

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293341

研究課題名(和文) 成長因子アンカーリング型運動器再生シーズの顕在化・育成研究

研究課題名(英文) Musculoskeletal regeneration using Growth factor-anchored materials

研究代表者

高相 晶士 (Masashi, Takaso)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90439117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨再生シーズの実用化と軟骨再生、末梢神経再生への応用を目指して検討を行った。コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子(CB-bFGF)の臨床応用に向けてタンパク質をコードする遺伝子のコドン最適化を行い、CB-bFGFのbFGF活性を損なうことなく、タンパク質の産生効率を向上させることに成功した。細胞配行性コラーゲンチューブ(OCT)にbFGFを結合させることで早期に末梢神経組織の再生、運動機能の回復が可能であった。産学連携で作製した新規高密度コラーゲン材料は既存のコラーゲン材料に比べ、強度、軟骨再生能に優れていた。これらの材料は運動器再生に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We performed codon optimization for the protein purification toward the clinical setting. Codon optimization improved the protein production without loss of bFGF activity. To attempt to apply the bone regeneration improved seeds to the sciatic nerve regeneration and cartilage regeneration, we developed a new collagen scaffold materials, oriented collagen tubes (OCT) for peripheral nerve regeneration and high density collagen scaffold (HDCS) for cartilage repair. bFGF-anchored OCTs promoted peripheral nerve tissue repair and motor function. HDCS had higher collagen density, mechanical property, and ability to promote cartilage repair compared to existing collagen materials. These materials are promising agent for promoting musculoskeletal repair in the clinical setting.

研究分野：運動器再生医療

キーワード：運動器再生医療 コラーゲン結合型成長因子 細菌コラゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

運動器は人が自分の意志で活用できる唯一の器官であり、運動器による活動を介して、人間としての生活や活動を行っている。従って、外傷による骨折、関節機能の破綻、末梢神経障害は日常動作、生活の質の低下のみならず精神的苦痛を与える。運動機能障害から開放し、終生すこやかに身体を動かすことができる「生活・人生の質」の保証される社会の実現化には、早期かつ確実性の高い運動器再建法は必須である。

2. 研究の目的

本研究の目的は塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) と細菌コラゲナーゼ由来のコラーゲン結合ドメイン (CBD) からなる融合タンパクをコラーゲン材料にアンカーした新規材料 (成長因子アンカリング型コラーゲン材料) を用いた運動器再建法の確立を目指すことである。

3. 研究の方法

(1) 骨再生シーズの育成研究

これまで、ヒト由来 bFGF と細菌性コラゲナーゼ由来のコラーゲンアンカー (PKD-CBD) の融合タンパク質 hbFGF-PKD-CBD を大腸菌発現系を用いて産生してきた。実用化に向けて生産性を向上すべく、タンパク質をコードする遺伝子のコドン最適化を行った。従来精製法で精製した bFGF-PKD-CBD (native) とコドン最適化後の bFGF-PKD-CBD (opt) の生理活性を *in vitro* の細胞増殖試験およびマウス大腿骨骨折モデルを用いて検討した。

細胞増殖試験 (*in vitro*)

マウス胎児由来線維芽細胞株 (BALB/3T3 clone A31) を 1×10^3 /well になるように 96 穴プレートに播種した。0, 0.1, 1, 10, 100 pM の bFGF, bFGF-PKD-CBD (native), bFGF-PKD-CBD (opt) で 4 日間培養後、WST assay により細胞増殖能を評価した。

マウス大腿骨骨折モデルにおける骨形促進能の検討

9 週齢雄 C57BL/6J 40 匹を実験に用いた。5 mg のコラーゲンパウダーと 0.58 nmoles の bFGF, bFGF-PKD-CBD (native), bFGF-PKD-CBD (opt) を混合後、マウス大腿骨骨折部に投与した。骨折 4 週間後、大腿骨を採取し、microCT による骨量、骨塩量解析を行った。

(2) 末梢神経再生シーズの顕在化研究

7 週齢ラット坐骨神経 15mm 欠損モデルを難治性神経欠損モデルとして用いた。神経欠損部に産学連携で開発した人工神経 (OCT) を移植し、神経再生と運動機能回復の程度を評価した。リン酸緩衝液 (PBS) に浸漬させた人工神経のみを欠損部に移植した群 (OCT/PBS 群) bFGF 溶液に人工神経を浸漬後移植した群 (OCT/bFGF 群) 欠損のみの群 (defect 群) を作成し比較検討を行った。運動機能は歩行

