨再生メカニズムの解析

研究課題名（英文） Mechanism of self-assembling peptide scaffold's bone regeneration

研究代表者

三澤 治夫（MISAWA HARUO）

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60448222

研究成果の概要（和文）：ウサギの大腿骨欠損モデルを作成した。自己重合ペプチド（SASP）を使用する事で骨欠損部の異所性骨化を抑制した骨再生が得られた。より副作用の少ない骨欠損部の治癒が得られる可能性がある。また、ラットの硬膜損傷モデルを作成した。周囲の炎症が少ない治癒過程が確認できた。硬膜損傷など新たな用途の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We used rabbits femur bone defect model. SASP might repair bone defect without ectopic ossification. SASP's bone repair ability could regeneration less side effects. Furthermore we used rats dura mater defect model. SASP could repair without inflammatory cell. This result suggested new SASP's ability.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：骨再生、自己重合スキャフォールド、骨欠損、硬膜損傷

## 1. 研究開始当初の背景

自己重合ペプチドスキャフォールド（SASP）は細胞外基質様の働きにより細胞の機能を高め再生を促すとされる。これらの物質は強度は期待できないが、局所充填は容易である。

我々は骨欠損部の骨再生において、マウスやラットなど小動物でSASPの有用性を証明してきた。しかしながら、使用していた動物種が小さいことから十分な客観的な評価が行えず、特に、メカニズムの点では疑問点が多い。また、強度も弱いため少量投与では急性期の

変化も観察が困難であった。

## 2. 研究の目的

SASP を用いた骨再生のメカニズムを解析し、SASP の形態の保持、組織評価を詳細に行えるよう、動物種を大きくし実験を行う。今回はウサギ大腿骨を使用し、十分な検体採取を目的とする。さらに、局所評価も大きな材料のため容易に可能であると考え。また、新たな使用方法として硬膜欠損への応用への展開も行う。ラットの硬膜損傷モデルを使用しそれらへの展開も考える。

## 3. 研究の方法

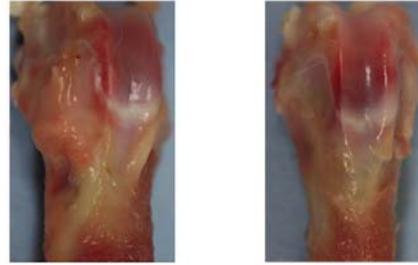
(1) ウサギ骨欠損部における SASP の骨再生促進能力を検討する。ニュージーランド白色家兔、体重 2-2.5 kg、雌を使用した。ウサギ大腿骨遠位部に円筒形の骨欠損を作成し、同部に SASP を投与する。比較対照群には既存のフィブリン糊を使用する。4 週後に大腿骨を摘出し肉眼所見、 $\mu$ CT で骨再生領域を評価し、病理組織学的に評価する。

(2) ラット硬膜欠損モデルを作成し、硬膜修復過程を観察する。SD ラット 300-350 g、雄を使用した。ラットを腹臥位とし第 8-10 胸椎の椎弓を切除し硬膜を展開する。硬膜を短冊上に切開し硬膜欠損モデルを作成する。同部に骨欠損モデルと同様に SASP と既存のフィブリン糊を投与し経時的に治癒過程を観察する。また、急性期の硬膜修復効果を観察するため、硬膜損傷作成後直ちに脊髄造影検査をラットで行い、造影剤の漏出を  $\mu$ CT で観察した。

## 4. 研究成果

### (1) ウサギ骨欠損モデル

#### ウサギ骨欠損1ヵ月肉眼所見

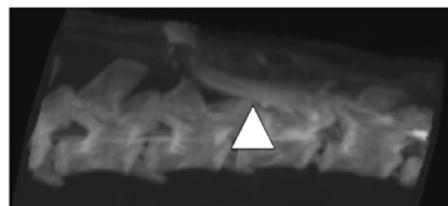


対照群 欠損部に異所性骨化が多くみられる SASP群 欠損部に異所性骨化は少ない

投与後 4 週目に観察した。肉眼所見では明らかな骨欠損部周囲の繊維組織形成が少なく、異所性骨化に伴う局所の膨腫も小さかった。剥離の際の周辺組織との癒着も明らかに少なかった。 $\mu$ CT や病理学的に同部を詳細に観察したが明らかな違いは見いだせなかった。急性期に SASP が吸収された可能性が高く、病理学的にもそれらの存在を証明する事が出来なかった。しかし、損傷部位の異常な炎症活動も抑える役割がある事が示唆される結果であった。また、損傷部位から mRNA を採取し、RT-PCR 法を用いて骨形成マーカーの発現を検討したが、骨欠損治癒が非常に旺盛であり、また、正常骨との判別が困難であったため正確な評価が困難であった。

