

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16701

研究課題名(和文) 経皮的脊椎圧迫骨折治癒促進シーズの実用化研究

研究課題名(英文) Development of the injectable biomaterials for vertebral fracture healing

研究代表者

齋藤 亘 (Saito, Wataru)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60439099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：人工コラーゲン(ACG)とコラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の併用による骨形成促進法の開発を行った。種々のコラーゲン結合ドメインからなる4種のコラーゲン結合型bFGF(CB-bFGF;bFGFs3, bFGFs2bs3, bFGFs3b, bFGFs3as3b)を作製後、大腿骨骨折モデルを用いて最も高い骨形成作用を持つCBbFGFを選出した。最も高い骨形成能を示したbFGF-s3a-s3bを椎体骨折モデルに投与し結果、bFGFに比して高い骨形成能を示した。さらに、BMP-2との併用によりさらに高い骨形成作用が得られた。本シーズは椎体骨折における骨形成促進に有用かもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国においても高齢者における骨折は脳血管疾患、高齢による衰弱に次ぐ寝たきり原因の3位であり、椎体骨折後の死亡率は骨折を有しない場合の約4倍の死亡率になるとの報告もある。高齢化が進む我が国の65歳以上における骨折治療に要する年間医療費の総額は約6000億円と推測されており、この額は65歳以上の年間医療費の約4%を占めている。従って高齢者の骨折治癒法の確立は医学的、医療経済的、社会的に重要な意味を持つ。本シーズは、椎体骨折に伴う患者、家族の身体的・精神的苦痛の軽減に加え、経済的な負担軽減、そして医療費の軽減に重要な意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：The prevalence of patients with vertebral fracture continues to increase in aging societies, including Japan. Here, we developed an artificial collagen-based bone formation system consisting of poly(Pro-Hyp-Gly)_n, which mimics the triple helical conformation of collagen, and basic fibroblast growth factor (bFGF) fused to collagen-binding domain (CBD) of *Clostridium histolyticum* collagenase. We examined the formation ability of four collagen-binding bFGF consisting of bFGF-s3, bFGF-s2b-s3, bFGF-s3b, and bFGF-s3a-s3b in a mice femoral fracture model. As bFGF-s3a-s3b showed the highest capacity to induce callus formation in the mice fracture model, bFGF-s3a-s3b-loaded artificial collagen gel (ACG) applied the in rat vertebral fracture model and induced bone formation. In addition, combination of bFGF-s3a-s3b and BMP2 promote bone formation. The poly(Pro-Hyp-Gly)_n/bFGF-s3a-s3b/BMP-2 construct may therefore have the potential to promote bone formation in clinical settings.

研究分野：整形外科学

キーワード：人工コラーゲン コラーゲン結合型成長因子 椎体骨折

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会に伴い骨粗鬆症に伴う脊椎圧迫骨折患者数は年々増加している。脊椎圧迫骨折は骨粗鬆症性骨折の中で最も発生率が高く米国では、年間 700,000 件発生(45 秒に 1 件発生)し、年間 260,000 人が最初の有痛性脊椎圧迫骨折の診断を受けると言われている。高齢者における骨折は脳血管疾患、高齢による衰弱に次ぐ寝たきり原因の 3 位であり、骨折後の死亡率は同年代の平均死亡率の約 2 倍になるとの報告もある。高齢化の進むわが国の 65 歳以上における骨折治療に要する年間医療費の総額は約 6000 億円と推測されており、この額は 65 歳以上の年間医療費の約 4%を占めている。従って高齢者の骨折治療法の確立は医学的、医療経済的、社会的に重要な意味を持つ。

これまでの基礎研究により、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を骨組織に結合することで、骨移植後の骨形成を促進できることを示した。さらに、局所注入可能なコラーゲンパウダーにコラーゲン結合型線維芽細胞増殖因子を結合後、投与することでマウス大腿骨骨折後の仮骨形成を促進できることを示した。一方、1990 年代に蔓延した牛海綿状脳症をきっかけに、動物組織から抽出したコラーゲンの安全性が疑問視されはじめ、Food and Drug Administration も動物由来タンパクの安全性について懸念を抱いている。従って、臨床応用に向けては動物由来担体を用いずに骨折治療促進を実現する必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は人工コラーゲンとコラーゲン結合型成長因子を用いた経皮的椎体骨折治療促進剤を開発し、その有用性を動物モデルを用いて検討する。

