

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 13 日現在

機関番号：85407

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890131

研究課題名(和文) 進化分子工学と先端接着技術による新しい骨折予防・治療法の開発と実用化に向けた検討

研究課題名(英文) Study for the development of new fracture treatment by the adhesive technology evolution and molecular engineering

研究代表者

塩崎 泰之 (Shiozaki, Yasuyuki)

独立行政法人国立病院機構福山医療センター(臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：00596041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：BMP familyは、骨形成の促進や様々な細胞へ分化させる能力を持っており広く医学研究や臨床現場においても使用されている。脊椎領域においても諸外国で骨癒合を促進させるために使用されている。しかし、異所性骨化の危険や大量に投与しなければ効果が得られないなどの問題もある。我々は、FibronectinをBMP4と結合しコラーゲンへの定着能を持ったCollagen-binding domain (CBD)BMP4を生成した。様々な動物モデルを使用しこれらの効果を検証した。

研究成果の概要(英文)：BMP family proteins are widely used for biological research and medical application because of their ability to induce bone morphogenesis at adult homeostasis and differentiation of epidermis and dorsal neural tube at early development. Utilizing growth factors that stimulate bone morphogenesis with a bone implant is a promising approach in regenerative medicine. We create a fusion protein consisting of bone morphologic protein-4 and a collagen-binding domain polypeptide of fibronectin. This fusion protein (CBD-BMP4), produced by a baculovirus expression system, exhibited much strong collagen binding activity. The aim of this study is to examine the effect of this fusion protein for repair of bone defect.

研究分野：整形外科学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：成長因子 骨形成 進化分子工学

### 1. 研究開始当初の背景

重傷外傷や骨軟部腫瘍等による骨欠損や偽関節は現在も整形外科領域で大きな問題である。自家骨移植はそれらに対する標準的な治療であるが、採骨部の痛み、神経障害、血腫、感染、骨折などの合併症が時に発生する。近年、それらの代替法として生体適合性を持つ担体の使用や、幹細胞を使用した治療などが報告されている。さらに、成長因子を使用した骨形成治療も注目されている。多くの成長因子が骨形成へ関与している。骨形成タンパク質 Bone morphogenetic proteins (BMP) は、transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) family に分類され、骨導入や修復に関与している事が知られている。アメリカでは BMP2 BMP7 を含有する生体吸収性コラーゲンスポンジが臨床現場で使用されている。これらの有益生も多く報告されているが、異所性骨化などの合併症の報告もある。目標組織のみに留まらせる事がこの合併症の予防となる。BMP4 は骨芽細胞、骨幹細胞の分化を促進し骨形成を促す。このことから、骨軟骨再生分野においても重要な役割がある。

### 2. 研究の目的

骨折などの整形疾患において、BMP 等の成長因子は治療に非常に効果的に働く。しかし、これらの機能を十分に発揮させるには、まず患部にそれらの薬剤を留め、必要に応じて効果的に徐放させる技術を開発しなければならない。本研究では、理化学研究所と岡山大学で共同開発した**進化分子工学の手法を用いて創製する結合性改変成長因子**を効果的に用いることにより、骨粗鬆症患者の骨折予防や骨折治療に有効な新しい骨組織再生・再建技術を開発する。

### 3. 研究の方法

CBD-BMP4 の作成を行った。CBD と BMP4 の遺伝子導入した遺伝子改変蚕より作成する。CBD と BMP4 の結合部にエンテロキナーゼを設置する。この結合性タンパク質は繭糸内に抽出される。それらを回収しゲラチンセファロース 4B(GE Healthcare, Waukesha, WI, USA)で親和、精製する。比較対照群として CBD のみ、R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)より購入した BMP4 を使用した。実験では、HiLyte Fluor 555(Dojindo Molecular Technologies, Inc, Kumamoto, Japan)を使用して蛍光標識を行った。作成した CBD-BMP4 の特性試験を行った。精製した CBD-BMP4 タンパク質をエンテロキナーゼ (EK Max, Life Technologies 社製) で切断させた後、SDS-PAGE ゲルで泳動し、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色を行った。ウエスタンブロット解析用サンプルは、SDS-PAGE ゲルで泳動後、PVDF 膜に転写した。PVDF 膜は anti-BMP4 抗体 (R&D) と反応させた後 HRP2 次抗体と反応させ、ECL system (GE Healthcare) で化学発光させ可視化した。CBD-BMP4 タンパク質の結合能の安定性を確認