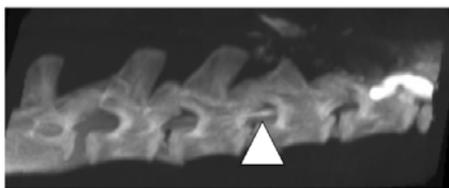
### (2) ラット硬膜欠損モデル

#### ラット硬膜欠損モデル漏出群



造影剤の漏出が確認できる

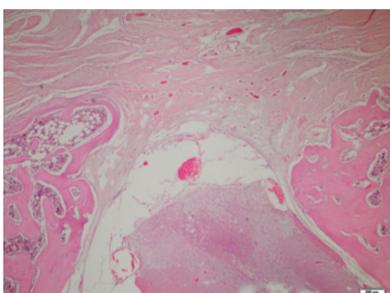
## ラット硬膜欠損モデル治療群



造影剤の漏出が防止できた

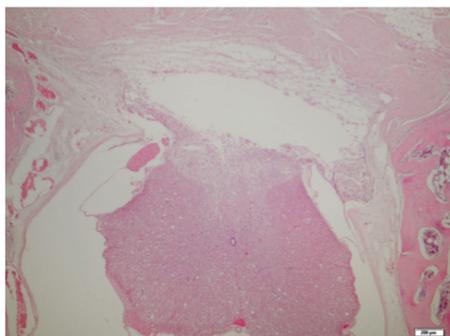
急性期の硬膜修復能について検討した。硬膜損傷作成後、直ちに頸椎から造影剤を投与し、その後、ラットを1分間直立させた後に、 $\mu$ CTを撮影した。未治療群では漏出が皮下に確認できた。治療群では、損傷後SASP又は、既存のフィブリン糊を使用した後に同様に造影した。両群とも漏出がみられなかった。SASPも既存製品と同等の脊髄液漏出予防効果があることが示唆された。

## 硬膜損傷組織写真 対照群



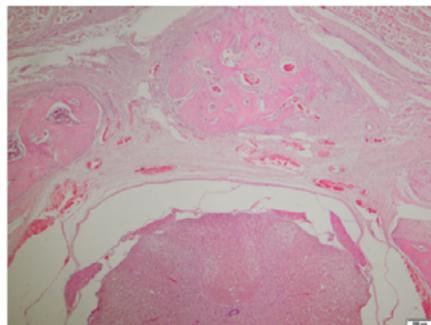
硬膜損傷作成後1週での対照群の組織写真。損傷硬膜に治癒傾向は見られず、周辺には炎症肉芽組織がみられた。

## 硬膜損傷組織写真 フィブリン糊



フィブリン糊を使用した群では対照群と比べ炎症細胞は少なかったが、硬膜の修復は確認できなかった。

## 硬膜損傷組織写真 SASP



SASP使用群。損傷硬膜は修復され、硬膜の連続性がみられている。新生血管も認められ組織修復が促されている。

既存の治療用のフィブリン糊はブタなどの生体から精製されている。SASPは化学化合物であり、生体からの物質に危惧される感染などの不安は無い。これらの用途が広がり、臨床応用されれば非常に有用な物質となる事が考えられる。

## 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1件)

- ① Hayashi T, Misawa H, Nakahara H, Noguchi H, Yoshida A, Kobayashi N, Tanaka M, Ozaki T. Transplantation of osteogenically differentiated mouse iPS cells for bone repair. Cell transplantation. 査読有. 21(2-3). 2012. 591-600

[その他]

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/ort>

hop/japanese/

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三澤 治夫 (MISAWA HARUO)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60448222

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

塩崎 泰之 (SHIOZAKI YASUYUKI)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：00596041