

機関番号: 14401

研究種目: 基盤研究(B)

研究期間: 2008~2010

課題番号: 20390398

研究課題名(和文) 骨再生のための高機能付加型人工骨の開発

研究課題名(英文) Development of highly functional bone substitutes for bone regeneration

研究代表者

吉川 秀樹 ( YOSHIKAWA HIDEKI )

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 60191558

研究成果の概要(和文): 力学的負荷のかかる荷重部の骨再生方法を開発するため、気泡ゲル化法を応用し、内部は多孔体(10MPa)、外郭は緻密体(500MPa)の多孔体・緻密体コンポジット人工骨を開発した。骨形成蛋白 OP-1 と連通多孔体ハイドロキシアパタイトセラミックス IP-CHA のハイブリッドにより骨再生を増強すること、軟骨下骨の再生および、関節軟骨の再生に有効であることが証明された。

研究成果の概要(英文):

To regenerate a defect of weight-bearing bone, we developed a composite hydroxyapatite combined with a compact (500MPa) and a porous (10MPa) parts, by adopting the "form-gel" technique. The bone substitute combined with recombinant human bone morphogenetic protein-7 (OP-1) completely repaired the cartilage and subchondral bone defect of rabbit and pig femurs, and must be a promising candidate for joint regeneration.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 外科系臨床医学・整形外科

キーワード: 骨再生、人工骨、骨形成因子、幹細胞、再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症の脆弱した骨の補填や骨腫瘍、外傷による骨欠損や難治性偽関節に対しては、通常、患者の健常部から骨を採取した骨移植が治療に用いられている。この方法は健常部への侵襲と骨採取量の制限という問題がある。これらの問題に対し従来はセラミックなどの生体基盤材料を用いた充填法が用いられてきた。しかし、この方法が可能なのは比較的小さな骨欠損に限られ、基盤材料と周囲の骨組織が結合するには長期間を必要とする。従って、幹細胞や骨形成蛋白を用いて骨組織を構築する細胞へ分化させた後、生体外でその組織を再構築できれば、これらの組織の広汎な組織病変、欠損に対する治療に応用することが可能となる。さらに、骨再生促進薬、骨吸収抑制に有効な蛋白・遺伝子などを人工骨に導入することにより、より効果的・効率的な骨再生能力を有する生体材料の開発が可能となる。一方、骨再生を必要とする個々の症例では、骨欠損の部位と形態が異なること、皮質骨と海面骨の割合が異なることから、その欠損を自家骨により、元の三次元的解剖学的形態に復元することは困難である。すなわち骨再生技術のさらなる発展のためには、任意の骨欠損部位に対して、解剖学的な形態、生理的強度にまで修復する技術が求められている。

## 2. 研究の目的

大型骨欠損の再生や早期の骨再生を目指して、高機能を付加した人工骨の開発を行う。「気泡ゲル化技術」の応用により、ヒト骨組織に近似した、外周に緻密体ハイドロキシアパタイト、内部に多孔体ハイドロキシアパタイトをハイブリッドした人工骨を開発し、その有効性を動物実験により検証する。機能的・形態的に病的状態を有する関節リウマチ、骨粗鬆症などにも対応できる高機能付加型人工骨の開発を行う。コンピューターを用いた形態シミュレーション技術による骨欠損

に応じた形状の制御を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 力学的負荷のかかる荷重部の骨再生方法を開発するため、気泡ゲル化法により、骨組織に適応する多孔体・緻密体コンポジット人工骨を開発する。18月齢の雄ビーグル犬に対し、L4-5の後側方固定術により比較検討した。  
(2) 骨再生に最適の人工骨内部構造を明らかにするため、材質、マイクロ気孔の異なる高気孔率連通多孔体人工骨3種（ハイドロキシアパタイト製マイクロ気孔あり、ハイドロキシアパタイト製マイクロ気孔なし、 $\beta$ -TCP製マイクロ気孔あり）を用いて、ウサギ大腿骨での骨再生、圧縮強度、材料吸収を検討した。  
(3) 人工骨内での再生骨の吸収を抑制するため、リボン型NF- $\kappa$ Bデコイを人工骨の気孔内表面にコーティングし、骨形成能を検討した。液性担体としては、PLA、PEG合成ポリマー、ポリリン酸を使用した。  
(4) 骨再生を効果的・効率的に実現するため、OP-1の優れた担体の開発を行った。コラーゲン、Ca架橋アルギン酸、共有結合架橋アルギン酸にOP-1(3-30 $\mu$ g)、PLA-PEGを含浸させ、マウス皮下に移植し骨形成量を評価した。  
(5) 人工骨による関節軟骨の再生を目指し、OP-1の軟骨再生における効果をウサギ、ブタ膝関節軟骨全層欠損モデルで評価した。10ヶ月齢の雄ミニブタの両側大腿骨内顆関節面に $\phi$ 7.5mm $\times$ 深さ15mmの軟骨全層欠損を作成した。A. 欠損のみ、B. 円柱型人工骨、C. 人工骨にOP-1(250 $\mu$ g)を添加したものを移植し、12週後に評価した。評価はX線および組織学評価により行った。