3. 研究の方法

3-1. コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子の作製と最適化

コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子 (CB-bFGF) の最適化を行うために細菌コラゲナーゼ ColG, ColH 由来のコラーゲン結合ドメイン (CBD) を有する 4 種の CB-bFGF (bFGF-s3, bFGF-s2b-s3, bFGF-s3b, bFGF-s3a-s3b) を作製した (図 1)。骨形成促進能を検討するために評価が容易なマウス大腿骨骨折モデルを用いて検討を行った。9 週齢雄性 C57BL/6J マウスの大腿骨を骨幹部で骨切りし、骨折部周囲の骨膜を電気メスで焼灼させることで難治性骨折モデルを作製した。骨折のみさせた群 (control 群)、人工コラーゲンのみを投与した群 (ACG 群)、bFGF、bFGF-CBD-CBD をそれぞれ ACG と混合し、注射針を用いて骨折部に投与した。(各群 n=10) 骨折後 2, 4, 6 週で micro-CT を撮影し、新生骨量 (BV)、骨塩量 (BMC) を測定した。

3-2 ラット椎体骨折モデルに対する CB-bFGF と人工コラーゲンの併用効果の検討

Wistar ラットの尾椎に 16G 針を用いて直径 1.7mm の骨欠損を作製した。1% ACG と CB-bFGF (bFGF-s3a-s3b) を 4 で 60 分間反応させ、ACG/CB-bFGF 複合体を作製後、欠損部に投与した (ACG/CB-bFGF 群)。また、比較対象として bFGF と ACG を混合後、投与した群 (bFGF 群)、リン酸緩衝液 (PBS) と ACG を混合後、投与した群 (ACG/PBS 群) を作製した。欠損のみを作製した群をコントロールとして用いた (control 群) (n=10)。術後 14 日に検体を採取し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で 48 時間固定を行った。管電圧 90 kV、電流 108 μ A、ボクセルサイズ 25 μ m の条件でマイクロ CT 用を撮影後、画像解析ソフトを用いて新生骨体積 (mm³)、骨塩量 (mg) を計測した。

3-3 コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子 CB-bFGF (bFGF-3a-3b) と Bone morphogenetic protein-2 (BMP2) の併用による骨形成促進能

bFGF と BMP-2 により相加効果が得られることが報告されている。BMP-2 と bFGF-3a-3b の併用効果を検討した。0.058 pmole bFGF-3a-3b (bFGF 1ug 相当)、1ug BMP2、10ug BMP2、1ug BMP2+ 0.058 pmole bFGF-3a-3b、10 ug BMP2+ 0.058 pmole bFGF-3a-3b をそれぞれ 1% 人工コラーゲンゲル (ACG) と混合し、ラット椎体骨折モデルに投与した。骨折のみの群をコントロールとした。投与後、2, 4 週に micro CT を用いた新生骨量、骨塩量計測を行った。

3-4 新規ゲル剤を用いた骨癒合促進法の開発

投与ゲル剤が周囲に拡散しないようにするために、局所投与後に局所で硬化する新規ゲル剤を用いてシーズの最適化を行った。0.058 pmole bFGF-3a-3b (bFGF 1ug 相当)、1ug BMP2+ 0.058 pmole bFGF-3a-3b、10 ug BMP2+ 0.058 pmole bFGF-3a-3b をそれぞれ局所硬化ゲル (HG) と混合し、ラット椎体骨折モデルに投与した。骨折のみの群をコントロールとした。投与後、2, 4 週に micro CT を用いた新生骨量、骨塩量計測を行った。

4. 研究成果

4 - 1 コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子の作製と最適化

bFGF, 4 種の CB-bFGF 群における BV, BMC は PBS 群に比して有意に高かった骨形成を促進した (P<0.05)。一方、bFGF-s3a-s3b 群における多群に比べ有意に骨形成を促進した (P<0.05)。

4-2 ラット椎対骨折モデルに対する CB-bFGF と人工コラーゲンの併用効果

ACG/bFGF-3a-3b 複合体を投与した群では旺盛な仮骨形成が認められた。組織学的検討から ACG/bFGF-3a-3b は軟骨形成促進を介して仮骨形成を促進しているものと考えられた。ACG/bFGF-3a-3b による骨形成促進に成功したが骨癒合促進効果は認められなかった。

4-3 ラット椎対骨折モデルに対する CB-bFGF と BMP-2 の併用効果

ACG/10 ug BMP2, ACG/10 ug BMP2+ 0.058 pmole bFGF-3a-3b 群、ACG/bFGF-3a-3b+1ug BMP-2 群では骨癒合が認められた。一方、ACG/1ug BMP2, ACG/0.058 pmole bFGF-3a-3b, コントロール群では骨形成促進は認められるものの骨癒合は促進されなかった。本研究結果から bFGF-3a-3b を用いることで使用する BMP2 の低用量化が実現できる可能性が示唆された。

