

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861306

研究課題名(和文) 培養骨髄細胞と骨分化促進剤を組み合わせたハイブリッド型人工骨の作製

研究課題名(英文) Preparation of a hybrid artificial bone combined with ex-vivo expanded bone marrow cells and an osteogenesis promoter

研究代表者

三島 健一 (Mishima, Kenichi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座助教

研究者番号：40646519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ランソプラゾールの骨芽細胞分化促進効果は水溶性の方が優れており、至適濃度は20 micro Mであった。ランソプラゾールは全身投与によってラット大腿骨骨折の骨癒合を促進した。ランソプラゾール含有人工骨をラット大腿骨骨折部近傍に移植すると、人工骨周囲により多くの新生骨が形成されたが、ウサギ脛骨皮質骨欠損部に埋植すると、人工骨周囲に線維性肉芽組織が形成された。ランソプラゾールをラットに全身投与し骨幹端の骨組織形態計測を行うと、1ヶ月投与では破骨細胞の数や機能が上昇し、3ヶ月投与では骨梁幅が減少して類骨幅が増加した。破骨細胞前駆細胞をランソプラゾールで刺激すると分化成熟と骨吸収機能が亢進した。

研究成果の概要(英文)：Soluble form of lansoprazole facilitated osteoblastogenesis more than insoluble form of lansoprazole especially at a concentration of 20 microM. Systemic administration of lansoprazole enhanced fracture healing in a rat model of femoral fracture. Implantation of lansoprazole-impregnated bone substitutes around an osteotomy site of the femurs in rats formed more calcified bones around the substitutes, whereas implantation of those into cortical bone defects of the tibiae in rabbits formed much fibrogranulation tissue surrounding the substitutes. Bone histomorphometrical analysis of the metaphyses in rats that were fed with lansoprazole for one month demonstrated significant increase of osteoclast number and function whereas that for three months did significant decrease of trabecular thickness and increase of osteoid thickness. Lansoprazole unregulated differentiation/maturation and bone absorption function in preosteoclastic cells.

研究分野：整形外科学

キーワード：ドラッグリポジショニング トランスレーショナルリサーチ 骨形成促進 骨折治癒促進 骨代謝 破骨細胞分化

### 1. 研究開始当初の背景

(1)外傷後や骨軟部腫瘍切除後の骨欠損は、今なお健常部を犠牲にする自家骨移植術で治療されている。しかし自家骨の採取は主要な血管や神経の損傷リスクがある上に、十分な移植骨が得られないなど制約が多い。

(2)近年、生体材料を素材とした人工骨が臨床応用されている。しかし強度や生体吸収性に優れ、骨誘導能や骨伝導能を兼ね備えた人工骨は今なお存在しない。例えばハイドロキシアパタイト(HA)やポリエーテルエーテルケトン(PEEK)は強度や生体適合性には優れているが、生体吸収性や骨誘導能を欠く。第2世代の生体材料であるリン酸三カルシウム(TCP)は徐々に自家骨に置換される生体吸収性を有し骨伝導能にも優れている。しかし強度がやや弱く骨誘導能は皆無なため、比較的大きな骨欠損は治療できない。そこで骨誘導能を発揮する成長因子 BMP2/7 を生体吸収性人工骨に含浸させた第3世代の人工骨が開発された。しかし費用対効果に劣るばかりか移植部近傍に有害な副反応を引き起こし、がん発生リスクまで高めるとの臨床報告が相次いでいる。

(3)骨延長術は骨切り後に生じる仮骨を伸張しながら骨量を増やす骨組織再生法であり、骨欠損に対しても有効である。しかし治療期間が長く合併症の多いことが難点であり、治療施設も限られる。申請者らは骨延長術における治療期間の短縮と合併症の減少を目的として、独自の細胞治療法「培養骨髄細胞移植と多血小板血漿を併用した骨延長術」を開発し、従来法と比較した優れた治療成績を報告してきた。2011年には厚労省から高度医療に認定されたこの細胞治療の臨床成績を規定する因子は、移植する細胞の数と分化度である。一般に骨端線閉鎖前の小児期は骨形成が良好であり、培養骨髄細胞の増殖能や骨分化度は高い。しかし成人になると増殖能や骨分化度は著しく低下し、この細胞治療による骨組織再生効果は少ない。そこで本法による治療効果を上げるため、骨芽細胞分化促進因子を簡単かつ安全に活性化する方法を探索すると発想に至った。

