

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670659

研究課題名(和文) 機能性人工骨膜組織の創生と難治性骨折治療への応用

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

研究代表者

高相 晶士 (Takaso, Masashi)

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では骨間葉系幹細胞分離技術と成長因子アンカーリング技術を駆使した機能性人工骨膜組織の創生と難治性骨折治療法の確立を目指し検討を行った。コラーゲン膜状に間葉系幹細胞を積層し、人工骨膜組織を作製した。その結果、2日間で高い栄養因子産生を有する人工骨膜組織を作製することが可能であった。さらに、CB-bFGFと人工骨膜組織を反応させることで機能性人工骨膜組織の作製が可能であった。ラット大腿骨膜上に移植した所、機能性人工骨膜組織偽手術群、間葉系幹細胞積層シートのみ移植した群に比して比べ高い骨形成促進作用を有していた。機能性人工骨膜組織は難治性骨折治療法として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We attempted to develop a functional artificial periosteum using mesenchymal stem cells (MSCs) and a fusion protein (collagen binding-bFGF, CB-bFGF) consisting of bFGF and the collagen-binding domain (CBD) of *Clostridium histolyticum* collagenase for bone repair. Artificial periosteum had higher expression of trophic factors than monolayer cultured MSCs. Moreover, the combination of the collagen CB-bFGF with artificial periosteum induced bone formation compared to artificial periosteum alone in rat models. Taken together, these properties suggest that the CB-bFGF/artificial periosteum composite is a promising material for bone repair in the clinical setting.

研究分野：運動器再生医療

キーワード：人工骨膜 コラーゲン結合型成長因子 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

交通外傷による骨・軟部損傷は血流障害や骨欠損や骨折の修復に重要な骨膜組織の著しい損傷を伴うため、治療に難渋する。我々は、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、血管内皮成長因子をコラーゲン材料にアンカーリングすることで、骨形成、血管新生を促進できることを示した。また、生体組織の高コラーゲン密度を再現したコラーゲン材料に細胞を埋入することで人工組織を作製できることを示した。さらに、セルソーターを用いて培養を経ずに間葉系幹細胞を分離することに成功した。

2. 研究の目的

本申請研究では骨形成、血管新生促進技術、細胞積層技術、間葉系幹細胞分離技術を駆使することによって、機能性人工骨膜組織の創生と難治性骨折治療への応用を目指した。

3. 研究の方法

人工骨膜組織の作製と特製評価

10週齢雄SDラットから大腿骨から骨膜組織を採取した。コラゲナーゼ溶液中で酵素処理後、有核細胞を採取した。37℃、5% CO₂ で1週間培養後、フローサイトメトリーを用いて採取した細胞の間葉系幹細胞 (CD45-CD29+CD54+CD90+) の割合を検討した。骨膜間葉系幹細胞を剥離後、2.2×10⁶個の細胞を24穴のカルチャーインサート上に播種した。培養2,7日後、4%パラホルムルデヒドで24時間固定後、カルボキシメチルセルロースに包埋した。フィルム法を用いて凍結切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン (H.E) 染色を行った。カルチャーインサートに1×10⁴個の細胞を播種し、単層培養を行ったものをコントロールとして用いた。また、積層による成長因子発現、骨芽細胞マーカーへの影響を検討するために、リアルタイムPCRを行った。積層2,7日後、骨形成タンパク (Bone morphogenetic protein-2, BMP-2), 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF), トランスフォーミング増殖因子 (Transforming growth factor-beta, TGF-β), 血管内皮成長因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF), Ⅰ型コラーゲン (collagen type 1 alpha 1, COL1A1), アルカリフォスファターゼ (Alkaline phosphatase, ALP), オステオカルシン (osteocalcin) mRNA 発現をリアルタイムPCRにより定量し、単層培養細胞との比較を行った。

機能性人工骨膜組織作製と骨形成能の検討

4.4×10⁶個の骨膜間葉系幹細胞をコラーゲン膜上に播種した。7日間培養後、企業と共同開発した専用細胞パンチを用いて直径5mmの人工骨膜組織を作製した。細菌コラゲナーゼ由来のPKDドメインとコラーゲン結合ドメイン (CBD) を有するコラーゲン結合型 bFGF