解析装置 (CatWalk) を用いて、移植後 1、4、8 週の Max Contact area, Swing Speed, Stride length を測定した。また、透過電子顕微鏡を用いて再生した有髄神経数を測定した。

(3) 軟骨再生シーズの顕在化研究

コラーゲン密度の測定

新規円柱コラーゲン材料と既存の円柱コラーゲン材料のコラーゲン密度を比較した。各コラーゲン材料を、3ml の 6N HCl にて 110、24 時間加水分解後、蒸発乾固し、0.02N HCl で再溶解した。得られた溶液をサンプルとし、日立製 L-8800 Amino Acid Analyzer でヒドロキシプロリン量を測定した。[Collagen(mg) = 係数 × Hypro(mg)] の式を用いてコラーゲン量を計算した。

強度測定

新規円柱コラーゲン材料と既存の円柱コラーゲン材料の材料強度を比較した。直径 5mm、高さ 3mm の円柱状のコラーゲン構造体を試料として用いた。測定装置はデジタルフォースゲージ FGP-100 (日本電産シンポ株式会社) と縦型荷重試験スタンド FGS-50VB (日本電産シンポ株式会社) を用いた。速度 1mm/s で、コラーゲン構造体の円柱の底面及び上面に垂直な方向に荷重をかけて試料を圧縮し、圧縮剛性を測定した (N=3)。測定値の解析には、フォースゲージ FGP シリーズ、Excel 用アドインソフト、トリエもん UCB Ver 1.00 (日本電産シンポ株式会社) を使用した。

軟骨再生促進能の評価

日本白色家兎大腿骨に直径 4.5mm、深さ 5mm の骨軟骨欠損を作製した。高密度コラーゲン円柱コラーゲンを移植した群、対照群として既存の円柱状コラーゲン材料を用いた。移植後 24 週で組織を採取し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液による固定、0.5M EDTA 溶液による脱灰を行った。パラフィン薄切切片を作成後、サフラニン-O 染色を行った。

4. 研究成果

(1) 骨再生シーズの育成研究

従来法では 2 liter の培養液から 3.9 mg の hbFGF-PKD-CBD (native) が精製できたのに対し、コドンを大腸菌に最適化することにより 5.2mg の hbFGF-PKD-CBD (opt) が精製可能であった。また、*in vitro* での細胞増殖試験では hbFGF-PKD-CBD (native)、hbFGF-PKD-CBD (opt) とともに bFGF と同等の細胞増殖促進能を示した。また、両者の細胞増殖促進能に差異は認められなかった。また、マウス骨折モデルに対する新生骨量増加効果、骨塩量増加効果も同等であった。

コドンの最適化によりコラーゲン結合型成長因子 (CB-bFGF) の活性を落とすことなく生産性を向上させることが可能であった。また、これまでに大腸菌 BL21-CodonPlus-RIL 株を用いてきたが、コドンの最適化により宿主株 BL21 への変更が可能になり Cp 添加が不

要になった。これにより医薬品として組換えタンパク質を発現する際、Cpの残留を考慮する必要がなくなった。本研究によりhbbFGF-PKD-CBD 実用化に向け大きく前進できたものと考えられる。

(2)末梢神経再生シーズの顕在化研究

CatWalk 装置を用いた行動学的評価では移植後4週でOCT/PBS群、OCT/bFGF群ともにdefect群に比べ有意にMax Contact areaの改善を認めた(図1A)。さらにOCT/bFGF群は移植後8週でMax Contact area, Swing Speed, Stride lengthの回復を認めた(図1B,C)。

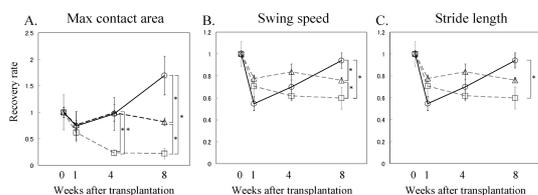


図1. 人工神経移植後の運動機能回復

: defect群 : OCT/PBS群 : OCT/bFGF群

電子顕微鏡による組織学的評価では、OCT/bFGF群では移植後4週でOCT/PBS群と比較して有意に有髄神経数の増加を認めた。移植後8週で両群ともに有髄神経の再生を認めた(図2)

