

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462277

研究課題名(和文) 成長因子固相化技術を応用した革新的骨軟骨移植法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel osteochondral allografting combined with growth factor-collagen-binding domain fusion technology

研究代表者

小沼 賢治 (Onuma, Kenji)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：80348557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：同種骨軟骨移植の成績向上を目的に、成長因子固相化同種骨軟骨移植を行った。実験1)ラット大腿骨顆部を用いて、成長因子固相化の至適条件(浸漬時間)を検討した。実験2)ウサギ大腿骨顆部から採取した円柱状の骨軟骨組織を、保存液中で1週間保存後、成長因子(bFGF)を固相化し、ウサギ骨軟骨欠損モデルに移植した。移植後4および8週間後の組織を μ CTおよび組織標本にて評価した。成長因子固相化をしなかった標本をコントロールとした。結果：実験1)15分の反応で、軟骨組織表層にbFGF-CBDが結合した。実験2)bFGFを固相化した標本はコントロールと比較して、 μ CTおよび組織学的には明らかな差は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated study for improved osteochondral allografting combined with basic fibroblast growth factor (bFGF)-collagen-binding domain (CBD) fusion protein. In the preliminary study, optimal reaction time for binding bFGF-CBD to rat osteochondral tissue (OCT) samples was 15 minutes. Cylindrical OCTs were harvested from rabbit femoral condyles and then preserved for 1 week in the preservation solutions at 4°C. Then OCTs were reacted to bind bFGF-CBD for 15 minutes in the solution containing bFGF-CBD and then implanted to rabbit osteochondral defect models. While in the control samples, OCTs were not bound with bFGF-CBD. At 4 and 8 weeks after implantation, condyles were harvested and then samples were accessed using micro-CT and histological samples stained with HE and safranin-o. We could not observed significant difference between OCT samples with bFGF-CBD and control samples. These results concluded that bFGF-CBD might not improve osteochondral allografting of rabbit model.

研究分野：同種組織移植

キーワード：同種骨軟骨移植 成長因子固相化技術

1. 研究開始当初の背景

外傷、腫瘍、離断性骨軟骨炎に伴う関節機能の破綻は患者の日常生活動作、生活の質を著しく低下させる。これらに伴う軟骨欠損に対し自家軟骨組織移植や同種軟骨組織移植は有用な方法であるが、成績不良の一因として移植部骨癒合不全が挙げられている。また、同種軟骨組織移植は広範囲軟骨欠損に有用であるが、低温保存中の軟骨細胞活性の低下、基質変性が移植後成績向上の妨げとなっている。

一方、われわれは細菌性コラゲナーゼ由来のコラーゲン結合ドメイン(CBD)の融合タンパク(bFGF-CBD)を用いることで、bFGFを組織内のコラーゲン細線維に固相化し、局所で持続的に細胞増殖を促進させることを報告している。さらにCBDがtypeIコラーゲンに結合することに着目し、CB-bFGFを用いて骨折治癒を促進できることを報告している。

2. 研究の目的

我々が確立した同種軟骨組織の軟骨細胞活性を長期間維持する保存法で保存した移植組織の早期の確実な癒合、生着と軟骨細胞の生存維持する方法を確立することである。

3. 研究の方法

実験1) 至適成長因子アンカーリングのための浸漬時間の条件検討

Sprague Dawley (SD) ラットの大腿骨顆部から軟骨組織サンプルを採取した。Alexa Fluor® 594 標識 basic fibroblast growth factor (bFGF) collagen binding domain (CBD) 溶液 (濃度 0.29 μ M) を作製した。1 容器に対し、軟骨組織サンプル 1 つと bFGF-CBD 溶液 1ml を入れ、0、15 分、30 分、60 分、24 時間浸漬し、組織固定した。フィルム法にて凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡で発光強度を評価した。

実験2) ポジティブコントロールとネガティブコントロールの作製

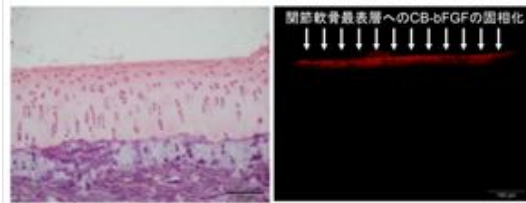
日本白色家兎を使用した。麻酔下に左膝関節大腿骨側より、今回開発した専用採取器で円柱形の軟骨組織を採取した。ポジティブコントロールの新鮮組織移植条件では、軟骨組織を採取した直後に、右膝にドリルで軟骨欠損を作製し軟骨組織を移植した。ネガティブコントロールの凍結組織移植条件では同様に軟骨組織を採取し、液体窒素で 15 分間凍結したものを自然融解し、右膝軟骨欠損部に移植した。移植後 4 週間、8 週間後に、移植部の組織を採取した。移植部肉眼観察および組織評価(HE 染色およびサフラニン O 染色)を行った。

実験3) 10%同種血清添加 UW 液および DMEM 細胞培養液の 2 つの保存液中で採取した軟骨組織を 7 日間及び 14 日間保存した。保存期

間終了後、15 分間 bFGF 結合コラーゲンに浸漬し、軟骨組織に成長因子固相化を行い、別のウサギ軟骨欠損モデルに移植した。コントロールとして bFGF を結合しない軟骨組織を移植したウサギを用いた。移植後 4 週間および 8 週間経過後に安楽死させ大腿骨顆部より組織を採取した。採取した組織を μ CT および組織標本にて検討を行った。組織学的検討では HE 染色およびサフラニン O 染色を行い、骨癒合、軟骨の修復過程、軟骨変性を評価した。