(bFGF-PKD-CBD)と人工骨膜組織を4週で30日間反応し、bFGFを搭載した機能性人工骨膜組織を作製した。人工骨膜組織、機能性人工骨膜組織をWistarラット大腿骨膜上に移植し、骨形成能を検討した。骨膜を露出後、移植を行わなかった個体をコントロールとして用いた。移植2週間後、管電圧90kV、電流108μA、ボクセルサイズ20μmの条件下にmicro-CTを撮影した。骨塩定量ファントムを同条件で撮影し、骨密度300mg/cm³以上を新生骨として定義し、画像解析ソフトTriScanを用いて新生骨量、骨塩量を測定した。

4. 研究成果

人工骨膜組織の作製と特製評価

採取した細胞の95%以上はCD45-CD29+CD54+CD90+陽性であった (図1)。

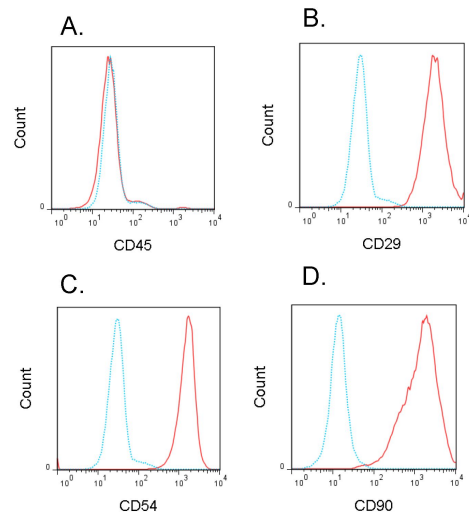


図1. 採取した骨膜細胞における間葉系幹細胞マーカーの発現

カルチャーインサートに播種後2日間で間葉系幹細胞の積層が認められた。播種後2日では球形の細胞が残存していたが、7日後では、すべての細胞が線維芽細胞用の形態を有していた (図2)。このことから、高密度に間葉系幹細胞を播種することにより、人工骨膜組織が作製できるものと考えられた。

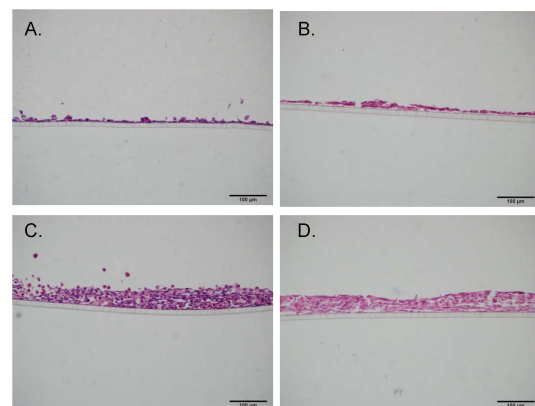


図2. 人工骨膜組織のHE染色像

A. 単層培養2日 B. 単層培養7日 C. 積層培養2日 D. 積層培養7日 Scale Bar = 100μm

また、人工骨膜組織では単層培養群に比べ BMP-2, VEGF の発現が有意に高かった (図 3)。近年、移植細胞の産生する栄養因子が組織修復に重要であることが示されている。人工骨膜組織の作製により、骨形成を促進する BMP-2 と血管新生を促進する VEGF の発現が上昇したことから、人工骨膜組織は骨組織の修復に有用である可能性が示唆された。

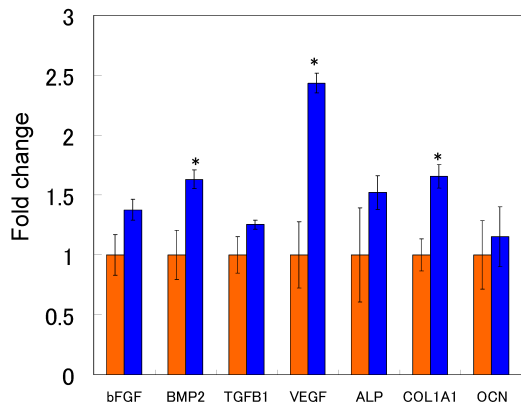


図 3. 栄養因子、骨芽細胞マーカーの発現

機能性人工骨膜組織の骨形成能

機能性人工骨膜移植群で旺盛な新生骨形成が認められた (図 4A-C)。人工骨膜組織、機能性人工骨膜組織移植群では、偽手術群に比べ有意に新生骨量と骨塩量が多かった。また、機能性人工骨膜組織移植は、人工骨膜組織に比べ有意に新生骨量、骨塩量が多かった (図 4D, E)。

