

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：32728

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18546

研究課題名(和文) 局所投与かつ局所保持可能な理想的な細胞・成長因子送達法による骨欠損治療法の確立

研究課題名(英文) Cell and Growth factor delivery using in situ formed hydrogel for treatment of bone defect

研究代表者

関口 裕之 (Sekiguchi, Hiroyuki)

湘南医療大学・臨床医学研究所・研究員

研究者番号：90547233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：外傷や腫瘍掻爬後の広範囲骨欠損は治療に難渋する。BMP-2を局所に保持し得る新規材料として、ヒアルロン酸を基材とし局所投与部で硬化する新規ゲル剤を開発し、マウス広範囲骨欠損モデルを用いて有用性を検討した。骨欠損のみの群(defect群)、骨欠損部に局所硬化ヒアルロン酸ゲルのみを投与した群(HA群)、骨欠損部にBMP-2含有PBSを投与した群(PBS/BMP群)、骨欠損部にBMP-2含有局所硬化ヒアルロン酸ゲルを投与した群(HA/BMP群)の4群を作製した。HA/BMP群は他の3群と比較して骨量、骨塩量とも有意に高値だった。本方法はBMP-2の局所送達による骨欠損治療法として有用かもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷や腫瘍掻爬後の広範囲骨欠損は治療に難渋する。治療の長期化に伴う患者の社会復帰の遅延は、患者に肉体的・精神的苦痛を与えるとともに医療費の増加と社会経済的損失に直結する。本研究で開発したゲル剤は広範囲骨欠損治療に重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined the effectiveness of an in situ-formed hydrogels (IFHGs) made of hyaluronan (IFHG-HA) containing BMP2 for promoting bone formation in a mouse critical size bone defect model. C57/BL6J mice received a 2-mm femoral critical-sized bone defect before being randomly assigned to one of the following treatment groups (n=6): control (no treatment), IFHG-HA only, PBS with BMP2, and IFHG-HA with BMP2. X-ray radiographs were utilized to track new bone formation, and micro-computed tomography and histological examination were performed on new bone formed at the bone defect site two weeks after surgery. Mice treated with PBS with BMP2 and IFHG-HA with BMP2 had greater bone volume (BV) and bone mineral content (BMC) than those receiving control, and successfully achieved consolidation. Mice treated with IFHG-HA with BMP2 had significantly higher BV and BMC than those treated with PBS with BMP2. IFHG-HA may be an effective carrier for BMP2 to enable delivery for bone defect repair.

研究分野：整形外科

キーワード：骨形成蛋白 徐放 ゲル剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外傷や腫瘍搔爬後の広範囲骨欠損は治療に難渋する。治療の長期化に伴う患者の社会復帰の遅延は、患者に肉体的・精神的苦痛を与えるとともに医療費の増加と社会経済的損失に直結する。間葉系幹細胞 (MSC)・成長因子 (GF) の局所送達による広範囲骨欠損治療法の開発を目指す。申請者は、コラーゲン結合型成長因子 CB-GF を人工コラーゲンゲルに結合させ骨折部に投与することで骨形成を促進できることを示した。 (他方、生体材料に架橋基を導入後、酵素試薬と混合することで投与後に硬化する「注入型局所硬化ゲル」の開発に成功した。

