

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月8日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究 C（一般）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580360

研究課題名（和文）骨および関節軟骨疾患に対する生体組織工学を用いた再生医療に関する研究

研究課題名（英文）Osteoinductivity of gelatin/ $\beta$ -tricalcium phosphate sponges loaded with different concentrations of mesenchymal stem cells and bone morphogenetic protein-2 in an equine bone defect.

研究代表者

佐々木 直樹（SASAKI NAOKI）

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：00360975

研究成果の概要（和文）：

間葉系幹細胞のゼラチン $\beta$ TCP スポンジ内における細胞増殖能の証明を行い、馬の骨欠損に対する間葉系幹細胞混合 BMP2 含浸 $\beta$ TCP スポンジの骨再生効果を明らかにした。さらに、関節軟骨欠損に対する PRP 含浸ゼラチンマイクロスフィアの関節内投与により、線維性軟骨の再生を促進した。最後に、離断性骨軟骨症に対して、間葉系幹細胞混合 BMP2 含浸 $\beta$ TCP スポンジと PRP 含浸ゼラチンマイクロスフィアを臨床応用し、骨再生ならびに関節軟骨再生効果を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

$\beta$ -TCP sponge was an excellent scaffold material, which builds a DDS for BMP-2. Based on these results, it was shown that the combined use of growth factors and scaffolds is effective in bone regeneration. It was suggested that the combined use of MSC, BMP-2, and  $\beta$ -TCP sponge efficiently promoted bone regeneration. Based on the results of the five studies, it was demonstrated that the application of tissue engineering combining growth factors, cells, and scaffolds promoted bone and articular cartilage regeneration. Therefore, future clinical applications to bone and articular cartilage diseases of horses are expected.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学：臨床獣医学

キーワード：再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

産業動物としての馬においては、運動器疾患の発生率が高く、特に四肢の骨折や関節炎等の骨疾患の発生が多い。従来、骨折に対し

では、ギプス固定に加えて、スクリューならびにプレート固定術が行われてきた。また、通常骨癒合に6ヶ月～12ヶ月の休養期間を必要とし、競走馬では競走復帰までに1年以

上かかる例も少なくない。このため、スクリユーおよびプレート抜去に伴う休養期間の延長を省く必要性が求められている。さらに、肢の重症骨折例（複骨折、複雑骨折等）では手術による再建を行ったとしても、骨折周囲軟部組織の挫滅ならびに血行不良により骨癒合不全が生じ、治癒期間の延長に伴う経済的理由により、予後不良と判断されることが多い。このことから、馬の骨折が畜主の経済的負担の増加に起因する社会的ならびに生物系特定産業にあたる損失も少なくない。このため、四肢の重症骨折例における上記問題点克服のための治療方法を確立することは重要な課題といえる。こうした状況から、骨折治癒期間を短縮するための再生医療技術を用いた骨折再建方法の開発がもてられている。一般に、骨折治療では金属スクリユーが使用される。一方、近位種子骨骨折では骨折部位における細胞誘導が低いため、金属スクリユーによる固定のみでは癒合不全が多いことが問題とされている。このため、このような骨折は生体組織工学を応用した再生医療による骨折治療が必要とされているといえる。

## 2. 研究の目的

ウマの四肢重症骨折ならびに関節軟骨疾患に対する生体組織工学を用いた再生医療のによる治療方法の検討を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 初年時（平成22年度）到達目標：bFGF含浸ゼラチンハイドロゲルならびに骨製スクリユーの設計と創製を行い、馬の第三中手骨骨欠損モデルに対するbFGF含浸ゼラチンハイドロゲル関節内投与の影響をin vivoにて評価する。

(2) 中間時（平成23年度）達成目標：in vitroで骨製スクリユーの強度試験を実施し、in vivoでbFGF含浸ゼラチンハイドロゲルならびに骨製スクリユーを用いた術式を実施し、骨折治癒経過を観察することで、その影響を評価する。さらに臨床（重症骨折例）に対して、bFGF含浸ゼラチンハイドロゲルならびに骨製スクリユーを用いた手術を実施して臨床応用を目指す。