するため、CBD-BMP4, BMP4 タンパクを 0.2% コラーゲンゲル/EMEM メディウム pH7.4(高研)と混合し、37°C、1 時間でゲル化させた。次にその上に PBS を入れ、経時的に回収した (1、3 時間、1、3、7 日)。それぞれのタンパクの PBS への放出は、ニトロセルロースメンブレン上でドットプロット法を用い、既述の BMP4 抗体を使用し、パーオキシダーゼ酵素用の発色基質であるクロロナフトールを用いて青色発色させた。

BALB/c マウス(6 週齢)を使用した。両側大腿遠位を展開し 24 ゲージ針を用いて大腿髓内に空洞を作成した。その後、CBD-BMP4 と rhBMP4 を髓内に投与した。これらを各期間経過観察した後に、屠殺し大腿骨を摘出した。放射線学的、組織学的に解析した。放射線学的解析は動物用  $\mu$ CT を使用し、骨密度骨を計測した。また、大腿骨骨髓より RNA を抽出し、それらの発現を検討した。さらに、CBD-BMP4 と rhBMP4 を投与前に蛍光標識を行い、それらを同様に大腿骨に投与し 1、2、7 日目に非脱灰標本を作成し免疫蛍光染色法でそれらの残存を観察した。

マウス骨欠損モデルとして、頭蓋骨欠損モデルを使用した。欠損部を洗浄後、CBD-BMP4、BMP4、CBD、PBS を投与した。2 週後に屠殺し、 $\mu$ CT で欠損部の骨形成を評価した。さらに、欠損部を摘出し、10%ホルマリンで固定した後、10%の EDTA で脱灰し、パラフィン固定を行った。これらを HE 染色した。

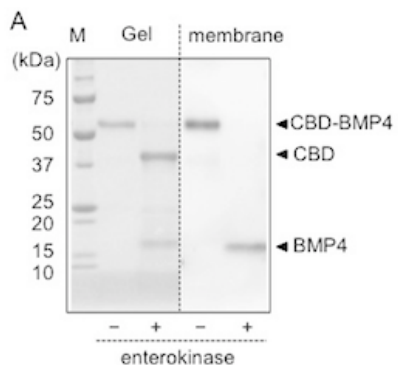
9 羽の New Zealand white rabbits を使用した。ケタミン 50mg/kg とイソフルレンを用いて全身麻酔を行った。両膝内側を剃毛、消毒し長軸方向に皮膚切開を加え大腿骨遠位部を展開した。 $\phi$ 5mm のドリルを用いて 5mm の骨欠損を大腿骨遠位に作成した。 $\phi$ 3mm の Atelocollagen sponge (MIGHTY, Koken) に: Group A 生食 50  $\mu$ l ; Group B 1  $\mu$ g rhBMP-4 を生食 50  $\mu$ l に溶解したもの; Group C 1  $\mu$ g CBD-BMP4 を生食 50  $\mu$ l に溶解したものをそれぞれ投与しこれらを、骨欠損部に投与した。術後 4 週後に大腿骨を取り出し X 線学的、病理学的に評価した。X 線学的評価は micro-CT (ALOKA)を用いて撮影した。再構成した CT 画像の Atelocollagen sponge 内の骨化範囲を WinROOF image processing software (Mitani, Tokyo, Japan)を用いて計測した。

病理学的評価は、10%ホルマリンで固定後、10% EDTA で脱灰し、hematoxylin-eosin (HE)染色を行った。これらの 100 倍視野での骨化範囲を WinROOF image processing software (Mitani, Tokyo, Japan) で測定した。また、Anti-BMP4 antibody (Santa Cruz)を用いた免疫染色も行った。

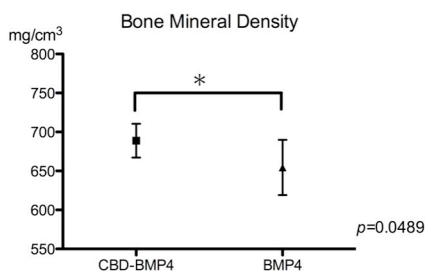
### 4. 研究成果

CBD-BMP4 の特性試験で計算された分子量は CBD-BMP4: 52.5kD, CBD: 39kD, BMP4: 13kDa であった。また、エンテロキナー

ーゼによる酵素処理によって、この融合タンパク質は CBD と BMP4 から成ることが確認された。In vitro において、コラーゲンゲル中の CBD-BMP4 は少なくとも7日間はゲル中に存在していた、また BMP4 のみでは1時間でゲル中から放出され、1日後には検出不可能であった。これらのことは CBD-BMP4 が BMP4 単体よりもコラーゲンへの結合性がはるかに高いことを示している。

