

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791560

研究課題名(和文) 整形外科と細菌学の融合による新規骨折治癒促進法の開発

研究課題名(英文) Development of novel fracture healing methods using growth factor containing a collagen-binding domain from Clostridium histolyticum collagenase

研究代表者

内田 健太郎 (Uchida, Kentaro)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：50547578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)と細菌コラゲナーゼに存在するコラーゲン結合ドメインからなる融合タンパク(CB-bFGF)を用いた高齢者骨折治療法の確立を行った。CB-bFGFを用いることでコラーゲンパウダー、脱灰粉砕骨にbFGFをアンカーリングすることが可能であった。さらに、高齢者を模擬したマウス骨折モデルにCB-bFGFをアンカーしたコラーゲンパウダー、脱灰粉砕骨を投与することで骨形成促進を促進できることを示した。また、CB-bFGFを用いることにより低用量で骨形成を促進できることを明らかにした。本シーズは低侵襲かつ安全性の高い高齢者骨折治療法と成り得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We attempted to develop a collagen-based bone formation system using a fusion protein (collagen binding-bFGF, CB-bFGF) consisting of bFGF and the collagen-binding domain (CBD) of Clostridium histolyticum collagenase. The affinity of the fusion protein towards collagen and demineralized bone powder (DBP) was confirmed by collagen-binding assays. Moreover, the combination of the collagen binding-bFGF fusion protein (CB-bFGF) with collagen powder or DBP induced bone formation at protein concentrations lower than those required for bFGF alone in mice fracture models. Therefore, because of the potential adverse effects of bFGF, particularly when administered at high doses, the use of CP/CB-bFGF composite may be a safer alternative for bone repair by limiting bFGF exposure at fracture sites. Taken together, these properties suggest that the CB-bFGF/collagen powder composite is a promising injectable material for fracture healing in the clinical setting.

研究分野：整形外科

キーワード：コラーゲン結合型成長因子 コラーゲン 脱灰骨 骨折治癒

1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い骨折患者数は年々増加している。高齢者における骨折は脳血管疾患、高齢による衰弱に次ぐ寝たきり原因の3位である。寝たきりは認知症や肺炎、褥瘡など、重篤な合併症を引き起こすことから、高齢者の骨折治療は極めて重要である。しかしながら若年者に比べ高齢者の骨折治癒は遷延することが知られており、高齢者の骨折治癒促進法の開発は急務である。我々は、日本組織移植学会認定骨バンクを整備し、ドナーからの骨組織を採取、処理、保存した安全性の高い骨組織を骨欠損治療に用いてきた。一方、基礎研究により、細菌性コラゲナーゼのコラーゲン結合ドメインを用いて塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を骨組織にアンカーリングすることで、骨移植後の骨形成を促進できることを示した。さらにコラーゲン結合性血管内皮成長因子を用いることで血管新生の促進が可能であった。しかし、骨折モデルを用いた検証には至っていなかった。

2. 研究の目的

骨折部への局所投与を可能とした粉碎骨組織、コラーゲン粉末とコラーゲン結合型成長因子を用いた低侵襲な骨折治癒促進法の実用化を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)高齢者骨折モデルに対するコラーゲン結合型 bFGF(CB-bFGF)とコラーゲンパウダー併用効果の検討

コラーゲンパウダーに対するコラーゲン結合ドメイン(CBD)の結合性の検討
0、5、10、15 mgのコラーゲンパウダーと30 µgのCBDを混合後、上清をSDS-PAGE法で分析することでICPとコラーゲン結合ドメイン(CBD)の結合性を検討した。

骨形成促進能の検討

高齢者骨折を模擬して、高週齢 C57BL/7J マウスの大腿骨骨折モデルを作製した(n=6)。局所投与を可能なコラーゲンパウダーに0.058 nmole, 0.58 nmole のコラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子(CB-bFGF)をアンカーリング後、骨折部に投与を行った。コラーゲンパウダーのみを投与した群(PBS/CP群)、0.58 nmole のbFGFとコラーゲンパウダーを混合後投与した群(bFGF/CP群)をコントロールとした。投与後、2,4,6週で大腿骨を採取し、microCT撮影を行い、新生骨量、骨塩量を測定した。

(2)高齢者骨折モデルに対するコラーゲン結合型 bFGF と同種脱灰粉碎骨の併用効果の検討

同種粉碎脱灰骨の作製

C57BL/6J(MHCハプロタイプH-2K^b)とMHCハプロタイプの異なるC3H/HeN(MHCハプロタイプH-2K^k)マウスより大腿骨を採取後、粉碎、脱脂凍結乾燥、脱灰を行い、同種脱灰粉

