

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591923

研究課題名（和文） 融合タンパク質とナノワイヤー加工を用いた新しい人工股関節再置換術の基礎技術研究

研究課題名（英文） Basic science technology study of new revision total hip arthroplasty using a fusion protein and the nanowire processing

研究代表者

成瀬 康治（NARUSE KOUJI）

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60276087

研究成果の概要（和文）：人工股関節再置換、再々置換術の際に生じる広範囲骨欠損に対する新しい再建術技術の開発を目指し、その基礎研究を実施した。分子生物学的ツールとしてコラーゲン結合型ホルモンや成長因子を、医用工学的ツールとして金属表面ナノワイヤー加工技術を用いて、これまでの保存同種骨／人工関節複合体を用いた関節機能再建術の大幅な改善を試みた。その結果、コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子が有用であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

In this study we aimed to develop a new reconstruction technique for widespread bone defects that occur during revision and second revision total hip arthroplasty. We strived to significantly improve joint function restoration techniques that are currently based on existing bone allograft-prosthesis composite materials by using hormone-collagen binding domain and growth factor-collagen binding domain as molecular biological tools, as well as metal-plated nanowire processing technology as a medical engineering tool. Our study revealed that basic fibroblast growth factors-collagen binding domain were useful in the development of the new reconstruction technique.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：材料工学・処理、組織移植、融合タンパク

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節外科領域における運動器疾患治療に、今や人工関節置換術は欠かせない。近年

はさらに、術後成績の優良な人工関節の普及や高齢化社会を反映して、人工股関節再置換術や再々置換術を受ける症例が増加してい

る。日本整形外科学会による運動器再建のための移植についての全国アンケート調査では、人工骨による補填と同種骨移植数が増加傾向を示している。特に、人工股関節再置換、再々置換術の際に生じる骨欠損に対しては、人工骨による補填や同種骨移植が行われている。しかし、置換術の回数が重なるほど、ボーンストックは激減し巨大骨欠損のため関節機能の再建は困難を極める。巨大骨欠損用の人工関節を用いることもあるが、関節機能の再建は十分ではない。また、近未来にはさらに外科的処置を行わなければならないことが予想されるが、その際の手法が未だ確立されていない。人工股関節再置換、再々置換術に対応した新しい関節機能再建術（リビジョン THR）の考案が急務である。

我々は、日本組織移植学会認定の骨バンクを整備しており、非生体ドナーから骨組織を採取、処理、保存した良質で安全性の高い冷凍保存同種骨組織を移植に用いることができる。人工股関節再置換の際に生じる骨欠損に対して、欧米諸国と同等に冷凍保存同種骨組織移植により関節機能再建術を行ってきた。特に、複数回にわたる再置換術症例や広範囲骨欠損の場合には、分節型保存同種骨組織を用いた再建術を実施している。

(2) 同種骨組織を用いた再建術を行った場合の特徴は、1)解剖学的形状を有しており、母床骨や周囲軟部組織との空間的適合性が良く死腔を残さない、2)移植組織の吸収・置換作用により自家組織へ変換される、3)力学的強度が母床骨と同等であり、接合部での力学的強度差による不都合が生じない、などがあげられる。前述作用により、人工物では再建することができない症例においても関節機能再建が可能であり、これまで優良な成績を報告してきた（J. Ortho. Sci. 8(1):26-31, 2003）。

2. 研究の目的

これまでの臨床結果の解析から①母床骨と移植骨との癒合、自家組織への吸収・置換にかかる期間の短縮と②保存同種骨／人工関節間の接着技術の改善が必要であることが示唆された。これらの問題解決のアプローチとして、①に対しては、コラーゲン結合型副甲状腺ホルモン(PTH-CBD)を用いた骨形成促進、母床骨と同種移植骨との融合促進および

同種移植骨の吸収・置換促進を行う。細菌性コラゲナーゼのC末端にはコラーゲン結合ドメイン(CBD)が存在する。本ドメインは β サンディッチ構造をとり、骨、軟骨組織に豊富に含まれるコラーゲン・フィブリルに結合する。(EMBO J., 22:1743-52, 2003)。CBDのマトリックス結合能を利用して、生理活性物質のひとつである細胞成長因子(bFGF)を細胞外マトリックスにアンカーリングし持続的に細胞増殖を促進することができた(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 95:7018-7023, 1998)。PTH-CBD融合タンパクは、PTH(1-33)をCBDにより骨組織のI型コラーゲンへアンカーリングさせることが可能(U. S. Patent Application, April 2008)である。PTH-CBD搭載移植骨には、移植骨自身に副甲状腺ホルモンの局所因子としての多面的作用を期待できる。また、徐放効果により長期間のPTH作用も期待できる。②に対しては、金属表面ナノ加工技術によりナノワイヤーからなる連通孔型ナノポアを用いる。このナノポアは予備実験から骨組織形成に有効と考えられ(Ann N Y Acad Sci. 1122:197-218, 2007)、同種骨／人工関節間への細胞遊走促進と新生骨形成による固着を惹起させる。この技術はArkansas大学との国際共同研究による実用化を目指した。