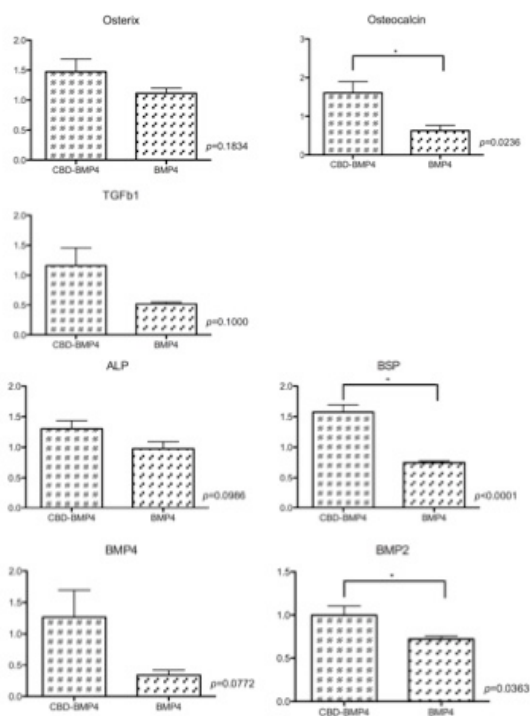


マウスの実験において、投与後4週での骨密度は CBD-BMP4 群が高かった。(下図)

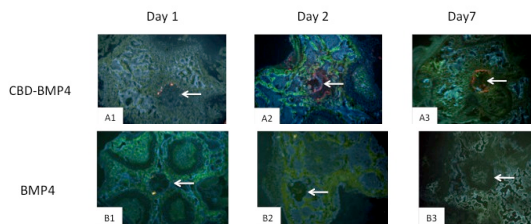


Comparison of BMDs between CBD-BMP4 and BMP4 in femur of mice. BMDs was calculated by  $\mu$ CT.  $p=0.0489$ .

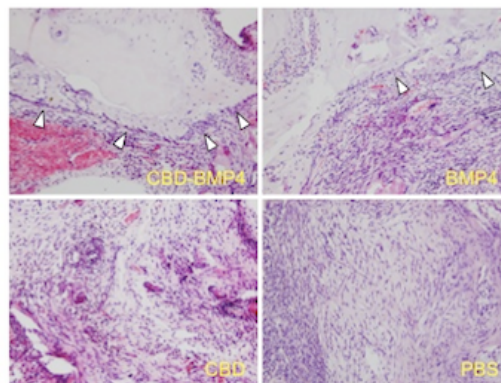
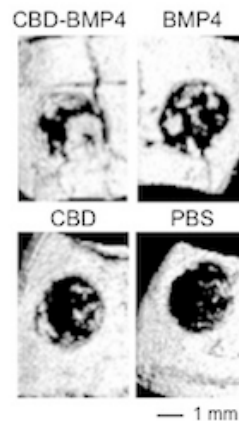
QRT-PCR で、Alkaline Phosphatase (ALP), BSP, osterix, osteocalcin, BMP4, BMP2 and TGF $\beta$ 1 の発現は、CBD-BMP4 群が高かった。(下図)