砕骨を作製した。作製後、Alexa594 標識CB-bFGF と混合し、同種脱灰粉碎骨に対するCb-bFGF の結合を検討した。また、上清中のCB-bFGF 量をELISA法により定量した。

骨形成促進能の検討

0.058 nmole, 0.58 nmole のコラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子(CB-bFGF)をアンカーリング後、骨折部に投与を行った。同種脱灰粉碎骨のみを投与した群(PBS群)、0.58 nmole のbFGF と同種粉碎脱灰骨を混合後投与した群(bFGF群)をコントロールとした。投与後、2,4,6週で大腿骨を採取し、microCT撮影を行い、新生骨量、骨塩量を測定した。

4. 研究成果

(1) 高齢者骨折モデルに対するコラーゲン結合型 bFGF(CB-bFGF)とコラーゲンパウダー併用効果の検討

コラーゲンパウダーに対するCBDの結合性ICPの用量依存性に上清中のCBDが低下した。また、EDTAによりカルシウムをキレートすることによってICPとCBDの結合は阻害された。ゲルデンシトメトリーの結果、コラーゲンパウダー 1mg あたり 0.152 ± 0.017 nmole のCBDが結合することが明らかになった(図1)。

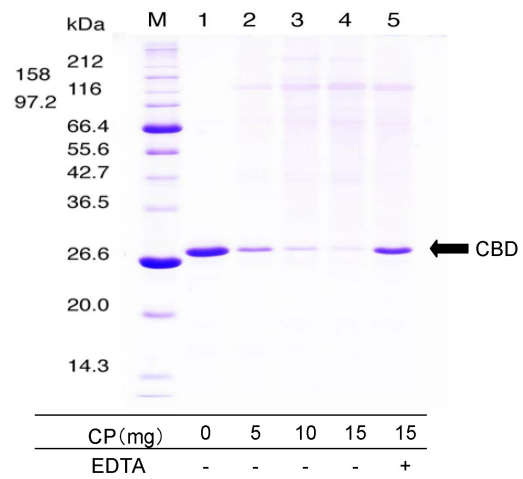


図1. コラーゲン結合試験

レーン M: 分子量マーカー, レーン 1: コラーゲンパウダー(CP) 1mg, レーン 2: CP 5mg, レーン 3: CP 10mg, レーン 4: CP 15mg, レーン 5: CP 15mg + EDTA

コラーゲンパウダーとCB-bFGFの併用による骨形成促進効果

投与後4、6週の時点で0.58 nmole CB-bFGF群はPBS群、bFGF群に比べ多くの新生骨が形成された。また、投与後6週の時点で0.058nmole, 0.58 nmole CB-bFGF群はbFGF群、PBS群に比べ高い骨形成能を示した(図2)。このことからコラーゲンパウダーとCB-bFGFの併用は高齢者の骨折治癒促進に有

用であると考えられた。

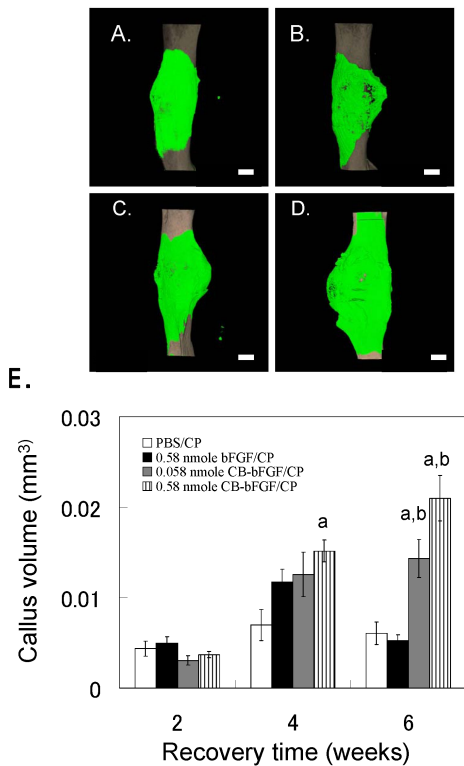


図2. コラーゲンパウダー投与後の仮骨形成
A-D: 骨折後6週の microCT 像 A: PBS/CP, B: 0.58 nmole bFGF/CP, C: 0.058 nmole CB-bFGF/CP, D: 0.58 nmole CB-bFGF/CP.
E: 骨折後6週の仮骨量. A は PBS/CP 群、b は bFGF/CP 群との有意差 (Tukey Multiple Comparison Test, $P < 0.05$) を表している。