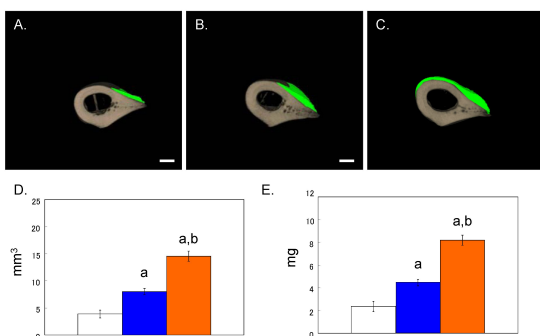


図 4. 移植 2 週後の micor-CT 像

A-C. 移植後 2 週の micro-CT 像. A. 偽手術群 B. 人工骨膜組織群 C. 機能性人工骨膜組織. D. 新生骨量, E. 骨塩量
白: 偽手術群、青: 人工骨膜単、オレンジ: 機能性人工骨膜群. a は偽手術群に対する有意差、b は人工骨膜群に対する有意差を示す ($P < 0.05$, Tukey Multiple Comparison Test)

本研究成果から間葉系幹細胞と成長因子アンカージ技術を駆使して作製した機能性人工骨膜組織は、新規骨形成促進法として有用である可能性が示唆された。

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 10 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, 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 hyperlipidemia. Exp Clin Immunol, 180:551-559, 2015. doi: 10.1111/cei.12607 (査読有)

Imura T, Inoue G, Nakazawa T, Ueno M, Saito W, Adachi K, Uchida K, Takahira N, Takaso M: Effectiveness of deep peroneal nerve block for the management of lumbar disease with leg cramps. J Spine Res, 6(2):119-124, 2015 (査読有)

Saito W, Inoue G, Imura T, Takenami T, Ueno M, Nakazawa T, Uchida K, Takahira N, Takaso M. Safety and efficacy of continuous epidural anesthesia following scoliosis surgery in respiratory-impaired neuromuscular children: A pilot study. Spine Deformity, 3:272-276, 2015. (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)

Matsuzaki Y, Mabuchi Y, Okano H. Leptin receptor makes its mark on MSCs. Cell Stem Cell, 15(2):112-4, 2014. doi: 10.1016/j.stem.2014.07.001. (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)

Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S, Niibe K, Suzuki S, Renault-Mihara F, Houlihan DD, Akazawa C, Okano H, Matsuzaki Y. LNGFR(+)/THY-1(+)/VCAM-1(hi+) cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells, Stem Cell Reports, 1(2):152-65, 2013. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.06.001. (査読有)

[学会発表](計 9件)

内田健太郎, 堀川恭佑, 井上玄, 松下 治, 斎藤 亘, 成瀬康治, 藤巻寿子, 占部 憲, 高相 晶士. 線維芽細胞増殖因子アンカーリング間葉系細胞積層シートの骨形成能の検討. 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)

斎藤 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 晶士. 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)

斎藤 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 晶士. 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).

Inoue G, Uchida K, Saito W, Fujimaki H, Sekiguchi H, Takahira N, Takaso M. Effectiveness of bFGF-fusion protein encoding the Clostridium collagen binding domain for lumbar spinal fusion

surgery using allograft bone. 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)

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)

斉藤 亘, 内田健太郎, 上野正喜, 井上玄, 大貫裕子, 松下 治, 高相 晶士. 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, 斉藤 亘, 余頃瑞希, 井上玄, 松下 治, 高平尚伸, 高相 晶士. 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, 斎藤 亘, 余頃瑞希, 美間健彦, 占部 憲, 高相 晶士. 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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高相 晶士(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・助教
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

馬淵 洋 (MABUCHI, Yo)
東京医科歯科大学・その他の研究科・助教
研究者番号：50424172

井上 玄 (INOUE, Gen)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号：80594209