2. 研究の目的

本研究では MSC、GF 搭載注入型局所硬化ゲルを用いた広範囲骨欠損治療法の開発を行った。

3. 研究の方法

3-1. 局所硬化ヒアルロン酸ゲル (IFHG-HA) の作製

ヒアルロン酸 (HA) -チラミン (TA) 共役体を合成した。TA を 50 kDa の HA 溶液に溶解し、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドと 2.5mM N-ヒドロキシスクシンイミドを加え、共役反応を開始した。0.1 M NaOH を添加した。室温で一晩攪拌した後、分画分子量 1 kDa のチューブを用いて透析を行った。透析は、チューブ内で塩化ナトリウム溶液に対して 2 日間、蒸留水とエタノールの混合物 (混合比 3:1) に対して 1 日間、蒸留水に対して 1 日間行った。最終的に精製液を凍結乾燥して HA-TA を得た。IFHG-HA は、触媒酵素としての HRP、および PBS 中の過酸化水素水の存在下で HA-TA ポリマーを架橋することによって調製した。HA-TA ポリマー溶液を、2 μ g の BMP-2 あるいは PBS (IFH-HA/PBS) と、過酸化水素水溶液を含む HRP 溶液を混和することで、IFHG-HA を作製した。

3-2. in vitro での BMP-2 含有局所硬化ヒアルロン酸ゲルにおける BMP-2 徐放試験

IFHG-HA からの BMP-2 の徐放性を評価するために、0.5 mL のプラスチック製マイクロチューブに 2 μ g の BMP-2 を含有させた IFHG-HA 25 μ L を注入し、次いで 200 μ L の PBS をチューブに追加した。マイクロチューブを 37 $^{\circ}$ C の恒温槽に留置し、1、4、8、24、48、96 時間、1、2、3 週間の時点で、PBS を採取して新しい PBS に交換し、開始後 3 週間の時点まで PBS を採取した。採取した各時間帯の PBS は -30 $^{\circ}$ C で保存し、BMP-2 ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いて PBS 中の BMP-2 濃度を推定した (n = 5)。

3-2 広範囲骨欠損モデルの作製

24 匹の 9 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用いた。マウスの右大腿骨の中央に自然治癒不可能な 2 mm の骨欠損部を作製し、MouseExFix Simple L[®] (Research Implant System, RIS, Davos, Switzerland) で固定したものを巨大骨欠損モデルとした。骨欠損のみ群 (control 群)、骨欠損部に IFHG-HA 25 mL のみを投与した群 (IFHG-HA 群)、骨欠損部に 2 μ g の BMP-2 含有 PBS 25 mL を投与した群 (PBS/BMP 群)、骨欠損部に 2 μ g の BMP-2 含有 IFHG-HA 25 mL を投与した群 (IFHG-HA/BMP 群) を作製した (各群 n = 6)。本モデルでは、BMP-2 のみの場合の骨形成促進効果も検討するため、ゲルを PBS に置き換えた PBS/BMP-2 群での検討も行った。処置直後および 14 日後に軟 X 線撮影を行い、骨形成を評価した。術後 14 日で屠殺して大腿骨を採取後に μ CT を撮影し、骨欠損部における骨量 (Bone volume, BV)、骨塩量 (Bone mineral content, BMC) を測定した。

3-3 組織学的検討

大腿骨を 20 %エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) 溶液中で 4 週間脱灰した。その後、組織をパラフィンに包埋し、大腿骨の長軸に沿って矢状面で 3 μ m の切片とした。各大腿骨の切片は、ヘマトキシリンおよびエオジン (HE) 染色を行い組織学的に評価した。

4. 研究成果

IFHG-HA からの BMP-2 徐放量は、最初の 4 時間で多く徐放された (図 1)。その後の徐放量は低下するが、開始後 3 週間後も徐放は続いていた。軟 X 線撮影、および、 μ CT 像では、IFHG-HA/BMP 群と PBS/BMP 群で骨欠損部に新生骨を認めた (図 2、3)。対照的に、IFHG-HA 群と control 群のマウスでは、新生骨形成はほとんど認めなかった。また、IFHG-HA/BMP 群と PBS/BMP 群では、

IFHG-HA 群や control 群と比較して、BV、BMC が有意に増加していた ($p < 0.001$ 、図 4)。さらに、IFHG-HA/BMP 群は、PBS/BMP 群と比較して、BV、BMC が有意に高値であった ($p < 0.001$ 、図 4)。組織学的評価では、IFHG-HA/BMP 群と PBS/BMP 群で、骨欠損部に多量の海綿骨を認めたが、defect 群、IFHG-HA 群の骨欠損部では線維性組織が存在し、海綿骨は認められなかった (図 5)。