(2) 高齢者骨折モデルに対するコラーゲン結合型 bFGF と同種脱灰粉末骨の併用効果の検討

同種脱灰粉末骨に対する CB-bFGF の結合性作製した同種脱灰粉末骨を図 3A に示す。CB-bFGF 溶液との混合により CB-bFGF の同種脱灰粉末骨への結合が認められた (図 3B)。ELISA 法による上清の CB-bFGF 量測定の結果、同種脱灰粉末骨 1 mg に対し、0.51 nmole 結合することが明らかになった。

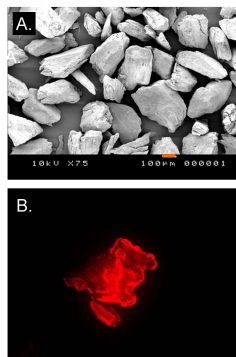


図3 同種脱灰骨に対する結合性
A. 同種粉末脱灰骨の走査電子顕微鏡像
B. 蛍光顕微鏡像 (赤: Alexa594 標識 CB-bFGF)

同種脱灰粉末骨と CB-bFGF の併用による骨形成促進効果

投与後 4、6 週の時点で 0.58 nmole CB-bFGF 群は PBS 群、bFGF 群に比べ多くの新生骨が形成された。また、投与後 6 週の時点で 0.58 nmole CB-bFGF 群は bFGF 群、PBS 群に比べ高い骨形成能を示した (図 4)。

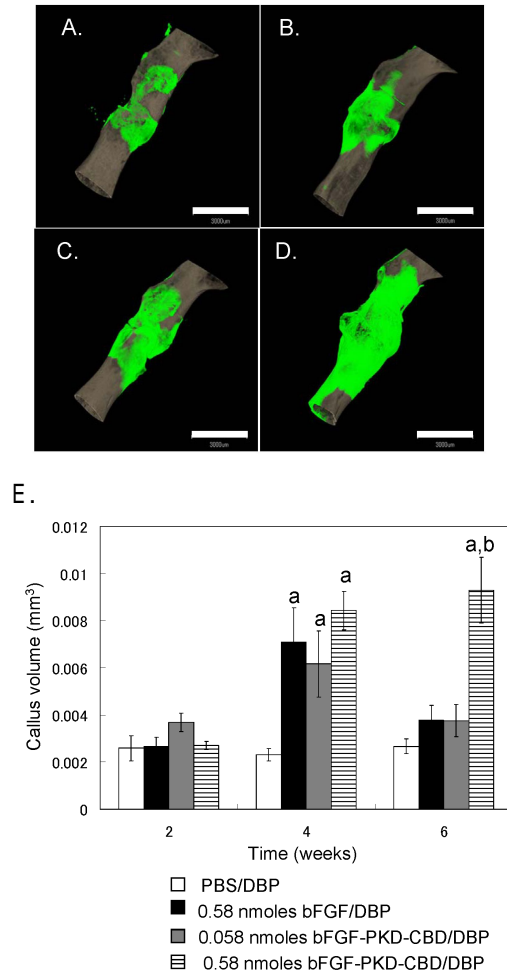


図4. 同種脱灰粉末骨投与後の仮骨形成

A-D: 骨折後6週の microCT 像 A: PBS/DBP, B: 0.58 nmole bFGF/DBP, C: 0.058 nmole CB-bFGF/DBP, D: 0.58 nmole CB-bFGF/DBP.
E: 骨折後6週の仮骨量. A は PBS/DBP 群、b は bFGF/DBP 群との有意差 (Tukey Multiple Comparison Test, $P < 0.05$) を表している。DBP: 同種粉末脱灰骨

これらの結果から、コラーゲンパウダーと CB-bFGF、同種脱灰粉末骨と CB-bFGF の併用は高齢者の骨折治療法として有用である可能性が示唆された。これらの結果に関しては論文、学会発表として報告した。

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 5件)

Saito W, **Uchida K**, Matsushita O, Inoue G, Sekiguchi H, Aikawa J, Fujimaki H, Takaso M. Acceleration of callus formation during fracture healing using basic fibroblast growth factor-kidney disease domain-collagen binding domain fusion protein combined with allogenic demineralized bone powder. *J Orthop Surg Res*, 10(1):59, 2015 doi: 10.1186/s13018-015-0201-0. (査読有)

