

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09440

研究課題名(和文) 局所硬化ゲルを用いた多孔質材料への成長因子、細胞導入による骨形成促進法の開発

研究課題名(英文) Effect of growth factor/In Situ-Formed Hydrogel / Artificial bone Composites on Bone Formation

研究代表者

齋藤 亘 (Saito, Wataru)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：60439099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：超高齢社会を迎えた我が国において、高齢者の脊椎固定術が確実に増加している。また、高齢者は若年者に比べ骨癒合が遅延することが知られている。本研究では局所硬化ゲルを用いた多孔質材料に成長因子、細胞を導入した新規材料の開発とその有用性を検討した。マウス後側方固定術モデルを用いてその有用性を検討した結果、局所硬化ヒアルロン酸ゲルを用いた多孔質材料(ハイドキシパタイト)に骨形成タンパク質-2を導入した新規材料は、骨形成と骨癒合を促進することが明らかになった。本移植材料は高齢者の脊椎固定術における骨癒合の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

本方法は多孔質材料の材質により左右されないため、既存の人工骨に加え、新たに開発された如何なる多孔質材料に対しても成長因子の導入が可能である。また、本研究は水溶液の状態多孔質材料の全域に成長因子を浸透させたのちにゲル化を行うため、材料全体に成長因子を含有させることが容易である。本研究は脊椎固定術のみならず、外傷、腫瘍に伴う骨欠損、軟骨欠損治療など多孔質材料を用いた様々な運動器治療アプリケーションに応用できる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Several types of calcium phosphate (CaP) biomaterial carriers have been designed to deliver bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) to augment spinal fusion in spinal surgery. Here, we evaluated an in situ-formed hydrogel (IFH) constructed from hyaluronan (IFH-HA) combined with a BMP2/hydroxyapatite (HAP) composite in bone formation in a murine model of posterolateral lumbar fusion (PLF). BMP2/IFH-HA group exhibited newly formed bone between the transverse processes and bone union in coronal sections. Relative to the Control and BMP2/HA-TA groups, the BMP2/IFH-HA group showed significantly greater bone volume. The BMP2/IFH-HA group also showed significantly elevated bone mineral content relative to the BMP2/HA-TA group. A composite comprising BMP2/HAP and IFH-HA, thus, enhanced the new bone formation in a murine model of PLF, suggesting its promise for augmenting spinal fusion.

研究分野：整形外科

キーワード：脊椎固定術 骨癒合促進 成長因子導入 多孔質材料 局所硬化ゲル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

総務省統計局の人口推計の結果、我が国の 65 歳以上（高齢者）の割合は 28.1% であることが明らかになった。超高齢社会を迎えた我が国において、高齢者の脊椎固定術が確実に増加している。また、高齢者は若年者に比べ骨癒合が遷延することが知られている。治療の長期化に伴う患者の社会復帰の遅延や、続発する合併症は、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。従って、確実な骨癒合を達成する技術革新は国民の健康寿命の延長に向けて解決すべき重要課題である。

腰椎後側方固定術 (PLF) は、脊椎固定術の一般的な術式であるが、強固な固定のためには骨癒合を促進するためにボーンストックを追加する必要がある。ボーンストックには自家骨や同種骨、人工骨などがある。しかし、自家骨は移植による免疫反応の心配がなく、局所的に採取できるが、骨採取部位の疼痛などの合併症を伴う。同種骨は供給源が限られている。整形外科領域では人工骨として合成ハイドロキシアパタイト (HAP) や  $\beta$ -リン酸三カルシウム ( $\beta$ -TCP) などのリン酸カルシウム (CaP) 系生体材料がしばしば採用される。CaP の組成や微細構造は、骨組織に酷似しておりより骨形成に期待できるが、CaP の骨誘導活性は限定的であるため、骨環境が不活性な移植部位では骨形成が不良になることがある。

