

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18059

研究課題名（和文）Rspo2を用いた新たな骨再生治療

研究課題名（英文）Novel bone regeneration therapy using Rspo2

研究代表者

中島 宏彰（NAKASHIMA, HIROAKI）

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70710101

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）：骨芽細胞の骨分化におけるBMP2とRspo2から誘導されるシグナルの相互的な分子メカニズムを明らかとした。所属教室で研究をおこなってきた自己組織化ペプチドを足場として用いる腰椎椎体間固定術での骨形成促進と共に、この自己組織化ペプチドにBMP2とRspo2を含有して実験することで、内因性骨芽細胞を速やかに足場へと誘導し、骨形成を促進することを確認した。また、偽関節に対する新たな治療法を開発するため、骨分化に適したBMP2とRspo2の濃度を決定した。自己組織化ペプチドを組み合わせることで、最低必要濃度を抑えることができ、分泌因子BMP2の散布で従来見られた「炎症などの副作用の抑制」ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者の増加に伴い骨粗鬆症が増加している。高齢者では骨再生が不完全となるため、骨折後の偽関節のみならず、脊椎やその他の整形外科領域の矯正固定術後に偽関節となる症例も多く認めるため、速やかな骨癒合を促進する因子が求められてきた。この偽関節予防・治療に対しBMP2などの分泌される骨誘導因子を用いた骨再生療法の臨床試験が諸外国では始まったが、実臨床では期待された骨再生効果が得られず、周囲組織の炎症などの副作用も多いため本邦では認可されていない。本研究での自己組織化ペプチドとBMP2、Rspo2の混合製剤の使用により、安全で効果的な骨再生が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The molecular mechanisms underlying the reciprocal signalling induced by BMP2 and Rspo2 in osteoblast osteogenesis were elucidated. Together with the promotion of bone formation in lumbar interbody fusion using self-assembling peptides as scaffolds, which has been studied in our department, we have confirmed that these self-assembling peptides containing BMP2 and Rspo2 rapidly induce endogenous osteoblasts to scaffolds and promote bone formation in experiments. In order to develop a new treatment for pseudoarthrosis, the concentrations of BMP2 and Rspo2 suitable for osteogenic differentiation were determined. By combining self-assembling peptides, the minimum required concentration could be reduced and the 'inflammation and other side effects' previously observed with the dissemination of the secreted factor BMP2 could be suppressed.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨再生 Wnt Rspo2

1. 研究開始当初の背景

高齢者の増加に伴い骨粗鬆症が増加している。高齢者では骨再生が不完全となるため、骨折後の偽関節のみならず、脊椎やその他の整形外科領域の矯正固定術後に偽関節となる症例も多く認めるため、速やかな骨癒合を促進する因子が求められてきた。この偽関節予防・治療に対し BMP2 などの分泌される骨誘導因子を用いた骨再生療法の臨床治験が諸外国では始まったが、実臨床では期待された骨再生効果が得られず、周囲組織の炎症などの副作用も多いため本邦では認可されていない。申請者が所属する名古屋大学大学院医学系研究科整形外科学教室と神経遺伝情報学教室では、分泌因子 Rspo2 が個体発生期に起こる内軟骨性骨化を促進する働きをもつことを発見し、Rspo2 の抑制 (Rspo2 KO) で軟骨に由来する骨化が減少する事も報告した。そこで申請者は成体の骨癒合過程においても、Rspo2 が誘導する Wnt シグナルが骨形成において重要な働きをしている可能性があると考え、自己組織化ペプチドと BMP2、Rspo2 の混合製剤を用いた骨再生研究を開始した。

2. 研究の目的

(a)骨芽細胞の骨分化における BMP2 と Rspo2 の機能の相互的な分子メカニズムの詳細を明らかにし、(b)その知識を応用して偽関節に対する新たな治療法開発を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

骨芽細胞株 MC3T3 に購入できるリコンビナントヒトタンパク質 rhRspo2 と rhBMP2 に濃度勾配をつけて添加し、この細胞の骨分化を示すアリザリン染色を行う。また、アリザリン染色は染色の強度の差が小さく定量性が乏しいため、骨分化を示すアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性測定も並行して行った。また、ラット大腿骨欠損モデルでの骨形成能を評価した。