## 4. 研究成果

(1) 内部は多孔体(10MPa)、外郭は緻密体(500MPa)の多孔体・緻密体コンポジット人工骨を開発した。画像評価により、上下椎体との良好な骨癒合を認めた。組織学的には、上下の多孔体部分より、豊富な血管の侵入、骨

の再生を認めた。本コンポジット人工骨に骨形成蛋白 (OP-1) 10-100  $\mu$ g を含浸させ、脊椎固定を施行し、対照群と比較し、有意な骨再生の促進を認めた。

(2) 力学的強度は全ての材料で移植後数週間、低下したが、ハイドロキシアパタイト製の2種では、その後回復し、10MPa 以上の強度を維持した。ミクロ気孔を有する人工骨2種では、材質に関わらず、血管の侵入、破骨細胞の出現を早期に認め、相対的に早い気孔内骨侵入、血管新生、生体内での人工骨吸収を認めた。

(3) 移植後4週で、リボン型デコイをコーティングした人工骨内に旺盛な骨形成を認め、移植後8週で骨吸収抑制効果を認めた。液性担体の検討では、ポリリン酸を用いた場合に骨再生量が最も多かった。

(4) 3mg で骨形成を示したのは、コラーゲン、Ca 架橋アルギン酸のみであり、Ca 架橋アルギン酸は、コラーゲンと同等以上の骨形成量、骨密度を示した。Ca 架橋アルギン酸は、非動物由来であり、低用量の OP-1 でも、骨形成に有効な担体であることを明らかにした。

(5) 人工骨による関節軟骨の再生

OP-1 添加群で他群と比較し明らかに良好な修復を認めた。組織学的 grading においても有意に良好な結果であった。OP-1 と人工骨のハイブリッドは、軟骨下骨の再生および、関節軟骨の再生に有効であることが証明された。

## 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 20 件)

1. Goto, A., Murase, T., Oka, K., Yoshikawa, H.: Use of the volar fixed angle plate for comminuted distal radius fractures and augmentation with a hydroxyapatite bone graft substitute. *Hand Surgery*, 16:29-37, 2011. (査読有)

2. Morimoto, D. Tomita, T., Kuroda, S., Higuchi, C., Kato, S., Shiba, T., Nakagami, H., Morishita, R., Yoshikawa, H.: Inorganic polyphosphate differentiates human mesenchymal stem cells into osteoblastic cells. *J Bone Miner Metab*, 28:418-423, 2010. (査読有)

3. Oka, K., Murase, T., Moritomo, H., Goto, A., Sugamoto, K., Yoshikawa, H.: Corrective osteotomy using customized hydroxyapatite implants prepared by preoperative computer simulation. *International J Med Robot Computer Assist Surg*, 6:186-193, 2010. (査読有)

4. Tamai, N., Myoui, A., Kudawara, I., Ueda, T., Yoshikawa, H.: Novel fully interconnected porous hydroxyapatite ceramic in surgical treatment of benign bone tumor. *J Orthop Sci*, 15:560-568, 2010. (査読有)

5. 玉井宣行、名井陽、吉川秀樹: 骨腫瘍に対する次世代人工骨を用いた骨再生医療、特集骨軟部腫瘍、整形外科, 61:873-880, 2010. (査読有)

6. 吉川秀樹、名井陽: 人工骨の開発・臨床応用と今後の課題—臨床の立場から、日整会誌, 84:465-468, 2010. (査読有)

7. 吉川秀樹: 骨の発生と再生、バイオマテリアル, 28:241-247, 2010. (査読無)

8. Kuriyama, K., Hashimoto, J., Murase, T., Fujii, M., Nampei, A., Hirao, M., Tsuboi, H., Myoui, A., Yoshikawa, H.: Treatment of juxta-articular intraosseous cystic lesions in rheumatoid arthritis patients with interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic. *Modern Rheumatol*, 19:180-186, 2009. (査読有)

9. Nakase, T., Fujii, M., Myoui, A., Tamai, N., Hayaishi, Y., Ueda, T., Hamada, M., Kawai, H., Yoshikawa, H.: Use of hydroxyapatite ceramics for treatment of nonunited osseous defect after open fracture of lower limbs. *Arch Orthop*

Trauma Surg, 129:1539-1547, 2009. (査読有)