骨形成タンパク質 2 (BMP-2) は、間葉系前駆細胞 (MPC) の骨芽細胞系への誘導と分化を促進し、骨基質を形成する骨誘導タンパク質である。BMP-2 は、米国食品医薬品局 (FDA) により承認され、骨治療薬として広く使用されている。脊椎手術の椎体間固定術においても吸収性コラーゲンスポンジ (ACS) 上に BMP-2 を投与方法が用いられている。さらに、PLF でも、骨形成を促進する目的で BMP-2 を送達する様々な CaP キャリアが報告されている。しかし、これらの CaP 担体では初期に BMP-2 が大量放出されることで、臨床においては骨形成を減少させるなどの副作用を誘発する可能性がある。

この問題を克服するために、コラーゲン、デキストラン、プルラン、ヒアルロン酸 (HA) などの天然多糖類から構築される in situ 形成ハイドロゲル (IFH) に着目した。IFH は水溶液中で過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) と西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) の酸化的カップリング反応により硬化する。これまでの研究において、HA から構築された IFH (IFH-HA) は、骨折や骨欠損部位において BMP-2 の徐放が可能であることを報告した。しかし、BMP-2 と CaP を組み合わせた場合の効果については、まだ不明な点が多く残されている。

### 2. 研究の目的

局所硬化ゲルを用いた多孔質材料への成長因子、細胞導入による骨形成促進法の開発を行うことである。

### 3. 研究の方法

HAP (10 mg) を 0.8 units/mL HRP と 2  $\mu$ g BMP を含む 2% チラミン架橋ヒアルロン酸 (HA-TA) と混合した (図 1A-1)。 $H_2O_2$  を加え、ゲルを硬化させることで、BMP2/IFH-HA (図 1、パネル A-2, B-1)。 $H_2O_2$  によるゲルの硬化を行わない BMP2/HA-TA 群 (図 1、B-2)、PBS 中に HAP を浸漬した群をコントロールとして用いた (図 1、パネル B-3)。

マウスの背側の棘突起に沿って皮膚を正中切開し、L6-L7 右の傍脊椎筋膜に無菌的に切り込みを入れ、腰椎後側部を露出させた。鈍的剥離で背側傍脊柱筋を切離し、L6-L7 の薄板と肋骨突起を露出させた。BMP2/IFH-HA、BMP2/HA-TA、または PBS を、L6 と L7 の肋骨突起を結ぶ右側スペースに充填した。

PLF 手術の 4 週間後、すべてのマウスを  $CO_2$  過剰吸入で安楽死させ、腰椎と骨盤を周囲の筋肉とともに摘出した。マイクロフォーカス X 線・CT 装置を用いて、ボクセルサイズ 20  $\mu$ m / ピクセル、マトリックスサイズ 1024  $\times$  1024、加速電圧 90kV、電流 110mA にて  $\mu$ CT 画像を撮影した。後外側骨量を評価するために、L6 から L7 横突起までの冠状面の撮影とした。さらに、L6-L7 横突起とその間の正中線から軸方向に撮影し、3 次元画像解析ソフトにより椎体表面の平均新生骨断面積を測定した (図 1、パネル B)。新生骨の体積を評価するために、様々な密度の HAP を用いて得られたファントム画像から生成されたデータを用いて、HAP 検量線を作成した。各サンプル中の骨塩量を評価するために、マイクロコンピュータ断層撮影 ( $\mu$ CT) 画像を用いて測定した密度を HAP 検量線と比較した。移植された HAP は 800mg/cm<sup>3</sup> 以上の密度を持つため、新生骨としては 300 から 800mg/cm<sup>3</sup> の閾値と設定した。

$\mu$ CT 解析後、組織をメタクリル酸メチルに包埋し、4  $\mu$ m の厚さで切片化した。その後、マッソン・トリクローム染色を行い、第 6-7 肋骨突起間の新生骨の評価をした。