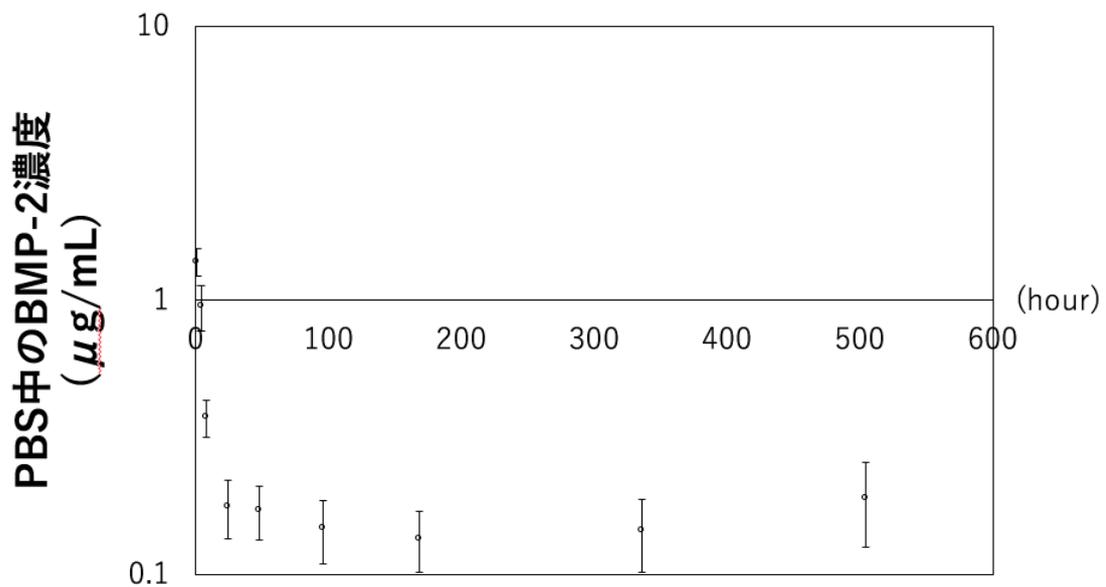


図 1 in vitro における BMP-2 含有局所硬化ヒアルロン酸ゲルにおける BMP-2 徐放各時点における BMP-2 の累積徐放量。すべてのデータは平均値±標準誤差で示した (n = 5)。