10. Nanno, K., Sugiyasu, K., Daimon, T., Yoshikawa, H., Myoui, A.: Synthetic alginate is a carrier of OP-1 for bone induction. *Clinical Orthop*, 467:3149-3155, 2009. (査読有)

11. Yamasaki, N., Hirao, M., Nanno, K., Sugiyasu, K., Tamai, N., Hashimoto, N., Yoshikawa, H., Myoui, A.: A comparative assessment of synthetic ceramic bone substitutes with different composition and microstructure in rabbit femoral condyle model. *J Biomed Mater Res*, 91B:788-798, 2009. (査読有)

12. Yoshikawa, H., Tamai, N., Murase, T., Myoui, A.: Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *J Royal Soc Interface*, 6:S341-348, 2009. (査読有)

13. Yoshikawa, H., Yoshioka, K., Nakase, T., Itoh, K.: Stimulation of ectopic bone formation in response to BMP-2 by Rho kinase inhibitor: A pilot study. *Clinical Orthop*, 467:3087-3095, 2009. 535. (査読有)

14. 吉川秀樹: 連通多孔体ハイドロキシアパタイト人工骨の開発と臨床応用、*バイオマテリアル*, 27:17-23, 2009. (査読無)

15. 橋本淳、南平昭豪、坪井秀規、栗山幸治、藤井昌一、村瀬剛、名井陽、吉川秀樹: 人工骨によるリウマチ・関節外科治療、*臨床整形外科*, 44:25-30, 2009. (査読有)

16. 武靖浩、中村憲正、名井陽、吉川秀樹: 骨と軟骨のティッシュエンジニアリング、分子細胞治療、4:135-139, 2008. (査読無)

17. 名井陽、吉川秀樹: 骨再生、*バイオセラミックスからティッシュエンジニアリングへ、治療*, 90:1815-1820, 2008. (査読無)

18. 吉川秀樹、玉井宣行、名井陽: 人工骨による骨・関節疾患の治療、*日本医事新報*, 4403:53-56, 2008. (査読無)

19. 名井陽、吉川秀樹: 腫瘍による骨欠損に

対する再生医療、*Clinical Calcium*, 18:1769-1773, 2008. (査読無)

20. 玉井宣行、名井陽、吉川秀樹: 人工生体材料(人工骨)、*臨床リハ*, 17:260-265, 2008. (査読無)

[学会発表] (計 26 件)

1. 杉安謙仁朗、南野勝彦、吉川秀樹、名井陽: 第 30 回整形外科バイオマテリアル研究会、OP-1/ハイドロキシアパタイトセラミックス・コンポジットによる関節軟骨再生 (平成 22 年 12 月 4 日、京都)

2. 南野勝彦、杉安謙仁朗、橋本伸之、吉川秀樹、名井陽: 第 30 回整形外科バイオマテリアル研究会、OP-1/ハイドロキシアパタイトセラミックス・コンポジットを用いた骨再生 (平成 22 年 12 月 4 日、京都)

3. 吉川秀樹: 第 21 回日本小児整形外科学会学術集会、骨・軟骨の再生 - 基礎研究から臨床応用へ (平成 22 年 11 月 26-27 日、徳島)

4. 名井陽、吉川秀樹: 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、幹細胞を用いた骨再生医療技術開発の現状と展望 (平成 22 年 10 月 14-15 日、京都)

5. 南野勝彦、杉安謙仁朗、橋本伸之、吉川秀樹、名井陽: 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、OP-1 担体としての連通多孔体ハイドロキシアパタイトの有用性—イヌ腰椎後側方固定モデルによる検証 (平成 22 年 10 月 14-15 日、京都)

6. 杉安謙仁朗、南野勝彦、吉川秀樹、名井陽: 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、BMP-7 と連通多孔体ハイドロキシアパタイトの組み合わせによるウサギ膝骨軟骨全層欠損モデルにおける軟骨再生実験 (平成 22 年 10 月 14-15 日、京都)

7. 吉川秀樹: 第 49 回日本生体医工学会大会 (シンポジウム: 人工臓器の次世代への展開)、次世代人工骨・人工関節の開発 (平成 22 年 6 月 25-27 日、大阪)