4. 研究成果

実験1) bFGF-CBD に浸漬しなかった 0 分の条件では、関節軟骨は発光しなかったが、15 分から 24 時間の浸漬時間では同等に関節軟骨の表面の発光を確認した。本方法は 15 分間という短時間で成長因子を軟骨組織に結合させることが可能であり、自家軟骨組織移植、同種軟骨組織双方に応用可能であると考えられた。



(a) ラット関節軟骨組織 (HE 染色)
(b) 同組織の蛍光顕微鏡像。最表層に固相化された成長因子が観察される。(白矢印)

実験2) いずれの条件に於いても肉眼的に軟骨表面は修復され、組織形態やサフラニン染色性に明らかな差が認められなかった。凍結により死滅した組織を移植しても 8 週間程度の観察期間では、新鮮組織移植と凍結組織移植では、軟骨修復や変性の程度には差は認められないことが判明した。

実験3) μ CT による評価では、いずれの標本も 4 週より骨癒合が始まり、8 週経過後には完全に骨癒合を認めた。bFGF 結合軟骨組織では骨質の差異が示唆される所見が得られた。組織学的には骨癒合はどの標本も認められたものの保存液の違いや軟骨組織への bFGF 結合の有無では、明らかな差は認めなかった。

まとめ

本方法は 15 分間という短時間で成長因子を軟骨組織に結合させることが可能であり、自家軟骨組織移植、同種軟骨組織双方に応用可能であると考えられた。しかし、bFGF を結合させても軟骨修復は促進されなかったことから結合させる成長因子について再考の余

地があると考えられた。

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 13 件)

- 1) Minatani A, Uchida K, Inoue G, Takano S, Aikawa J, Miyagi M, Fujimaki H, Iwase D, Onuma K, Matsumoto T, Takaso M. Activation of calcitonin gene-related peptide signaling through the prostaglandin E2-EP1/EP2/EP4 receptor pathway in synovium of knee osteoarthritis patients. *J Orthop Surg Res*, 11(1): 117. 2016. DOI: 10.2147/JPR.S135939. (査読有)
- 2) 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. 2016. DOI: 10.1002/jbm.a.35866. (査読有)
- 3) 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: 10.1155/2015/631369 (査読有)
- 4) Yamada T, Uchida K, Onuma K, Inoue G, Aikawa J, Takano S, Sekiguchi H, Fujimaki H, Miyagi M, Takaso M. Hyaluronic Acid (800 kDa) Supplementation of University of Wisconsin Solution Improves Viability of Osteochondral Grafts and Reduces Matrix Metalloproteinase Expression during Cold Preservation. *ScientificWorldJournal*. 2015. DOI: 10.1155/2015/631369. (査読有)
- 5) Onuma K, Shintani R, Fujimaki H, Sukegawa K, Kenmoku T, Uchida K, Takahira N, Takaso M. Total wrist arthrodesis with wrist fusion rod in patients with rheumatoid arthritis. *Eklemler Hastalik Cerrahisi*. 2015; 26(1):41-8. DOI: 10.5606/ehc.2015.10 (査読有)
- 6) Uchida K, Satoh M, Inoue G, Onuma K, Miyagi M, Iwabuchi K, Takaso M. CD11c(+) macrophages and levels of TNF- α and MMP-3 are increased in synovial and adipose tissues of osteoarthritic mice with hyperlipidaemia. *Clin Exp Immunol*. 2015; 180: 551-9. DOI: 10.1111/cei.12607 (査読有)
- 7) Onuma K, Fujimaki H, Kenmoku T, Sukegawa K, Takano S, Uchida K, Takahira N, Takaso M. Bilateral carpal tunnel syndrome due to gouty tophi: conservative and surgical treatment in different hands of the same patient. *Mod Rheumatol*, 25(2): 298-302. 2015. DOI: 10.3109/14397595.2013.874753. (査読有)
- 8) 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*, doi: 10.1002/term.2019. 2015 (査読有)
- 9) 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*, 104(6), 1372-8. 2015. DOI: 10.1016/j.jos.2015.12.011. (査読有)
- 10) Yamada T, Uchida K, Onuma K, Kuzuno J, Ujihira M, Inoue G, Sato B, Kurokawa R, Sakai R, Takaso M. Hydrogen supplementation of preservation solution improves viability of osteochondral grafts. *ScientificWorldJournal*. 2014. DOI: 10.1155/2014/109876. (査読有)
- 11) 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, DOI: 10.1088/1748-6041/9/3/035014. 2014. (査読有)
- 12) 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)

- 13) 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 2 件)

- 1) Onuma K, Yamada T, Uchida K, Inoue G, Aikawa J, Naruse K, Urabe K, Takaso M. Hyaluronic acid supplementation of University of Wisconsin solution improves viability of osteochondral graft and reduces MMP expression during cold preservation. The 16th International conference of Asia Pacific Association of Surgical Tissue Banking, Seoul, June 29th- July 1st, 2016.
- 2) Onuma K, Uchida K, Yamada Y, Inoue G, Naruse K, Urabe K, Itoman M, Takaso M. Hydrogen prolongs cold preservation of osteochondral allografts. The 15th

International conference of Asia Pacific Association of Surgical Tissue Banking, Gifu, Aug. 27- 29th, 2014.

6. 研究組織

(1)研究代表者

小沼 賢治 (ONUMA, Kenji)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：80348557

(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

斎藤 亘 (SAITO, Wataru)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：60439099

井上 玄 (INOUE, Gen)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：80594209

占部 憲 (URABE, Ken)

北里大学・北里大学メディカルセンター・教授

研究者番号：90284489

(3)連携研究者

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