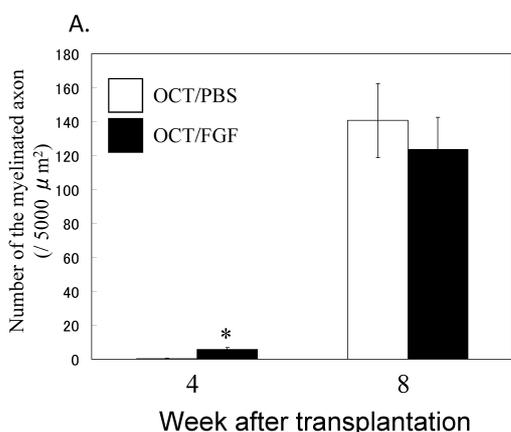


図2. 有髄神経数

OCTおよびbFGF結合OCTは末梢神経再生に有用である可能性が示された。本成果は特許出願、英文学術誌掲載(発表論文3)を果たすとともに、JSTの国際特許化支援に採択され、米国への指定国移行を達成した。更なる検討により実用化が期待できるものと考えられる。

(3)軟骨再生シーズの顕在化研究

既存の円柱コラーゲン材料のコラーゲン密度が 90.00 ± 13.89 (mg/cm³)であったのに対し、新規円柱コラーゲン材料のコラーゲン密度は 374.14 ± 13.89 (mg/cm³)であった。

また、既存の円柱コラーゲン材料の剛性が 68.15 ± 6.07 (kPa/mm)であったのに対し、新規円柱コラーゲン材料のコラーゲン密度は 2428.6 ± 296.63 (kPa/mm)であった。

移植後、本材料では軟骨再生が認められた(図3A,B)。一方、既存の円柱コラーゲン材料では軟骨再生は認められなかった(図3C,D)。

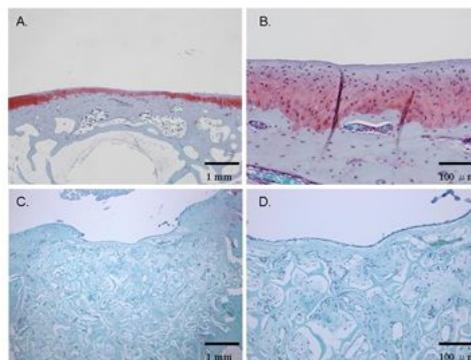


図3. 円柱コラーゲン材料移植後24週のサフラニン-O染色像

本シーズは従来のコラーゲン材料に比べ高いコラーゲン密度、強度に加え、高い軟骨再生能を有していた。本研究成果は特許出願(2014-246016)を果たすとともに産学連携で実用化研究に着手しており、本シーズは今後実用化が期待できるものと考えられる。

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6件)

- Inoue G, Uchida K, Matsushita O, Fujimaki H, Saito W, Miyagi M, Sekiguchi H, Nishi N, Ohtori S, Yogoro M, Takaso M. Effect of Freeze-Dried Allograft Bone with Human Basic Fibroblast Growth Factor Containing a Collagen-Binding Domain From Clostridium Histolyticum Collagenase on Bone Formation After Lumbar Posterolateral Fusion Surgery in Rats, Spine, in press doi: 10.1097/BRS.0000000000002074. (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, 11(4):1165-1172, 2017, doi: 10.1002/term.2019. (査読有)

3. Fujimaki H, Uchida K, Inoue G, Miyagi M, Nemoto N, Saku T, Isobe Y, Inage K, Matsushita O, Yagishita S, Sato J, Takano S, Sakuma Y, Ohtori S, Takahashi K, Takaso M. Oriented collagen tubes combined with basic fibroblast growth factor promote peripheral nerve regeneration in a 15 mm sciatic nerve defect rat model, J Biomed Mater Res A, 105(1):8-14, 2017, doi: 10.1002/jbm.a.35866. (査読有)
4. Sekiguchi H, Uchida K, Inoue G, Matsushita O, Saito W, Aikawa J, Tanaka K, Fujimaki H, Miyagi M, Takaso M. Acceleration of bone formation during fracture healing by poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀ and basic fibroblast growth factor containing polycystic kidney disease and collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum* collagenase., J Biomed Mater Res A, 104(6):1372-8, 2016 doi: 10.1002/jbm.a.35670. (査読有)
5. 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, 10:59, 2015 doi: 10.1186/s13018-015-0201-0. (査読有)
6. 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)