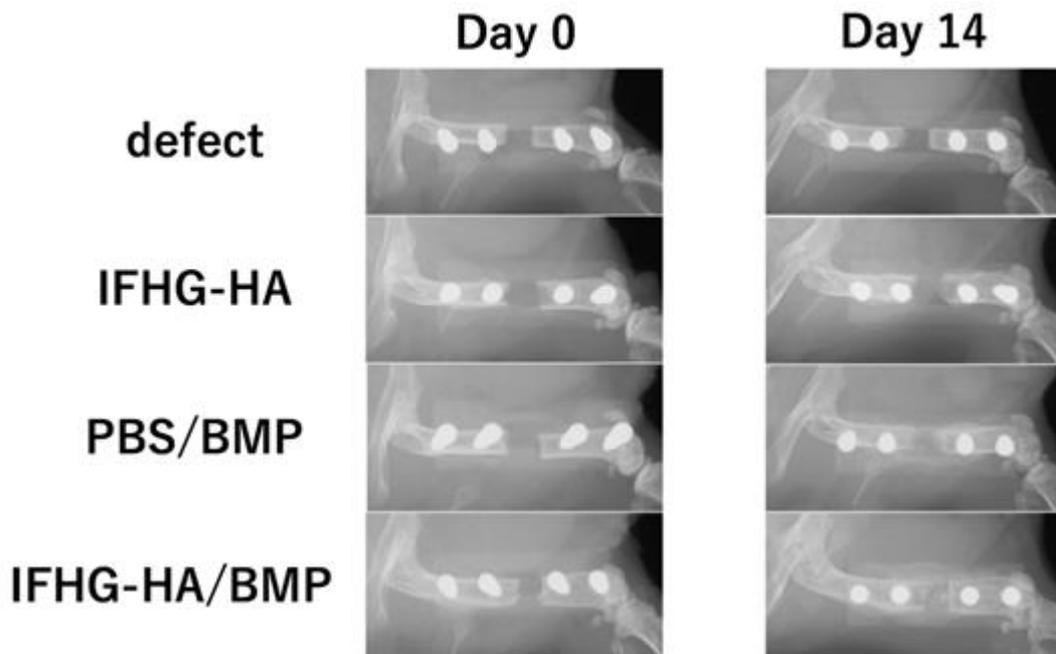


図 2 マウス骨欠損モデルにおける軟 X 線像
各群における、処置直後と処置後 14 日の大腿骨の軟 X 線像

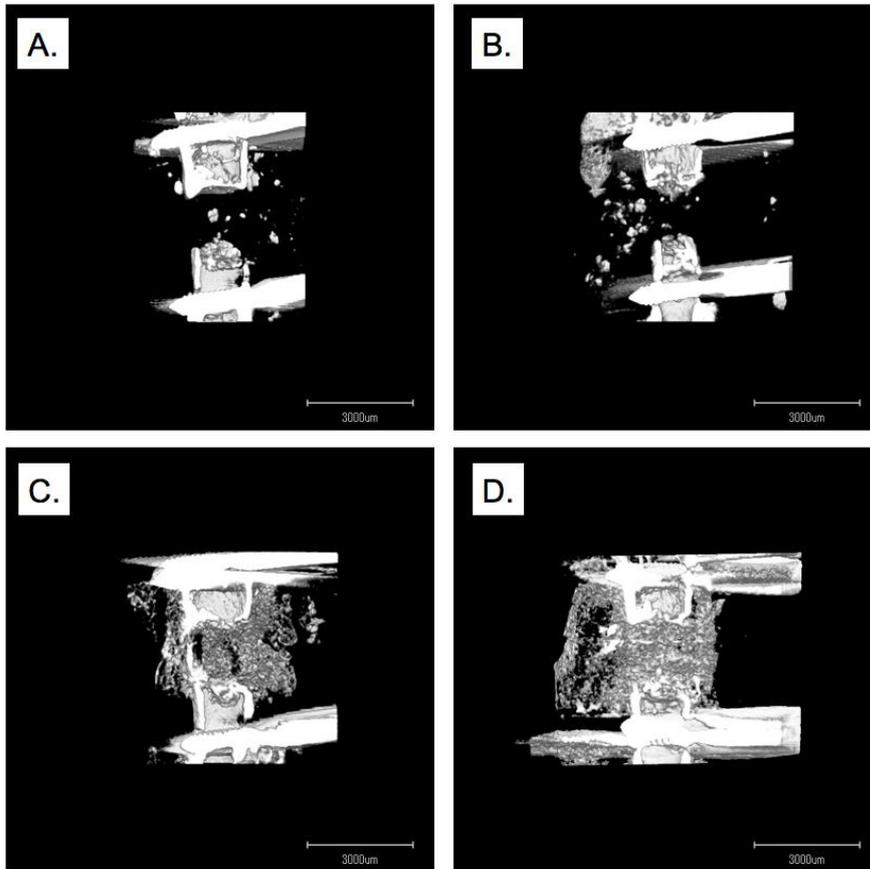


図3. マウス骨欠損モデルにおける骨欠損部の μ CT 像

A : defect 群、B : IFHG-HA 群、C : PBS/BMP 群、D : IFHG-HA/BMP 群。閾値 100 mg/cm^3 以上の領域を骨と定義した。scale bar = $3000 \mu\text{m}$ 。