また、自己組織化ペプチド内に rhRspo2 と rhBMP2 を適量含有させて移植し 4 週と 8 週後における骨再生能を評価した。再生能は、新生骨を μ CT で継時的に画像評価した。骨再生機序を川本法で作製した凍結切片やパラフィン切片を用い、HE 染色、Villanueva Goldner stain 染色、免疫組織化学染色で Collagen Type I たんぱく質の量を評価した。また骨折部組織を回収して、定量的 RT-PCR を行い骨分化関連遺伝子や血管新生関連遺伝子 (VEGF, VEGFR-2, Angiopoietin など) の発現を定量評価した。さらに、これらの実験方法や血液検査で周囲組織の炎症や腫瘍発生などの副作用も評価した。

4. 研究成果

MC3T3 にリコンビナントヒトタンパク質 rhRspo2 と rhBMP2 を投与した実験では、仮説通り BMP2 刺激を加速させる形で骨形成が促進されており、その濃度勾配に応じて骨成熟が有意に促されている事を確認できた。また Rspo2 が骨形成を促す上で、骨芽細胞のシグナルのどの経路を刺激しているかは不明であったが、今回 RNA-seq を行うことで網羅的な解析を行う事ができた。細胞の分化や増殖に関連する分子の発現量が増加しており、Rspo2 は BMP 2 と協調的に骨形成を促している可能性が高いことが示唆された。

骨芽細胞株 MC3T3 を三次元培養し、リコンビナントヒトタンパク質 rhRspo2 と rhBMP2 添加に伴う RNA 発現量の違いをリアルタイム PCR で確認した。ALP、Osteocalcin、Runx2、OPN、Osterix、BSP などの骨形成に関連する因子は、BMP 2 添加により濃度依存性に発現量が増加していた。また Rspo2 を加えることで、さらなる RNA 発現量の増加を認め、BMP2 と Rspo2 は相加的に骨形成を促している可能性が示唆された。また、Vitro での骨形成能に関する実験の定量化を行った。網羅的な発現遺伝子の解析では、Rspo2 を投与することで、血管新生に関する遺伝子の発現上昇を認めた。

また、Vivo では大腿骨欠損モデルを作成した。10 週齢の 300 ± 350 g の Wistar ラット雌 12 匹を使用した。ラットを麻酔下に、無菌状態で左大腿骨後側部を切開し、大腿筋を切断した。大腿骨の中央部を露出させ、外固定具と直径 1.4 mm の 4 本のピンを用いて固定し、骨幹部の 5 mm 長の部分をマイクロカッティングソーで骨膜と一緒に除去した左大腿骨中軸内の骨欠損部 (5mm) に PEEK 製ケージを移植し、外固定具で安定性を維持した。PEEK ケージには、SPG-178 ハイドロゲル (200μ l) とリコンビナントヒトタンパク質 rhRspo2 と rhBMP2 のいずれか、または rhRspo2 と rhBMP2 の両方を充填した。自己組織化ペプチド内に rhRspo2 と rhBMP2 を適量含有させて移植し 4 週と 8 週後における骨再生能を評価した。BMP2 投与でも骨形成は旺盛であったが、Rspo2 を投与することで、より骨形成が促された。

再生能は、新生骨を μ CT で継時的に画像評価し、骨梁構造について評価を行った。骨再生機序を川本法で作製した凍結切片やパラフィン切片を用い、ヘマトキシリン・エオジン染色、ALP 染色、Alizarin Red 染色、Von Kossa 染色を行い、BMP 2 投与群で有意な骨形成を認めた。Rspo2 単独投与では、骨形成は僅かであったが、BMP 2 に Rspo2 を加えることで、BMP 2 単独に比べて良好な骨形成を認めた。また、免疫組織化学染色で Collagen Type I たんぱく質の量を評価し、Rspo2 を投与することで、骨成熟に関する因子の増加を認めた。また骨折部組織を回収して、定量的 RT-

PCR を行い骨分化関連遺伝子や血管新生関連遺伝子 (VEGF, VEGFR-2, Angiopoietin など) の発現を定量評価したが、BMP2 単独に比べて、Rspo2 を投与することで、血管新生が移植後初期から促されていた。さらに、これらの実験方法や血液検査で周囲組織の炎症や腫瘍発生などの副作用も評価したが、明らかな副作用と思われる高度な周囲組織の炎症や腫瘍形成は認めなかった。

以上より、Rspo2 を BMP2 に添加することで、微量な BMP2 でも骨形成を促すことができ、周囲の炎症を抑え、新たな骨形成促進方法として期待できることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 山内一平 中島宏彰 伊藤定之 世木直喜 大内田隼 大石遼太郎 宮入祐一 森田圭則 松本太郎 大出幸史 長谷康弘 岡田裕也 今釜史郎
2. 発表標題 ラット大腿骨骨新生におけるBMP-2の効果
3. 学会等名 第38回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------