群間の比較には ANOVA を用い、次にボンフェローニのポストホック比較検定を用いた。p < 0.05 を有意差とした。

### 4. 研究成果

Control 群および BMP2/HA-TA 群では、術後 4 週目に骨癒合を認めなかった (図 2、パネル A、

B)。一方、BMP2/IFH-HA 群では、同時点の coronal 像において、肋骨突起 6 と 7 の間に新たに形成された骨と骨結合が認められた (図 2、パネル C)。一方、全群で薄板と脊柱突起の表面に新生骨の形成がみられた。骨量は、PBS 群および BMP2/HA-TA 群と比較して、BMP2/IFH-HA 群で有意に増加した (それぞれ  $p = 0.028$  および  $p = 0.001$ , 図 3, パネル A)。さらに、BMP2/IFH-HA 群では、BMP2/HA-TA 群と比較して、骨塩量が増加していた ( $p = 0.003$ , 図 3, パネル B)。組織学的検査では、 $\mu$ CT の結果と同様に、BMP-2/IFH-HA 群で骨形成が多く確認でき、BMP-2/HA-TA 群および Control 群ではほとんど確認されなかった (図 4)。

吸収性コラーゲンスポンジ (ACS) への BMP-2 投与は椎体間固定術では一般的な治療である。PLF においても BMP-2/ACS を -TCP と HAP からなる合成骨で包んだものは自家海綿骨移より優れた効果を認めている。今回、PLF のマウスモデルを用いて BMP2/HAP/IFH-HA 複合体と BMP-2/HAP/TA-HA 複合体の骨形成促進に対する有用性を比較した。IFH-HA/HAP/BMP-2 複合体が脊椎固定を補強するための新しい治療法となる可能性を示唆された。

骨再生過程の初期段階における BMP2 シグナルの活性化は、炎症と MPC の活性化を引き起こし、MPC の骨芽細胞分化に極めて重要な役割を果たしている。このことは、BMP2 の一定濃度での継続的な放出が、移植部位の骨形成を早めるために有用である可能性を示唆している。以前の研究では、*in vitro* であるが IFH-HA 材料は 14 日間にわたり血小板由来の成長因子を放出し続け MPC の増殖を促進した。同様に、我々の以前の研究では、IFH-HA は、*in vitro* で 14 日間継続的に BMP2 を放出することが確認できた。これらのことから、BMP2/HAP/IFH-HA コンポ BMP2/HAP と IFH-HA からなる複合体は、PLF のマウスモデルにおいて新生骨形成を促進し、脊椎固定術の増強に有効であることが示唆された。