(4)転写因子 Runx2 は未分化間葉系幹細胞の骨芽細胞系列への分化決定と骨分化促進に必須の因子である。申請者らは骨形成促進効果を発揮する既認可薬の同定を目的として、Runx2 の発現と転写活性を上昇させる既存薬を網羅的に探索した。その結果消化管潰瘍治療薬として実際に使われているプロトンポンプ阻害薬(PPI)の1つ、ランソプラゾールに骨形成促進作用が存在することを明らかにした。ランソプラゾールはラット大腿骨骨折モデルにおいて骨折部の骨新生を促進し、患者由来培養骨髄細胞の骨分化培養条件において最終骨分化を促進した。この結果を踏まえ、生体吸収性人工骨に骨髄細胞を吸着させ、ランソプラゾール刺激下に効率的に人工骨内部で骨芽細胞様細胞に分化させ、骨誘導能

を兼ね備えたハイブリッド型人工骨として骨欠損の治療に臨床応用するとの着想に至った。

### 2. 研究の目的

骨髄由来間葉系細胞(MSC)とランソプラゾールを組み合わせたハイブリッド型人工骨を樹立し、従来の骨欠損補填材では治療し難いサイズの骨欠損に対する新規治療法の開発を進めることである。

(1)MSC を吸着した人工骨が移植後に最も優れた骨誘導能や骨伝導能を示すようなランソプラゾールの添加条件を決定する。MSC の平面培養や人工骨に吸着させた3次元培養において条件検討を進め、最適な添加濃度や培養期間を決定する。

(2)中型動物の四肢に作製した骨欠損に最適条件で準備したハイブリッド型人工骨を移植し、骨新生の経時的变化を X 線学的および組織学的に評価する。

### 3. 研究の方法

(1)ランソプラゾールの至適培養条件を人工骨に吸着させた状態の MSC において検討する。ラットから骨髄細胞を採取、培養皿に接着した MSC を継代培養によって増殖させ、 $5 \times 10^6$  の6乗個の MSC をブロック状の多孔体  $\beta$ -TCP 人工骨に吸着させ、最終濃度が  $10 \mu\text{M}$ 、 $20 \mu\text{M}$ 、 $40 \mu\text{M}$  のランソプラゾール含有骨分化誘導培地内で培養する。培養後のハイブリッド型人工骨を同系ラットの皮下に移植、4 週後に取り出し、脱灰標本による組織学的評価およびブロック内に存在する細胞の骨形成マーカーを調べ、ランソプラゾールの添加濃度や培養期間の最適化を行う。

(2)(1)で決定した培養条件で調整したハイブリッド型人工骨をウサギの四肢に作製した骨欠損に埋植し、人工骨内外の骨新生の状況を経時的に単純レントゲンにて評価する。12 週経過後に屠殺し、 $\mu$ -CT 検査による骨形態計測や非脱灰標本による組織学的評価、3 点曲げ試験による機械的強度の評価を行い、ハイブリッド型人工骨の生体内における有効性を調べる。

### 4. 研究成果

(1)ランソプラゾールを加えた培養条件の最適化。ヒト MSC を用い、ランソプラゾールの添加濃度やタイミング、水溶性の有無による骨形成マーカーの変化を調べた。骨形成促進能は水溶性ランソプラゾールの方が不溶性ランソプラゾールよりも優れていた。 $40 \mu\text{M}$  では ALP 活性は逆に低下したため、 $20 \mu\text{M}$  付近が最適濃度と考えられた。未分化状態では短期間の刺激の方が ALP 活性は上昇した。一方骨分化が進んだ状態からランソプラゾールを添加すると最終骨分化は抑制された。

(2)細胞治療の安全性評価。MSC を用いた細胞治療の安全性を検証するため、移植細胞の

生体内における空間的・時間的な分布を調べた。GFPを発現するグリーンラットの骨髄由来MSCを骨分化誘導培地で3週間継代培養し、骨芽細胞様細胞に分化させた。この細胞をアテロコラーゲンの担体に含浸させ、野生型ラットの大腿骨に作製した骨欠損部に移植し、グリーンラット由来細胞の挙動を調べた。同様の検討を静脈内注射による全身投与でも行った。局所投与ではGFP陽性細胞は局所に留まり主要臓器への移行は確認できなかった。全身投与では注入後2時間で肺を筆頭に肝、脾、末梢血、大腿骨骨髄にGFP陽性細胞を検出したが、2日目以降はすべての部位で検出限界以下となった。