Uchida K, Matsushita O, Nishi N, Inoue G, Horikawa K, Takaso M. Enhancement of periosteal bone formation by basic fibroblast-derived growth factor containing polycystic kidney disease and collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Tissue Eng Regen Med*, 2015 doi: 10.1002/term.2019. in press (査読有)

Ueno M, **Uchida K**, Saito W, Matsushita O, Yogoro M, Nishi N, Ogura T, Hattori S, Inoue G, Tanaka K, Takahira N, Takaso M. Acceleration of bone union after structural bone grafts with collagen-binding basic fibroblast growth factor anchored-collagen sheet for critical-size bone defects. *Biomed Mater*, 9(3):035014, 2014 doi: 10.1088/1748-6041/9/3/035014. (査読有)

Saito W, **Uchida K**, Ueno M, Matsushita O, Inoue G, Nishi N, Ogura T, Hattori S, Fujimaki H, Tanaka K, Takaso M. Acceleration of bone formation during fracture healing by injectable collagen powder and human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Biomed Mater Res A*, 102(9):3049-55, 2014. doi: 10.1002/jbm.a.34974. (査読有)

Uchida K, Matsushita O, Naruse K, Mima T, Nishi N, Hattori S, Ogura T, Inoue G, Tanaka K, Takaso M. Acceleration of periosteal bone formation by human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Biomed Mater Res A*, 102(6), 1737-43, 2014. doi: 10.1002/jbm.a.34841. (査読有)

〔学会発表〕(計 9件)

齋藤 亘、内田健太郎、井上玄、松下治、大貫裕子、藤巻寿子、関口裕之、相川 淳、高平尚伸、高相晶土. Bone Powder とコラーゲン結合型線維芽細胞増殖因子による骨折後の骨形成促進効果の検討. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会, 2014年10月9-10日, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

齋藤 亘、内田健太郎、井上玄、松下治、大貫裕子、藤巻寿子、関口裕之、相川 淳、高平尚伸、高相晶土. Bone powder とコラーゲン結合型線維芽細胞増殖因子による骨折後の骨形成促進効果の検討. 第33回日本運動器移植・再生医学研究会, 2014年9月27日, 第一ホテル両国(東京都墨田区).

Saito W, **Uchida K**, Ueno M, Matsushita O, Inoue G, Nishi N, Ogura T, Hattori S, Fujimaki H, Tanaka K, Takaso M. Acceleration of bone formation during fracture healing by injectable collagen powder and human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain from *Clostridium histolyticum* collagenase. APASTB/JSTT Combined Scientific Meeting 2014, 2014年8月27-29日, 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

Uchida K, Matsushita O, Naruse K, Inoue G, Takaso M. Acceleration of periosteal bone formation by human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain from *Clostridium histolyticum* collagenase. World Congress on Controversies, Debates & Consensus in Bone, Muscle & Joint Diseases, 2013年11月22-24日, Brussels (Belgium)

齋藤 亘、内田健太郎、上野正喜、井上玄、大貫裕子、松下治、高相晶土. Injectable コラーゲンパウダーとコラーゲン結合型線維芽細胞増殖因子による骨折後の骨形成促進効果の検討. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会, 2013年10月18-19日, 幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市)

上野正喜、内田健太郎、齋藤 亘、余頃瑞希、井上玄、松下治、高平尚伸、高相晶土. コラーゲン結合性線維芽細胞増殖因子(bFGF-CBD)とコラーゲンシートの併用による同種骨移植後の骨癒合促進. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会, 2013年10月18-19日, 幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市)

内田健太郎、松下 治、成瀬康治、井上玄、上野正喜、齋藤 亘、余頃瑞希、美間健彦、占部 憲、高相晶土. コラーゲン結合型線維芽細胞増殖因子と脱灰骨を用いた骨形成促進法の確立. 第12回日本再生医療学会総会, 2013年3月21-23日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

内田健太郎、松下 治、成瀬康治、伊藤大器、美間健彦、糸満盛憲、高相晶土. マトリックスアンカーリング機構を応用した

新規骨形成促進法の確立．第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会，2012 年 10 月 26-27 日，名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

伊藤大器、内田健太郎，松下 治，成瀬康治，美間健彦，上野正喜、占部 憲、馬淵清資、高相晶士．コラーゲン結合性塩基性線維芽細胞成長因子とコラーゲンシートを用いた骨形成促進法の有用性に関する検討．2012 年 10 月 26-27 日，名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

6．研究組織

(1)研究代表者

内田 健太郎 (UCHIDA, Kentaro)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：50547578