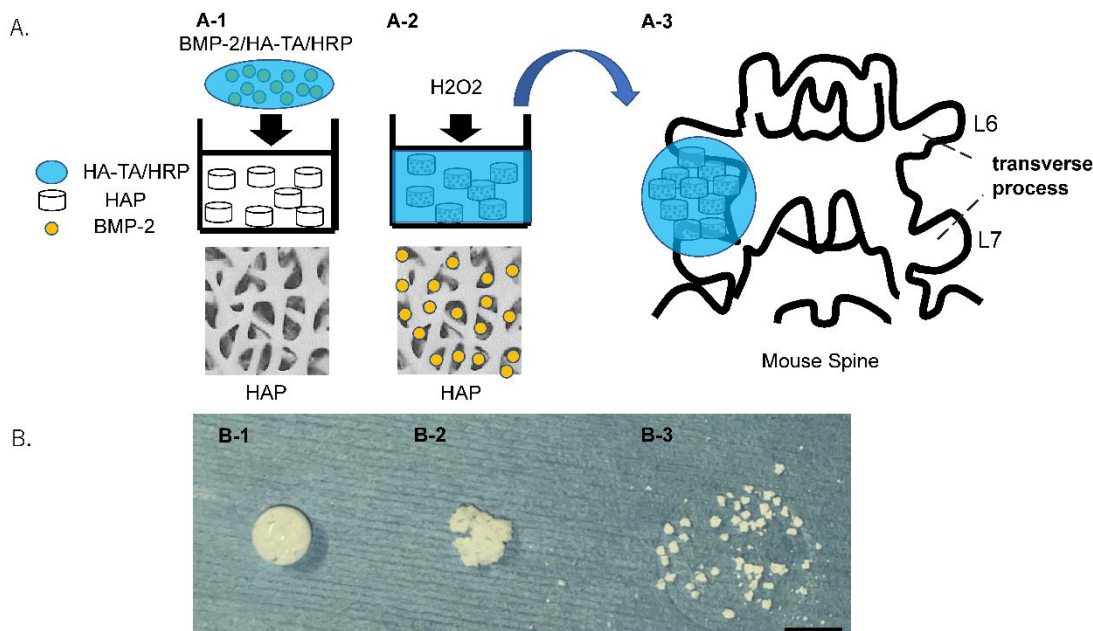


図 1 : BMP2/ヒドロキシアパタイト/*in situ* 形成ヒアルロン酸ハイドロゲルコンポジットの作製 (A および B) 骨形成タンパク質-2 (BMP-2) /ヒドロキシアパタイト (HAP) /*in situ* 形成ヒアルロン酸ハイドロゲル (IFH-HA) コンポジットの形成過程を示すスキームである。

A-1: 西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) と BMP-2 を含むヒアルロナン-チラミン (HA-TA) ポリマー溶液 (BMP-2/HA-TA/HRP) を HAP に添加した。