8. 南野勝彦、杉安謙仁朗、橋本伸之、吉川秀樹、名井陽: 第 9 回日本再生医療学会、OP-1 担体としての連通多孔体ハイドロキシア

- パタイトの有用性—イヌ腰椎後側方固定モデルによる検証（平成 22 年 3 月 18-19 日、広島）
9. Morimoto, D., Kunugiza, Y., Tomita, T., Yoshikawa, H.: Bone Tec 2008, The development of novel NF-kB decoy ODN coated interconnected porous hydroxyapatite. (Hanover, Nov 7-9. 2009)
  10. 名井陽, 吉川秀樹: 第 27 回日本骨代謝学会、多孔体人工骨の微細構造と骨再生（平成 21 年 7 月 23-25 日、大阪）
  11. 吉川秀樹: 第 15 回日本遺伝子治療学会、骨再生：基礎研究から臨床応用へ（平成 21 年 7 月 9-11 日、吹田）
  12. 吉川秀樹: 連通多孔体研究会（特別講演）。整形外科における医工連携研究とその実用化（平成 21 年 6 月 6 日、大阪）
  13. 吉川秀樹: 第 82 回日本整形外科学会学術総会、人工骨の開発・臨床応用と今後の課題、臨床の立場から（平成 21 年 5 月 14-17 日、福岡）
  14. 吉川秀樹: 第 6 回新適塾（進化する再生医学）、骨・軟骨の再生 - 基礎研究から臨床応用へ（平成 21 年 5 月 28 日、豊中）
  15. 名井陽: 第 25 回日本医工学治療学会、再生医療の実現化、骨再生医療の臨床応用の現状（平成 21 年 4 月 10-12 日、大阪）
  16. 森本大樹、富田哲也、吉川秀樹: 第 25 回日本医工学治療学会、NFkB decoy 溶出型新規高機能付加型人工骨の開発（平成 21 年 4 月 10-12 日、大阪）
  17. Morimoto, D., Tomita, T., Kuroda, S., Kunugiza, Y., Morishita, R., Yoshikawa, H.: 55<sup>th</sup> annual Meeting of the Orthopaedic Research Society: The development of novel NF-kB decoy oligodeoxynucleotides interconnected porous calcium hydroxyapatite. (Las Vegas, Feb 25-28. 2009)
  18. 南野勝彦、名井陽、杉安謙仁朗、玉井宣行、橋本伸之、吉川秀樹: 第 3 回骨軟部吸収性材料フォーラム、OP-1 担体としてのアルギン酸の有用性について（平成 21 年 2 月 20 日、大阪）
  19. 三宅潤一、名井陽、村瀬剛、岡久仁洋、吉川秀樹: 第 28 回整形外科セラミックインプラント研究会、培養細胞導入カスタム形状人工骨を用いた新たな治療法（平成 20 年 12 月 6 日、横浜）
  20. 吉川秀樹: 大阪保健医療大学開学記念シンポジウム、骨関節の再生医療- 基礎研究とリハビリテーション（平成 20 年 12 月 3 日、大阪）
  21. 森本大樹、富田哲也、吉川秀樹: 第 26 回日本骨代謝学会、NFkB decoy 溶出型新規高機能付加型人工骨の開発（平成 20 年 10 月 29-31 日、大阪）
  22. 森本大樹、富田哲也、吉川秀樹: 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会、NFkB decoy 溶出型新規高機能付加型人工骨の開発と検討（平成 20 年 10 月 23-24 日、京都）
  23. 吉川秀樹: 骨粗鬆症フォーラム in Osaka、骨粗鬆症に対する全身治療と局所治療（平成 20 年 10 月 4 日、大阪）
  24. 吉川秀樹: 釧路市整形外科医会学術講演会、整形外科の歴史と最先端治療（平成 20 年 9 月 20 日、釧路）
  25. Nanno, K., Myoui, A., Sugiyasu, K., Tamai, N., Hashimoto, J., Yoshikawa, H.: 2<sup>nd</sup> Tissue Engineering and Regenerative Medicine World Congress, Alginate is a potent carrier of OP-1 for ectopic bone formation. (Seoul, Aug 31-Sep 3, 2009)
  26. 森本大樹、富田哲也、吉川秀樹: 第 29 回日本炎症再生医学会、NFkB decoy 溶出型新規高機能付加型人工骨の開発と検討（平成 20 年 7 月 8-10 日、東京）
- 〔図書〕（計 1 件）
1. Yoshikawa, H., Tsumaki, N., Myoui, A.: Bone biology: Development and regeneration mechanisms in physiological and pathological conditions. In: Strategies in Regenerative Medicine, Springer, New York, pp. 431-448, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 秀樹 (YOSHIKAWA HIDEKI)

所属機関 大阪大学・大学院医学系研究  
科・教授

研究者番号：60191558

(2) 研究分担者

菅野 伸彦 (SUGANO NOBUHIKO)

所属機関 大阪大学・大学院医学系研究  
科・寄附講座教授

研究者番号：70273620

名井 陽 (MYOUI AKIRA)

所属機関 大阪大学・医学部附属病院・  
准教授

研究者番号：10263261

妻木 範行 (TSUMAKI NORIYUKI)

所属機関 大阪大学・大学院医学系研究  
科・独立准教授

研究者番号：50303938