(3) 終了時（平成24年度）到達目標：大腿骨内側顆骨軟骨欠損モデルを作成し、TGF- $\beta$ 1含浸ゼラチンスポンジ、BMP-2含浸 $\beta$ -TCPゼラチンスポンジおよび間葉系幹細胞（1×10<sup>7</sup>）の骨増生への影響を評価する。これにより、大骨軟骨欠損の大きい腿骨内側課骨嚢胞等に対する生体組織工学を用いた再生医療を構築する。

## 4. 研究成果

(1) bFGF含浸ゼラチンハイドロゲルの設

計を行い、in vivoにて馬の第三中手骨骨欠損モデルに対するbFGF含浸ゼラチンハイドロゲル関節内投与を実施し、関節軟骨ならびに骨増生をMDCT（マルチテクトCT）のCT値により評価することで、bFGF含浸ゼラチンハイドロゲルの軟骨ならびに骨に対する誘導能が示された。

(2) in vitroにて近位種子骨切断モデルに対して骨製スクリユーを用いた固定を行い、引っ張り強度試験を実施することで、馬の重症骨折例への臨床応用に必要な強度と適切な形状を持つ骨製スクリユーの創製ができた。

(3) in vivoにて近位種子骨切断モデルに対するbFGF含浸ゼラチンハイドロゲルならびに骨製スクリユー固定を実施し、骨折治癒経過を観察することで、骨で構成された骨製スクリユーを足場（架橋）として骨折周辺からbFGF含浸ゼラチンハイドロゲルに誘導されて骨芽細胞の増生が生じ、骨折治癒が促進されることが証明された。

(4) in vivoにて軟骨欠損モデルを作成し、TGF- $\beta$ 1含浸ゼラチンスポンジ、BMP-2含浸 $\beta$ -TCPゼラチンスポンジおよび間葉系幹細胞により、大骨軟骨欠損の大きい腿骨内側課骨嚢胞等に対する有効とな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7件）

1. Use of a bioengineered osteochondral precursor for treatment of osteochondritis dissecans in a Thoroughbred filly. Nao Tsuzuki, Jong-pil Seo, Shingo Haneda, Kazutaka Yamada, Yasuhiko Tabata, Naoki Sasaki. Australian Veterinary Journal. in press. 2013.

2. Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum for in vitro expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Jong-pil Seo, Nao Tsuzuki, Shingo Haneda, Kazutaka Yamada, Hidefumi Furuoka, Yasuhiko Tabata, Naoki Sasaki. Research in Veterinary Science. in press. 2013.

3. The effect of bone morphogenetic protein-2, platelet-rich-plasma incorporated gelatin hydrogel microsphere, mesenchymal stem cell and gelatin  $\beta$ -tricalcium phosphate sponge on equine articular cartilage defect. Nao Tsuzuki, Jong-pil Seo, Kazutaka Yamada, Shingo

Haneda, Hidefumi Furuoka, Yasuhiko Tabata, Naoki Sasaki. Canadian Veterinary Journal. in print. 2013.

4. The effect of gelatin hydrogel sheet containing bFGF on proximal sesamoid bone transverse fracture in the horse. Naoki Sasaki, Satoru Nishii, Kazutaka Yamada, Hidehumi Huruoka, Yasuhiko Tabata. Journal of Equine Veterinary Science. 33・17・210-214. 2013.

5. Effect of compound of gelatin hydrogel microsphere incorporated with platelet-rich-plasma and alginate on sole defect in cattle. Nao Tsuzuki, Jong-pil Seo, Kazutaka Yamada, Shingo Haneda, Yasuhiko Tabata and Naoki Sasaki. Journal of Veterinary Medical Science. 74・8・1041-1044. 2012.

6. Proliferation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in gelatin/ $\beta$ -tricalcium phosphate sponges. Jong-pil Seo, Nao Tsuzuki, Shingo Haneda, Kazutaka Yamada, Hidehumi Furuoka, Yasuhiko Tabata, Naoki Sasaki. Research in Veterinary Science. 93・16・1481-1486. 2012.