A-2: 硬化反応を開始させるために、BMP2 / HA-TA / HRP 溶液 (BMP2 / IFH-HA) 中の HAP に H2O2 を添加した。

A-3: BMP2 / HAP / IFH-HA 複合体を L6 横突起と L7 横突起の間にグラフトした。

B-1: BMP2 / HA-TA / HRP 溶液中の HAP に 4mM H2O2 を加えて硬化を開始させた。

B-2: BMP2/HA-TA/HRP 溶液に H2O2 の代わりに PBS を添加して、硬化反応の有効性を評価した。

B-3: コントロールとして、PBS 中の HAP を用いた。

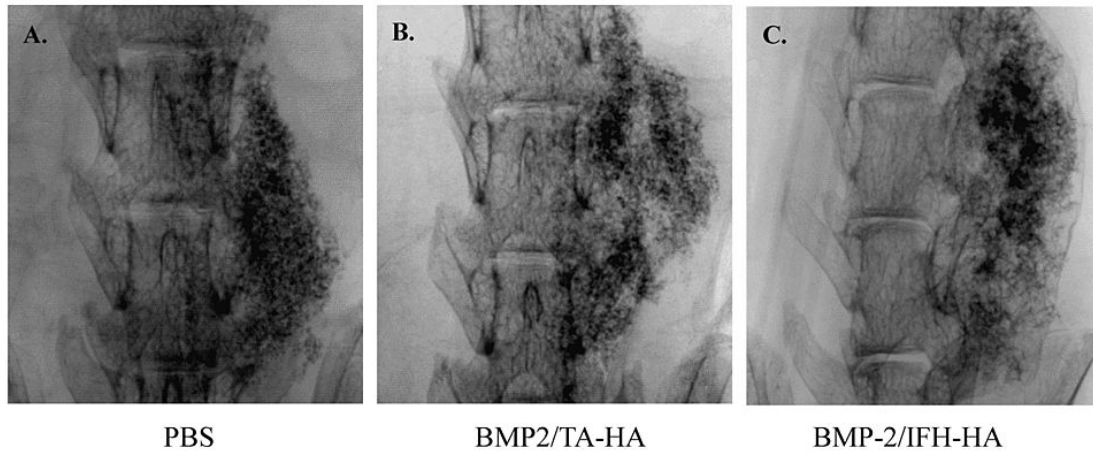


図 2 : 移植後 4 週、L6、L7 周囲の単純 X 線画像

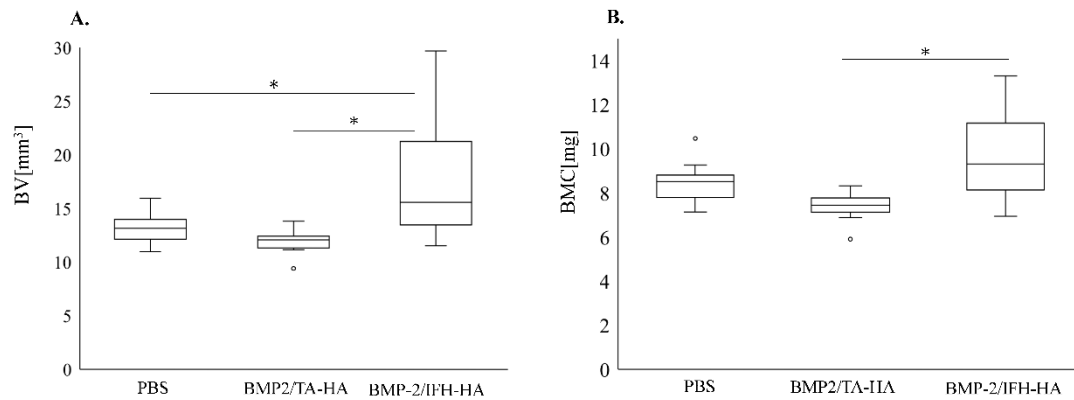


図 3 : 術後 4 週の移植部位の骨量と骨塩量

PBS 群、BMP2/HA-TA 群、BMP2/IFH-HA 群において、術後 4 週間の新生骨形成をマイクロコンピュータトモグラフィー画像により解析した。(A) 骨量 (BV) および (B) 骨塩量 (BMC)  $n = 10$ . \* $p < 0.05$ .

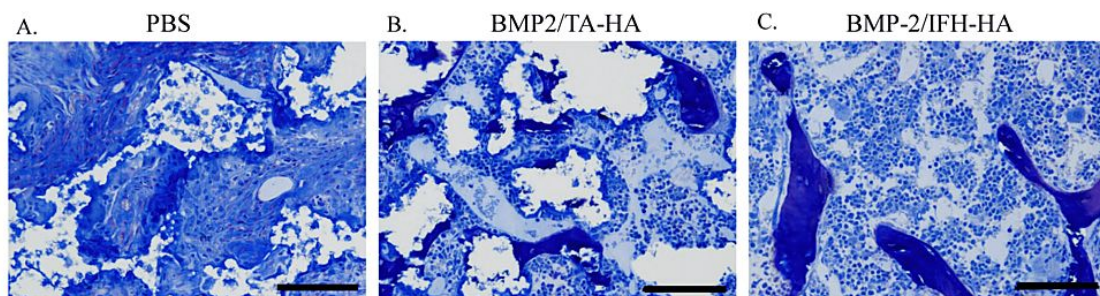


図 4 : 術後 4 週目の新生骨形成を示す組織像

Masson's trichrome 染色 (A) PBS 群、(B) BMP2/HA-TA 群、(C) BMP2/IFH-HA 群。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。

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 1件）

1. 著者名 Saito W, Inoue G, Shirasawa E, Imura T, Nakazawa T, Miyagi M, Kawakubo A, Uchida K, Kotani T, Akazawa T, Takaso M	4. 巻 9
2. 論文標題 Limitations of posterior spinal fusion to L5 for flaccid neuromuscular scoliosis focusing on pelvic obliquity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Spine Deform	6. 最初と最後の頁 559-565
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s43390-020-00214-1	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 Kuroda A, Saito W, Inoue G, Miyagi M, Shoji S, Sekiguchi H, Takaso M, Uchida K	4. 巻 14
2. 論文標題 Effect of Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)/Hydroxyapatite/In Situ-Formed Hyaluronan Hydrogel Composites on Bone Formation in a Murine Model of Posterolateral Lumbar Fusion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁 e25509
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7759/cureus.25509	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 -

〔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 黒田 晃義, 内田 健太郎, 庄司 真太郎, 横関 雄司, 宮城 正行, 齋藤 亘, 井上 玄, 高相 晶士
2. 発表標題 ヒアルロン酸硬化ゲルを用いてBMP-2を導入した人工骨の後側方固定術における骨形成促進効果の検討
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	内田 健太郎  (Uchida Kentaro)  (50547578)	北里大学・医学部・講師    (32607)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	馬淵 洋  (Mabuchi Yo)  (50424172)	順天堂大学・大学院医学研究科・特任准教授    (32620)	
研究分担者	関口 裕之  (Sekiguchi Hiroyuki)  (90547233)	湘南医療大学・臨床医学研究所・研究員    (32728)	

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