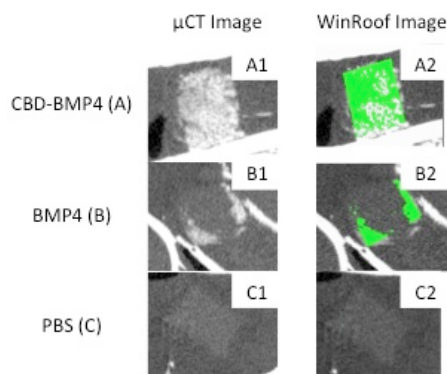
また、免疫蛍光染色においても、CBD-BMP4 群でそれらの残存が認められた。

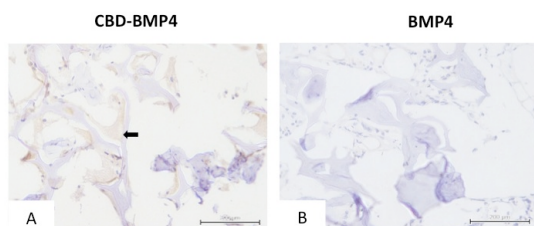
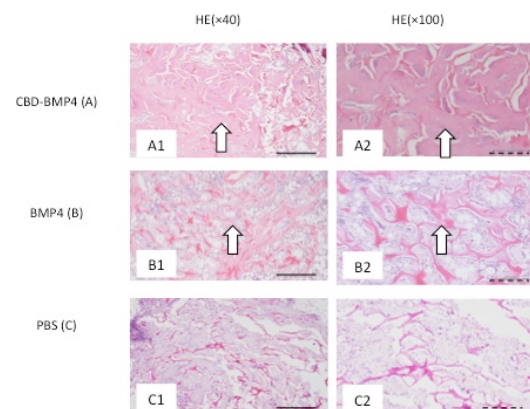
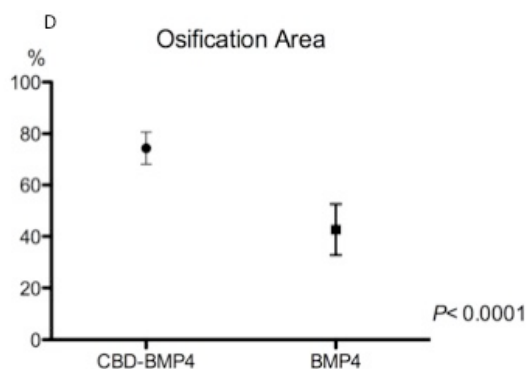


骨欠損モデルでは、CBD-BMP4 で加療した群は、他の群よりも CT、病理組織においても優れた骨形成が認められた。



Rabbits において、X 線学的評価では、Group A は骨化が認められなかった。Group B と Group C を比較し、Group C で優位に大きかった (Student's t-test  $p<0.0001$ )。病理学的評価でも同様に Group C で優位に大きかった。免疫染色では、Group C にのみ BMP4 の染色がみられた。





これらの結果より、CBDBMP4 は高い組織性着生を持ち、既存の BMP4 に比して、骨形成能に優れていると考える。

細胞外マトリックスへ成長因子を定着させる事でより効果をたかめる。本研究で使用した CBD-BMP4 もコラーゲン接着能をもつ CBD を付加した事で骨形成能が BMP4 よりも強かった。投与後 2 週でも CBD-BMP4 は組織に残存し、投与後 8 週でも骨形成は進んでいた。他の研究でも様々な手法で CBD は作成されてきた。我々の CBD-BMP4 は担体を必要としない事である。CBD-BMP2 を作成した研究があるが、脱灰骨を担体と使用しており、骨自体に様々な因子が混在している。次に、少量の単回投与で効果があった事である。我々はマウスには 2pM のみ投与している。他の研究では 8nM を必要とされていた。少量投与で効果が得られれば多量に使用した際に懸念される合併症も回避できる。また、骨形成マーカーの発現も強める事から間接的にも骨形成能を増強させる事ができる。CBD のみの投与でも CBD-BMP4 と同様に組織に接着している。CBD は細胞外マトリックス由来のフィブロネクチンである。フィブロネクチンも骨形成に関与している事から CBD のみの投与でも骨形成能を増強させた可能性がある。CBD-BMP4 の効果についての疑問点は多

く存在する。組織へ接着していると考えているが、それを直接証明は出来ていない。また、どのようにして BMP4 レセプターに接着している、周辺細胞の変化などこれからも解明していく必要がある。

#### 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. Enhanced in vivo osteogenesis by nanocarrier-fused bone morphogenetic protein-4. Shiozaki Y. Kitajima T. Mazaki T. Yoshida A. Tanaka M. Umezawa A. Nakamura M. Yoshida Y. Ito Y. Ozaki T. Matsukawa A. Int J Nanomedicine. 2013;8:1349-60 doi: 10.2147/IJN.S44124

2. A novel, visible light-induced, rapidly cross-linkable gelatin scaffold for osteochondral tissue engineering. Mazaki T. Shiozaki Y. Yamane K. Yoshida A. Nakamura M. Yoshida Y. Zhou D. Kitajima T. Tanaka M. Ito Y. Ozaki T. Matsukawa A. doi: 10.1038/srep04457

[学会発表] (計 2 件)

1. 第 86 回日本整形外科学会学術総会 2013/05/23 - 26 広島グリーンアリーナ

2. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012/10/26 27 名古屋国際会議場

3. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012/11/26 27 仙台国際センター

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩崎 泰之 (SHIOZAKI, Yasuyuki)

独立行政法人国立病院機構福山医療センター (臨床研究部)

研究者番号: 00596041