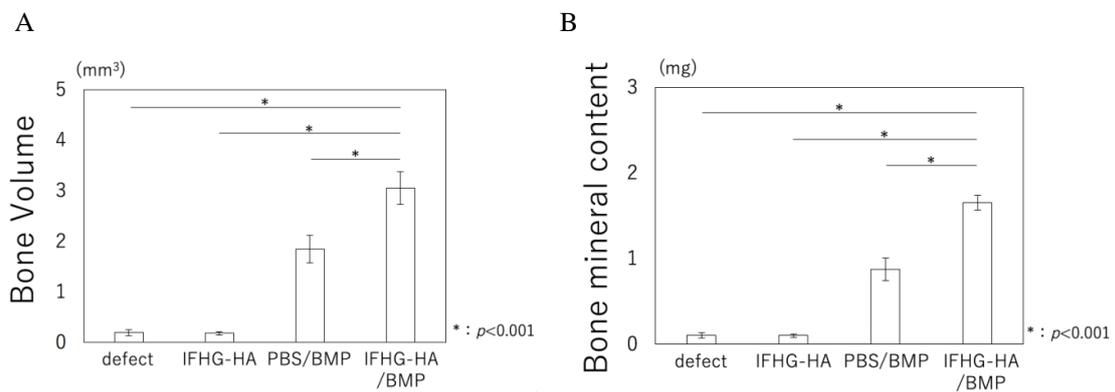


図4. マウス骨欠損モデルにおける骨欠損部の BV および BMC

A : 骨量 (Bone volume : BV) B : 骨塩量 (Bone mineral content : BMC)

すべてのデータは平均値 \pm 標準誤差で示した ($n = 6$)。*は有意差を示す ($p < 0.001$)