(3)ランソプラゾール含有人工骨の開発と骨折モデルでの有効性の検討。約1週間ランソプラゾールが徐放される人工骨を開発した。ラット大腿骨骨折モデルを作製、骨切り部近傍にこの人工骨を移植し、6週後に移植骨周囲および内部の新生骨を肉眼的、X線学的、組織学的に調べた。実験群は肉眼的により強固に人工骨と母床骨とが癒合し、X線学的には人工骨周囲により多くの新生骨が形成されていた。組織学的には人工骨周囲を取り囲み、一部は辺縁から内部に侵入するように形成された新生骨が確認できた。

(4)ランソプラゾール含有人工骨の開発と骨欠損モデルでの有効性の検討。ウサギ脛骨近位に矩形の皮質骨部分欠損を作製し、新規人工骨の埋植実験を行った。移植後4週、8週、12週に人工骨を含む脛骨近位端を採取し、非脱灰骨標本の組織学的およびX線学的評価を行った。ランソプラゾール群では材料周囲に線維性肉芽組織が形成されて骨伝導能が著しく喪失し、人工骨内の連通孔や材料周囲に骨新生を確認できなかった。

(5)ランソプラゾールによる細胞毒性の評価。ランソプラゾールが異物反応を引き起こす局所濃度を探るため、チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞を用いた細胞毒性試験をISO 10993に準拠して行った。ランソプラゾールは20 $\mu$ M~100 $\mu$ M付近で徐々に細胞毒性を発揮し、100 $\mu$ M以上では細胞は死滅した。

(6)ラット骨折モデルにおけるランソプラゾールの有効性の検討。ラット大腿骨骨折モデルにランソプラゾールを全身経口投与し、投与開始から1, 2, 3, 4週後にレントゲン検査を行った。ランソプラゾール群ではコントロール群と比べて架橋仮骨や髄内仮骨の形成が速く、レントゲン学的な骨癒合は促進した。組織学的評価では2週時点の軟骨性仮骨の割合は同等であったが、仮骨内の破骨細胞の割合は減少していた。後者の結果は4週でも確認された。

(7)破骨細胞分化に与えるランソプラゾールの効果。ランソプラゾールが破骨細胞分化に及ぼす影響を調べるため、単球マクロファージ系細胞株RAW264.7細胞をRANKLと一緒にランソプラゾールで刺激したところ、ランソプラゾール群ではコントロール群と比べ

て全破骨細胞の数は変わらないまま多核破骨細胞の数が有意に増加した。骨吸収窩形成試験ではランソプラゾール群では有意に骨吸収機能が増加した。一方高濃度になると細胞毒性のためか全破骨細胞の数は著しく減少した。

(8)骨リモデリングに与えるランソプラゾールの効果。生理的な骨リモデリングに及ぼすランソプラゾールの影響を調べるため、4週と12週、ラットにランソプラゾールを全身経口投与し、大腿骨遠位骨幹端の非脱灰骨標本の組織学的形態計測を行った。4週では破骨細胞の数や機能はランソプラゾール群で有意に上昇した。12週では骨梁の厚みが減少、類骨の厚みは増加し、骨軟化症様の所見を示した。

## 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9件)

Hasegawa S, Kitoh H, Ohkawara B, Mishima K, Matsushita M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Tranilast stimulates endochondral ossification by upregulating SOX9 and RUNX2 promoters. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;470(2):356-61. (査読有) doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.044.

Mishima K, Kitoh H, Ohkawara B, Okuno T, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Lansoprazole Upregulates Polyubiquitination of the TNF Receptor-Associated Factor 6 and Facilitates Runx2-mediated Osteoblastogenesis. *EBioMedicine*. 2015;2(12):2046-61. (査読有) doi: 10.1016/j.ebiom.2015.11.024.

Mishima K, Kitoh H, Kadono I, Matsushita M, Sugiura H, Hasegawa S, Kitamura A, Nishida Y, Ishiguro N. Prediction of Clinically Significant Leg-Length Discrepancy in Congenital Disorders. *Orthopedics*. 2015 Oct;38(10):e919-24. (査読有) doi: 10.3928/01477447-20151002-60.

