

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592149

研究課題名（和文） 新規骨形成タンパク（NELL1）の臨床応用

研究課題名（英文） Clinical application of novel osteoinductive protein(NELL1)

研究代表者

織田 光夫（ODA MITSUO）

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：30359492

研究成果の概要（和文）：1996年に渡辺、1999年に黒田により遺伝子クローニングされたタンパク質、NELL1は *in vivo* において、一定の骨形成能を示した。しかし、適正濃度などの骨形成条件を明確に確認することはできなかった。また、一部の実験系において、著明な軟骨形成能を示した。

研究成果の概要（英文）：NELL1, which was cloned in 1996(Watanabe)1999 (Kuroda), induces osteogenesis *in vivo* though its optimal condition for osteogenesis was not clarified. However NELL1 showed prominent cartilage inducing capacity under certain conditions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：新規骨形成タンパク、NELL1、軟骨形成

1. 研究開始当初の背景

(1) 1996年渡辺ら、1999年黒田俊一（当時大阪大学産業化学研究所准教授、現在名古屋大学農学部教授）らが遺伝子クローニングしたタンパク質NELL1は *in vitro* において骨形成能を示した。また、片山化学工業において、同タンパク質の大量生産の体制が整いつつあり、供給を受けられる状況であった。

(2) 我々は、黒田からNELL1の供与を得て、臨床応用の可能性を探るべく、ラットを用いて予備実験をおこなった。その結果、異所性の骨誘導は示さなかったものの、骨欠損（頭蓋骨、大腿骨）において、旺盛な骨形成能を示した。

(3) NELL1のシグナル伝達機構の解明は、黒田等が進め、その進捗状況については、

適宜報告をうけることとした。

2. 研究の目的

- (1) NELL1の臨床応用に向けて、骨形成能の詳細を以下の項目について検索。①異所性骨誘導能の有無。②濃度依存性の有無。③部位による骨化様式の差異の有無。
- (2) 骨形成能以外の機能についての検索

3. 研究の方法

- (1) 使用動物：ウイスターラット（♂）
体重200～250g、ペントバルビタール腹腔内投与下に処置。
- (2) NELL1:Human NELL-1を使用。

実験直前に解凍して、概 $1\mu\text{g}/1\mu\text{l}$ の濃度で、担体（各種コラーゲン）に滴下して使用。

供給されたロットにより結果が著しく異なったため、予備実験段階のものを“NEL L 1 # 1” 片山化学で大量生産されたものを“NEL L 1 # 2、名古屋大で生産されたものを”NEL L 1 # 3 “と記載する。

(3) 実験

- ・実験 1（異所性骨誘導の検証）
大腿部筋肉内への埋入、コラーゲンスポンジにNEL L 1 $2\mu\text{g}$ 含浸
- ・実験 2（膜内骨化部位、濃度検定）
頭蓋骨に直径 10mm の欠損作成、コラーゲンシートにNEL L 1 を $5\sim 50\mu\text{g}$ 滴下。術後 2 週、4 週で観察。
- ・実験 3（軟骨内骨化部位）
大腿骨を 5mm 区域切除、チタンプレートを用いて固定。欠損部にコラーゲンスポンジ、NEL L 1 $2\sim 5\mu\text{g}$ 滴下。4、8 週後に観察。
- ・実験 4（骨膜、intact な皮質骨との反応）
頭蓋部骨膜下に筒型のシリコンモールドを挿入、モールド内にコラーゲンスポンジ、NEL L 1 $20\mu\text{g}$ 、対照として、rhBMP-2 $20\mu\text{g}$ 滴下。術後 8 週で観察。
- ・実験 5（閉鎖空間における、脂肪組織、幹細胞、肝組織と、NEL L 1 の反応）
大腿部に、血管柄付脂肪片を挙上、NEL L 1 $10\mu\text{g}$ コラーゲンシートに含浸させて、同時に採取した肝臓組織片とともに、シリコンモールド内に挿入閉鎖。2 週後に観察。

(4) 観察方法

- ・マイクロCT撮影
- ・脱灰HE組織標本

4. 研究成果

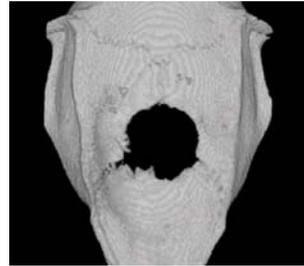
(実験 1)

NEL L 1 # 1、# 2、# 3 のいずれにおいても骨形成認めず。NEL L 1 には異所性骨誘導能は認めなかった。

(実験 2)

NEL L 1 # 1 : 濃度 $5, 10, 50\mu\text{g}$ 、2 週、4 週、各ポイント $N=4$ で観察したが、濃度、時系列、いずれにおいても、骨形成量と相関を認めなかった。
また、新たに形成された骨組織内に軟骨を認めなかった。

CT 像
 $2\text{W}25\mu$



NEL L 1 # 2 : # 1 と同様の群、全ての個体で骨形成を認めず。

NEL L 1 # 3 : NEL L 1 # 1 と同様に濃度、時系列と骨形成量の相関は認められなかった。

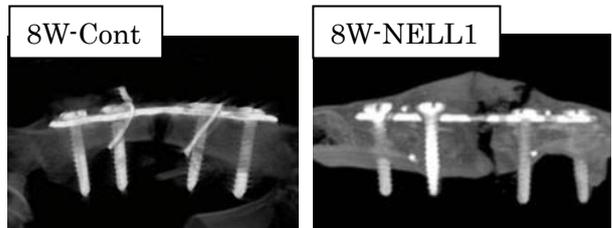
(実験 3)