7. In vivo osteoinductivity of gelatin  $\beta$ -tri-calcium phosphate sponge and bone morphogenetic protein-2 on an equine third metacarpal bone defect. N. Tsuzuki, K. Otsuka, J. Seo, K. Yamada, S. Haneda, H. Furuoka, Y. Tabata, N. Sasaki Research in Veterinary Science 93・15・1021-1025. 2012.

[学会発表] (計 10 件)

1. 馬の距骨外側滑車の関節軟骨欠損に対する生体組織工学を用いた2層法の影響. 田邊貴史、都築直、徐鐘筆、羽田真悟、古岡秀文、山田一孝、田畑泰彦、佐々木直樹. 第25回日本ウマ科学会学術集会. 2012年12月3日

2. ウマの骨および関節軟骨に対する生体組織工学を用いた再生医療の応用. 都築直、徐鐘筆、大塚健史、中尾奨吾、大下のえ、山田一孝、羽田真悟、古岡田畑泰彦、佐々木直樹. 第25回日本ウマ科学会学術集会. 2012年12月3日

3. 足場内における馬幹細胞増殖に関する in vitro での検討. 徐鐘筆、都築直、中尾奨吾、大下のえ、田畑泰彦、羽田真悟、山田一孝、

佐々木直樹. 日本ウマ科学会. 2011年11月28日

4. ウマの関節軟骨欠損モデルに対する多血小板血漿ならびに鏡視下ドリリングの影響. 大下のえ、都築直、徐鐘筆、中尾奨吾、古岡秀文、田畑泰彦、山田一孝、羽田真悟、佐々木直樹. 日本ウマ科学会. 2011年11月28日

5. ウマの骨欠損モデルに対する間葉系幹細胞混合BMP-2含浸ゼラチン $\beta$ -TCPスポンジの影響. 中尾奨吾、都築直、徐鐘筆、大下のえ、田邊貴文、山家史、古岡秀文、田畑泰彦、山田一孝、羽田真悟、佐々木直樹. 日本ウマ科学会. 2011年11月28日

6. ウマの離断性骨軟骨症に対して骨髄由来間葉系幹細胞、BMP-2ならびに多血小板血漿含浸ゼラチン $\beta$ -TCPスポンジを用いた1例. 都築直、徐鐘筆、大下のえ、中尾奨吾、羽田真悟、山田一孝、古岡秀文、田畑泰彦、佐々木直樹. 日本ウマ科学会. 2011年11月28日

7. The effect of bone morphogenetic protein-2, gelatin hydrogel microsphere incorporating platelet rich plasma, bone marrow derived mesenchymal stem cell and gelatin  $\beta$ -tri calcium phosphate sponge on an equine cartilage defect. Nao Tsuzuki, Jong-pil Seo, Kazutaka Yamada, Shingo Haneda, Hidefumi Furuoka, Yasuhiko Tabata, Naoki Sasaki. 2012 American college of veterinary surgeons veterinary symposium (USA). 2012年11月1日

8. Proliferation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in gelatin/ $\beta$ -tricalcium phosphate sponges. Jong-pil Seo, Nao Tsuzuki, Shingo Haneda, Kazutaka Yamada, Hidehumi Furuoka, Yasuhiko Tabata, Naoki Sasaki. 2012 American college of veterinary surgeons veterinary symposium (USA). 2012年11月1日

9. In vivo osteoinductivity of gelatin  $\beta$ -tri-calcium phosphate sponge containing bone morphogenetic protein-2 on an equine third metacarpal bone defect. Nao Tsuzuki, Kenji Otsuka, Kazutaka Yamada, Shingo Haneda, Hidehumi Furuoka, Yasuhiko Tabata, Naoki Sasaki. 2nd Joint Workshop between College of Veterinary Medicine, Seoul National University and United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University. 2011年2月20日

10. サラブレッド種ウマにおけるゼラチンβ-リン酸-3-カルシウムスポンジからのBone Morphogenetic Protein-2 徐放化による骨再生効果. 大塚健史、都築直、中尾奨吾、大下のえ、古岡秀文、羽田真吾、田畑泰彦、山田一孝、佐々木直樹. 第23回日本ウマ科学会. 2010年11月29日

[図書] (計1件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 直樹 (SASAKI NAOKI)  
帯広畜産大学・畜産学部・准教授  
研究者番号：00360975

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：