Okabe YT, Kondo T, Mishima K, Hayase Y, Kato K, Mizuno M, Ishiguro N, Kitoh H. Biodistribution of locally or systemically transplanted osteoblast-like cells. *Bone Joint Res*. 2014;20;3(3):76-81. (査読有) doi: 10.1302/2046-3758.33.2000257.

Mishima K, Kitoh H, Haga N, Nakashima Y, Kamazono J, Katagiri T, Susami T, Matsushita M, Ishiguro N. Radiographic characteristics of the hand and cervical spine in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Intractable Rare Dis Res*. 2014 May;3(2):46-51. (査読有) doi: 10.5582/irdr.2014.01009.

三島健一、鬼頭浩史、金子浩史、松下雅樹、石黒直樹. 骨形成促進効果を有する既存薬の同定とその臨床応用の可能性. 日本小児整形外科学会雑誌 2014 22 巻 2 号 374-378. (査読有)

Matsushita M, Kitoh H, Ohkawara B, Mishima K, Kaneko H, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Meclozine facilitates proliferation and differentiation of chondrocytes by attenuating abnormally activated FGFR3 signaling in achondroplasia. PLoS One. 2013;4;8(12):e81569. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0081569.

Kitoh H, Achiwa M, Kaneko H, Mishima K, Matsushita M, Kadono I, Horowitz JD, Sallustio BC, Ohno K, Ishiguro N. Perhexiline maleate in the treatment of fibrodysplasia ossificans progressiva: an open-labeled clinical trial. Orphanet J Rare Dis. 2013;16;8:163. (査読有) doi: 10.1186/1750-1172-8-163.

〔学会発表〕(計5件)

Mishima K, Kitoh H, Matsushita M, Sugiura H, Hasegawa S, Ishiguro N. 2016 Orthopaedic Research Society Annual Meeting; Orland (USA); March 5-8, 2016; Lansoprazole Regulates Osteoclast Formation and Function

Mishima K, Ohkawara B, Kitoh H, Tsukagoshi-Okabe Y, Sugiura H, Matsushita M, Ishiguro N, Ohno K. 4th TERMIS World Congress; Boston (USA); September 8-11, 2015; Promoting Osteoblastogenesis using Lansoprazole

三島健一、鬼頭浩史、杉浦洋、松下雅樹、長谷川幸、北村暁子、門野泉、西田佳弘、石黒直樹 ランソプラゾールによる骨形成促進効果の解析 第88回日本整形外科学会学術集会 神戸国際会議場(兵庫県神戸市) 2015年5月21日~5月24日

Mishima K, Tsukagoshi-Okabe Y, Sugiura H, Matsushita M, Kitoh H, Ishiguro N. 2015 Orthopaedic Research Society Annual Meeting; Las Vegas (USA); March 28-31, 2015; Promoting in vivo Osteogenesis using Lansoprazole

Mishima K, Kitoh H, Ishiguro N. Orthopaedic Research Society Annual Meeting; New Orleans (USA); March 15-18, 2014; Lansoprazole Activates the Noncanonical BMP-TAK1-p38 MAPK Signaling Through TRAF6 Autopolyubiquitination and Enhances Osteoblastogenesis

〔図書〕(計1件)

三島健一、鬼頭浩史、石黒直樹 骨形成促進治療の展望 Runx2 を活性化する薬剤の検討

先端医療シリーズ 44 臨床医のための最新整形外科 株式会社寺田国際事務所 / 先端医療技術研究所 2013 年発行 総ページ数 526 (4-7)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

三島 健一 (MISHIMA, Kenichi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教  
研究者番号: 40646519

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携分担者

なし

### (4)研究協力者

鬼頭 浩史 (KITOH Hiroshi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
松下 雅樹 (MATSUSHITA Masaki)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教  
大野 欽司 (OHNO Kinji)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
大河原 美静 (OHKAWARA Bisei)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師 (高等研究院)  
岡部 (塚越) 由香 (TSUKAGOSHI-OKABE Yuka)  
名古屋大学・医学部附属病院・特任助教  
杉浦 洋 (SUGIURA Hiroshi)  
名古屋大学・医学部附属病院・医員  
長谷川 幸 (HASEGAWA Sachi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・大学院生