NEL L 1 # 1 : 骨欠損部に $2\mu\text{g}$ 滴下、術後 8 週で観察 ($N=1$)。骨欠損部のみならず、プレート周囲まで、旺盛な骨形成を示した。新生骨組織内には、多量の軟骨を認めた。

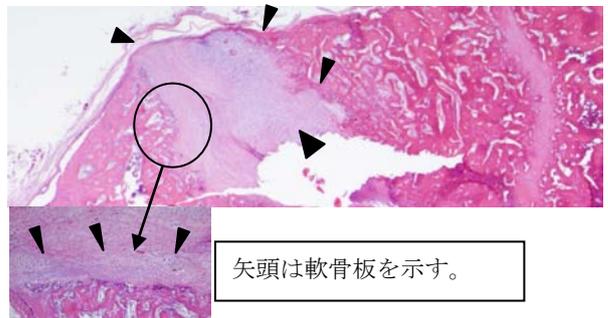
術中写真



CT 像



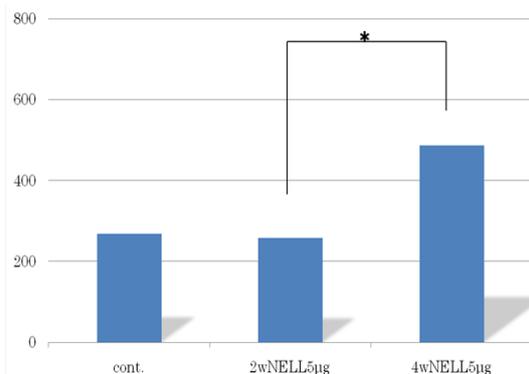
組織像



矢頭は軟骨板を示す。

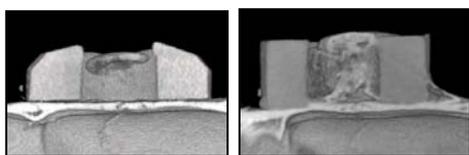
NEL L 1 # 2 : 全例 ($N=5$) において、観察期間中の、プレート脱離、破折、を認めた。結果として、異常骨折、感染を引き起こした。

NELL1 # 3 : 骨欠損部に 5 μ g 滴下、術後 2 週、4 週で観察 (N=3)。時系列と骨形成量に相関を認めた。新生骨組織内に軟骨形成を認めた。



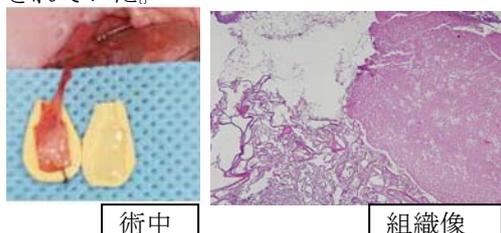
(実験 4) NELL1 # 3 のみ :

対照とした BMP 群では、主に骨膜と反応した骨形成が認められた。NELL 群では、骨形成はほとんど認められなかった。



(実験 5) NELL1 # 3 のみ :

NELL1 と反応した、血管柄付脂肪組織は、管腔構造を伴う組織に変化していた。NELL1 と反応した、血管柄付脂肪組織に移植された肝臓片はほぼそのままの形態を保っていた。対照群では肝臓片は吸収されていた。



5. 主な発表論文など

(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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

骨形成因子 (BMP) による骨造成を想定した実験的研究 (会議録) : 成田憲司, 織田光夫, 馬谷原光織, 中川祥, 久保田耕世, 榊宏剛, 佐藤寿, 小林恒, 片岡竜太, 中村雅典, 木村博人 : 日本口腔科学会雑誌 (0029-0297) 60 巻 1 号 Page130 (2011. 01)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称 : Technique for heterotropic regeneration and control of tissues and organs by using nell-1

発明者 : 織田光夫, 馬谷原光織, 中村雅典

権利者 : 織田光夫, 馬谷原光織, 中村雅典

種類 : 特許

番号 : PCT/JP2009/063768

出願年月日 : 2011

国内外の別 : 国外

名称 : TECHNIQUE FOR REGULATING REGENERATION OF TISSUE OR FAULTY OR ABNORMAL PART IN ORGAN USING NELL-1

発明者 : NAKAMURA, Masanori; (JP).

NAKAMURA Masanori; (JP).

KURODA Shunichi; (JP).

ODA Mitsuo; (JP).

MAYAHARA Mitsuori; (JP).

KENMOTSU Sachiyo; (JP).

IGARASHI Koichi; (JP).

OIE Kazunori; (JP)

権利者 :

種類 :

番号 : WO/2010/016469

取得年月日 : 11. 02. 2010

国内外の別 : 国外

名称 : MEDICINE AND MEDICAL INSTRUMENT CONTAINING OSTEOGENIC AND CHONDROGENIC PROTEIN

発明者 : NAKAMURA, Masanori; (JP).

KURODA, Shun'ichi; (JP).

KAKU, Junichiro; (JP).

ODA, Mitsuo; (JP).

MAYAHARA, Mitsuori; (JP).

KENMOTSU, Sachiyo; (JP).

BOKUI, Nobuyuki; (JP).

IGARASHI, Koichi; (JP)

権利者 :

種類 :

番号 : WO/2009/057790

取得年月日 : 07. 05. 2009

国内外の別 : 国外

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

織田 光夫 (ODA MITSUO)
昭和大学・歯学部・兼任講師
研究者番号：30359492

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

黒田 俊一 (KURODA SYUNICHI)
名古屋大学・生命農学研究科・教授
研究者番号：60263406
中村 雅典 (NAKAMURA MASANORI)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号：50180394
馬谷原 光織 (MAYAHARA MITSUORI)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：30384184