新しいリビジョンTHR技術の開発を最終目的とし、今回はその基礎研究を実施する。ラット動物モデルを用いてPTH-CBD融合タンパク搭載移植同種骨の特徴を明らかにした。金属表面ナノ加工技術を用いた同種骨／人工関節間の生物学的活性検討は、 ϕ 1.2mmチタン材を用いて検討した。チタン材表面に種々のナノワイヤー加工を施し、ベストモードを検討した。

3. 研究の方法

Wistar系ラット長管骨から凍結乾燥移植骨を作成する。PTH-CBD溶液へ凍結乾燥移植骨を浸漬し、骨基質中のコラーゲンにPTHをアンカーリングさせた。CBDは種々の型のコラーゲンに結合できるため、軟骨などの多様な細胞外マトリックスに生理活性物質をアンカーリングしうる(Connect. Tissue Res., 42:281-90, 2001)。PTH-CBDを搭載した移植同種骨をSD系ラットへ移植することにより同種骨移植モデルを作成した。皮質骨プレー

ト onlay 移植モデルを用いて骨形成作用、母床骨との癒合、自家組織への吸収・置換などへの影響を検討した。PTH-CBD の全身投与時の骨形成作用についてマイクロ 3DCT を行い解析ソフトによって骨形態計測による解析を行った。PTH 以外の骨形成作用を示す成長因子である塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF) や上皮細胞増殖因子 (EGF) を用いた FGF-CBD、EGF-CBD を作成し、同種骨移植モデルを用いて骨形成作用について組織形態学的、形態計測学的に検討した。金属表面ナノ加工技術を用いた同種骨／人工関節間の生物学的活性検討は、表面走査電子顕微鏡を用いて形態学的検討を行った。

4. 研究成果

平成 21 年度では、PTH-CBD を用いて、全身投与による骨形成作用について骨形態計測学的に検討したが、非融合タンパク質の PTH と比較して統計学的有意な差は認められなかった。そこで平成 22 年度ではラット骨移植モデルを用いて PTH-CBD 非搭載骨移植群、PTH-CBD 搭載骨移植群、非搭載骨移植+PTH 局所投与群による PTH-CBD の局所因子としての骨形成作用について検討したが、明らかな有意差は認められなかった。そこで、PTH-CBD 以外の成長因子を含むコラーゲン結合ドメイン融合タンパク質の有用性について検討した。強い未分化間葉系細胞の増殖作用と骨形成作用を示す塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、および細胞増殖作用を示す (Epidermal Growth Factor; EGF) それぞれにコラーゲン結合ドメインを有する融合タンパク質 (FGF-CBD、EGF-CBD) を用いてラット骨移植モデルにおける FGF-CBD およびの EGF-CBD の骨組織へ効率よく搭載するための前処理として、脱灰処理の有無による作用変化について検討した。また、骨組織と FGF-CBD、EGF-CBD との接触効率を増加させるために、ブロック状、プレート状移植骨をパーティクル状へ加工し、前処理の有効性につき検討した。その結果、Binding assay により脱灰処理は FGF-CBD、EGF-CBD の双方に有効だった。また、形状加工は骨誘導能を期待した場合に比較的有効な手技と考えられた。平成 23 年度では FGF-CBD 搭載骨組織により著しい骨形成作用を示すことが明らかになった。現在、本研究結果に基づき特願申請中

(2011-108650、PCT/JP2012/057829) である。申請研究の一部である金属表面加工については、使用する金属サイズに限界があることが明らかになり、海外研究協力者によって新規技術開発がすすめられている。

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 16 件)

〔学会発表〕 (計 20 件)

〔図書〕 (計 1 件)

(1) 浅野武秀、丸善出版、移植のための臓器 摘出と保存、2011、304

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

1) 名称: 「成長因子アンカーリング型骨移植材料、成長因子アンカーリング型骨移植材料の製造方法、成長因子アンカーリング型骨移植材料製造用キット、および骨形成方法」
発明者: 内田健太郎、成瀬康治、高相晶士、美間健彦、松下 治、原口高志、西 望
権利者: 北里大学、香川大学
種類: 国際特許
番号: PCT/JP2012/057829
出願年月日: 2011 年 5 月 12 日
国内外の別: 国外

2) 名称: 「成長因子アンカーリング型骨移植材料、成長因子アンカーリング型骨移植材料の製造方法、成長因子アンカーリング型骨移植材料製造用キット、および骨形成方法」
発明者: 内田健太郎、成瀬康治、高相晶士、美間健彦、松下 治、原口高志、西 望
権利者: 北里大学、香川大学
種類: 特許
番号: 特願 2011-108650
出願年月日: 2012/3/26
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成瀬 康治 (NARUSE KOUJI)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：60276087

(2) 研究分担者

糸満 盛憲 (ITOMAN MORITOSHI)
北里大学・名誉教授
研究者番号：70104528

占部 憲 (URABE KEN)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号：90284489

松下 治 (MATSUSHITA OSAMU)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：00209537

(3) 連携研究者

なし