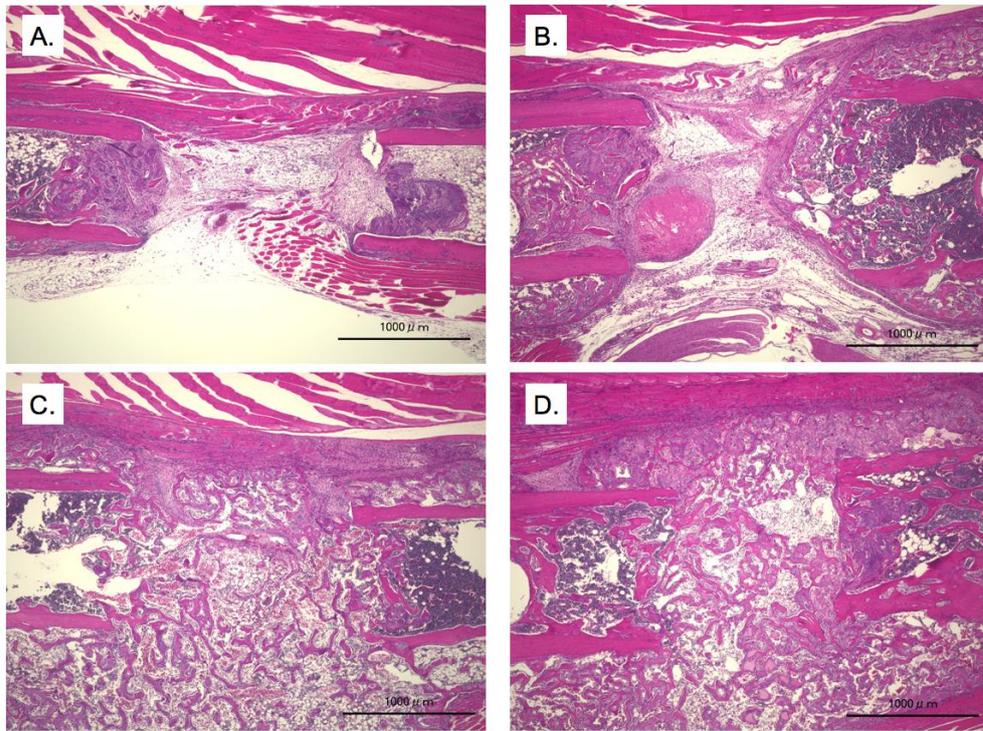


図 5. マウス骨欠損モデルにおける HE 染色像

A : defect 群、B : IFHG-HA 群、C : PBS/BMP 群、D : IFHG-HA/BMP 群。scale bar = 1000 μ m。

近年、BMP-2 の送達担体として、ヒアルロン酸ゲルの有用性が研究されている。注射または移植可能なヒアルロン酸ゲルは BMP-2 を保持し、生体内で骨形成を促進するとの報告が散見される。本研究では、局所投与可能であり、かつ、投与後に局所で硬化するヒアルロン酸ゲルを用いた。この BMP-2 含有 IFHG-HA は、マウス難治性骨折モデルやマウス巨大骨欠損モデルにおいて、骨形成を促進した。IFHG-HA は、注射可能な材料であり、移植可能な材料であるという利点を有しているほか、骨癒合率を向上させ、ゲルからの BMP-2 拡散による副作用の発生を最小限に抑えることができる可能性がある。したがって、BMP-2 含有 IFHG-HA は、臨床現場において、難治性骨折や巨大骨欠損の治癒を促進するための有望な材料となる可能性がある。

BMP-2 のシグナル伝達は骨治癒の初期段階で開始され、炎症反応と骨膜の活性化をもたらす。BMP-2 はさらに、軟骨および骨形成の後期においても重要である。したがって、骨折治癒過程において骨形成を促進するためには、BMP-2 を長期的かつ持続的に徐放させることが重要である。本研究で行った徐放試験では、投与した BMP-2 の 23 %が最初の 4 時間のあいだに IFHG-HA から放出された。その後、徐放率は緩やかなレベルに低下したが、間葉系幹細胞の ALP 活性を高めるのに必要な量に相当する約 100 ng/ml の BMP-2 が、2 週間と 3 週間のあいだに放出された。また、BMP-2 は転写因子オステリックスを介して骨芽細胞の分化を刺激する。本研究では、BMP-2 投与 6 週間後にもオステリックスの mRNA 発現が増加し、分化マーカーであるアルカリホスファターゼとオステオカルシンの発現も増加していた。したがって、BMP-2 含有 IFHG-HA は、骨折治癒過程における後期の段階においても骨形成を刺激している可能性がある。以上のことから、BMP-2 含有 IFHG-HA は難治性骨折や巨大骨欠損などにおける骨形成を促進するための有用な材料である可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shoji S, Uchida K, Tazawa R, Saito W, Kuroda A, Sekiguchi H, Ishii D, Inoue S, Inoue G, Takaso M	4. 巻 -
2. 論文標題 Acceleration of bone formation using in situ-formed hyaluronan-hydrogel containing bone morphogenetic protein-2 in a mouse critical size bone defect model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio-Medical Materials and Engineering	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） 10.3233/BME-201172	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 Mukai M, Uchida K, Hirose N, Murakami K, Kuniyoshi K, Inoue G, Miyagi M, Sekiguchi H, Shiga Y, Inage K, Orita S, Suzuki T, Matsuura Y, Takaso M, Ohtori S	4. 巻 37
2. 論文標題 Wrapping with Basic Fibroblast Growth Factor-Impregnated Collagen Sheet Reduces Rat Sciatic Nerve Allodynia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 2258-2263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.24349.	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1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 BMP-2含有局所硬化ヒアルロン酸ゲルを用いた難治性骨折治療法の有用性
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------