4-4 新規ゲル剤を用いた骨癒合促進法の効果

HG/10 ug BMP2, HG/10 ug BMP2+ 0.058 pmole bFGF-3a-3b 群、HG/bFGF-3a-3b+1ug BMP-2 群では骨癒合が認められた。従来法と骨形成量は同等であったが、異所性骨化は少なかった。本研究結果から局所硬化ゲルを用いることで局かつ効果的に骨癒合を促進できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Miyagi M, Fujimaki H, Naruse K, Suto K, Inoue G, Nakazawa T, Imura T, Saito W, Uchida K, Shirasawa E, Takahira N, Takaso M.	4. 巻 24
2. 論文標題 The impact of switching once-weekly teriparatide to denosumab in osteoporosis patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Orthop Sci	6. 最初と最後の頁 153-158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2018.08.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakazawa T, Inoue G, Imura T, Miyagi M, Saito W, Shirasawa E, Uchida K, Takahira N, Takaso M	4. 巻 8
2. 論文標題 adiographic and Clinical Outcomes From the Use of S2 Alar Screws in Surgery for Adult Spinal Deformity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Global Spine J	6. 最初と最後の頁 668-675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2192568218762378	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takei S, Miyagi M, Saito W, Imura T, Inoue G, Nakazawa T, Shirasawa E, Uchida K, Akazawa T, Takahira N, Takaso M	4. 巻 2
2. 論文標題 Treatment for Scoliosis secondary to Spinal Muscular Atrophy using Fusion Instrumentation only at L5 lumbar level	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Spine Surg Relat Res	6. 最初と最後の頁 294-298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.22603/ssrr.2017-0093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Saito W, Inoue G, Imura T, Nakazawa T, Miyagi M, Shirasawa E, Uchida K, Takaso M	4. 巻 2
2. 論文標題 The relationship between Preoperative Echocardiographic Evaluation and Spinal Deformity in Patients with Neuromuscular Scoliosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Spine Surg Relat Res	6. 最初と最後の頁 48-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.22603/ssrr.2017-0018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito W, Mizuno K, Inoue G, Imura T, Nakazawa T, Miyagi M, Shirasawa E, Uchida K, Takaso M	4. 巻 11
2. 論文標題 Perioperative Evaluation of Respiratory Muscle Strength after Scoliosis Correction in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Asian Spine J	6. 最初と最後の頁 787-792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4184/asj.2017.11.5.787.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchida K, Inoue G, Matsushita O, Horikawa K, Sekiguchi H, Saito W, Takano S, Fujimaki H, Miyagi M, Takaso M.	4. 巻 4371460
2. 論文標題 Basic Fibroblast Growth Factor-Anchored Multilayered Mesenchymal Cell Sheets Accelerate Periosteal Bone Formation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomed Res Int	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2017/4371460.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito W, Namba T, Inoue G, Imura T, Miyagi M, Nakazawa T, Shirasawa E, Uchida K, Takaso M.	4. 巻 22
2. 論文標題 Similar articles Select item 28325699 4. Spinal correction in patients with Fukuyama congenital muscular dystrophy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Orthop Sci	6. 最初と最後の頁 658-664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2017.02.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue G, Uchida K, Matsushita O, Fujimaki H, Saito W, Miyagi M, Sekiguchi H, Nishi N, Ohtori S, Yogoro M, Takaso M.	4. 巻 42
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Spine (Phila Pa 1976)	6. 最初と最後の頁 995-1011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BRS.0000000000002074.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 庄司真太郎、内田健太郎、関口裕之、井上 玄、齋藤 亘、宮城正行、村田幸佑、川久保 歩、高相晶士
2. 発表標題 塩基性線維芽細胞増殖因子と局所硬化デキストランゲルを用いた新規骨形成促進法の有用性
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白澤栄樹、齋藤 亘、宮城正行、井上 玄、井村貴之、中澤俊之、高相晶士
2. 発表標題 小児期側彎症手術における各手術手技段階での血液損失の検討 術中出血低減の試み
3. 学会等名 第66回日本整形災害外科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 米田昌広、白澤栄樹、井上 玄、齋藤 亘、中澤俊之、井村貴之、宮城正行、高相晶士
2. 発表標題 胸椎に直接浸潤した非小細胞肺癌に対し部分椎体切除を併用し腫瘍を一塊に摘出しえた1例
3. 学会等名 第66回日本整形災害外科学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 骨再生用組成物、骨再生用組成物キット、骨再生用部材および骨再生方法	発明者 内田健太郎、齋藤 亘、庄司真太郎、高相晶士 等	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-184885	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----