〔学会発表〕(計 7件)

1. Sekiguchi H, Uchida K, Inoue G, Saito W, Aikawa J, Fujimaki H, Nagura N, Takano S, Miyagi M, Takaso M. Acceleration Of Bone Repair During Fracture Healing By Poly(pro-hyp-gly)₁₀ And Basic Fibroblast Growth Factor Containing Collagen-binding Domains From *Clostridium Histolyticum* Collagenase.

Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2017, 2017年3月19-22日, San Diego

2. 藤巻寿子、井上玄、内田健太郎、宮城正行、大鳥精司、高相晶土. 細胞配向性コラーゲンチューブによる末梢神経再生 - ナーブブリッジ™との比較検討-. 第31回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016年10月13-14日, 福岡国際会議場(福岡)
3. 関口裕之、内田健太郎、井上玄、相川淳、齋藤巨、宮城正行、松下治、藤巻寿子、高野昇太郎、名倉直重、高相晶土. 新規コラーゲン結合型線維芽細胞増殖因子による骨形成促進法の開発. 第31回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016年10月13-14日, 福岡国際会議場(福岡)
4. Fujimaki H, Inoue G, Uchida K, Miyagi M, Saito W, Takaso M. Nerve reconstruction with oriented collagen tubes combined with basic fibroblast growth factor. 43rd The International Society for the Study of the Lumbar Spine Annual Meeting, 2016年5月16-20日, Singapore
5. 関口裕之、内田健太郎、井上玄、相川淳、齋藤巨、宮城正行、藤巻寿子、大貫裕子、高相晶土. 人工コラーゲンゲル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30回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015年10月22-23日, 富山国際会議場(富山)
6. 藤巻寿子、井上玄、内田健太郎、宮城正行、相川淳、齋藤巨、関口裕之、高相晶土. コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた人工神経による末梢神経再生. 第30回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015年10月22-23日, 富山国際会議場(富山)
7. 藤巻寿子、井上玄、内田健太郎、宮城正行、高相晶土. 細胞配向性コラーゲン人工神経と塩基性線維芽細胞増殖因子を組み合わせた新規人工神経による末梢神経再生の試み. 第34回日本運動器移植・再生医学研究会, 2015年9月25-26日, ANAクラウンプラザホテル宇部(宇部)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 3件)

名称: Graft material for nerve

regeneration, Method for producing graft material for nerve regeneration, and Kit for producing graft material for nerve regeneration.

発明者: Kentaro Uchida, Reiji Higashiyama, Gen Inoue, Masayuki Miyagi, Masashi Takaso, Rina Sakai, Shunji Hattori, Keisuke Tanaka, Takayuki Ogura.

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許願 PCT/JP2015/079334

出願年月日: 平成 27 年 10 月 16 日

国内外の別: 国外

名称: 軟骨再生用移植材料、軟骨再生用移植材料の製造方法。

発明者: 内田健太郎, 東山礼治, 井上 玄, 宮城正行, 高相晶土, 酒井利奈, 服部俊治, 田中啓友, 小倉 孝之。

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許願 2014-246016

出願年月日: 平成 26 年 12 月 4 日

国内外の別: 国内

名称: 神経再生用移植材料、神経再生用移植材料の製造方法、及び神経再生用移植材料製造用キット。

発明者: 内田健太郎, 井上 玄, 藤巻寿子, 高相晶土, 佐久太郎, 磯部 仁博, 松下 治, 美間健彦, 西 望, 服部俊治, 田中 啓友, 小倉 孝之。

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許願 2014-212085

出願年月日: 平成 26 年 10 月 16 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高相 晶土 (TAKASO, Masashi)

北里大学・医学部・教授

研究者番号: 90439117

(2) 研究分担者

内田 健太郎 (UCHIDA, Kentaro)

北里大学・医学部・講師

研究者番号: 50547578

松下 治 (MATSUSHITA, Osamu)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 00209537

大鳥 精司 (OHTORI, Seiji)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 40361430

井上 玄 (INOUE, Gen)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号: 80594209