

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670659

研究課題名(和文)熱による新規骨形成促進法の開発：マグネタイト微粒子の応用

研究課題名(英文) Establishment of a novel method for heat-stimulus induced osteogenesis using magnetite nanoparticles

研究代表者

西田 佳弘 (Yoshihiro, Nishida)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50332698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：熱により骨新生が促進されることをラットおよびラビットの動物実験系および ATDC-5、MC3T3細胞株を使用した *in vitro* 実験によって明らかにした。ラットにおいてアルギン酸ゲルにマグネタイトリポソーム微粒子を混合し、交番磁場下に1回加温することで旺盛な骨形成が得られた。加温材料をすでに臨床応用されている人工骨(ハイドロキシアパタイト)と鉄粒子を含んだ造影剤に変更し、ラット・ラビットにおいて複数回加温の骨新生促進効果を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：New bone formation was significantly increased by hyperthermia using magnetite cationic liposome embedded in alginate beads with an alternating magnetic field (AMF) in a rat tibial defect model. Heating materials were changed to Resovist containing ferucarbotoran and hydroxyapatite scaffold, which have been already approved in clinical use in Japan. Combination materials were grafted in tibial defect of rat and rabbit and subjected to the multiple hyperthermia in AMF. Results demonstrated that newly formed bone was observed in the grafted materials from the periphery toward the center, and more osteoclasts were found in the once a week hyperthermia group compared with non-hyperthermia group. Experiments of hyperthermia were performed *in vitro* using ATDC-5 and MC3T3 cells. Heat stress also induced enhanced alkaline phosphatase expression in cultured osteoblastic cells, MC3T3. On the other hand, heat stress had no obvious effects on chondrogenic differentiation using ATDC5 cells.

研究分野：整形外科学

キーワード：温熱療法 骨形成 動物モデル 人工骨 骨欠損

1. 研究開始当初の背景

(1)従来の方法とその限界

腫瘍切除後や外傷後の骨欠損、骨折治癒の遷延などに対して骨の新生を促進する方法が患者の運動器機能を向上するためには重要である。骨の新生を促進する方法としては、自家骨移植・他家骨移植・人工骨移植などの骨移植法、培養骨髄細胞移植、BMP などのサイトカインの使用、超音波治療などが臨床研究、応用されているが、骨新生能が十分とはいえない。申請者らは、骨新生における移植骨の有用性とともその限界を発表してきた。

(2)熱を発生することによる骨新生の促進

申請者らは、マグネタイト包埋リポソームを用いて生体内を効率的に加温する方法を開発し、悪性腫瘍に対する第Ⅰ相臨床試験を実施している。本試験を実施するにあたり、骨腫瘍分野でも実験的に本加温方法の有効性を示した。その準備段階の研究で、骨欠損にマグネタイト包埋リポソームを移植して加温すると骨形成が促進されることを見だし、骨新生に必要な「細胞」、「骨誘導能」及び「骨伝導能」の中で、熱刺激は、骨髄細胞を初めとする「細胞」、BMP 等の「骨誘導能」を使用せずに骨新生を刺激する可能性が高いことを発見した。

2. 研究の目的

(1)まだ国内・国外で報告されていない熱刺激による新規骨新生法の確立に向けて、基礎研究を行い、臨床試験へ発展させるため、骨形成に適切な加温条件の特定：至適温度、加温回数を *in vitro*, *in vivo* 実験で特定する。

(2)マグネタイト包埋リポソームを生体内に移植する際の適切なキャリアーの特定：マグネタイト包埋リポソームのみ、ハイドロキシアパタイト・各種ゲルなどのキャリアーとの組み合わせ実験にて適切なキャリアーを特定する。

(3)動物種による加温による骨形成の差を明らかにするため、ラットだけではなくウサギに関する骨形成能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)研究分担者(加藤)の協力により、マグネタイトリポソーム(MCL)を作成(36mg/ml、直径平均 10nm)。アルギン酸と MCL を混合しゲル化したものを加温材料とした。ラットの脛骨に円柱状(直径 3mm)の骨孔を作成し、そこに加温材料を移植。43, 44, 45, 46 加温群と非加温群に分けて交番磁場下に 15 分間加温。骨形成評価は軟 X 線とマイクロ CT を用いて、加温後 2 週、4 週、6 週で実施した。組織学的評価は加温後 2 週にて実施した。

と TRAP の発現を免疫組織学的に評価した。

(2)すでに臨床応用されている鉄粒子を含むリゾピスト(造影剤)と人工骨であるハイドロキシアパタイトを混合した加温材料を用いる実験を計画した。動物種はラットとウサギを使用し、45 加温、頻度は週 1 回と週 3 回とした。骨形成をマイクロ CT により評価した。また組織学的には新規骨形成を Villanueva-Goldner 染色、ALP 染色により、破骨細胞発現を TRAP 染色により評価した。また、加温による骨形成のメカニズムを解析するために、*in vitro* の実験として軟骨性骨化を示す ATDC-5 細胞と骨芽細胞分化を介して骨形成を示す MC3T3 細胞を加温し、骨形成を評価した。

4. 研究成果

(1)加温効率の評価と加温領域の決定

ラットおよびウサギ脛骨欠損モデル表面の温度は光ファイバプローブによって測定し、60-90 秒で効率よく、安定して加温されることを確認した(図 1)。また、周囲の軟部組織の温度は 41 以下であること、皮膚熱傷を含めた副作用の生じないことを確認した。

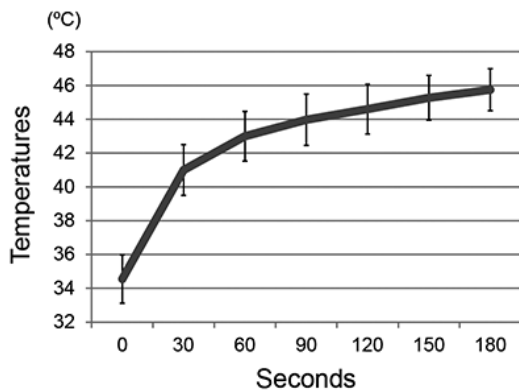
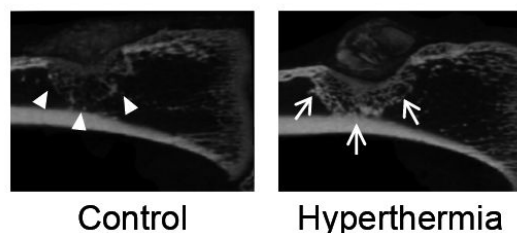


図 1. 交番磁場下における加温曲線

(2)ラット欠損モデルに対するアルギン酸ゲルと MCL を用いた加温による骨形成促進効果加温群、非加温群ともに骨欠損部に骨形成効果は見られたが、加温群では移植部周囲に旺盛な骨形成を認めた。加温 2 週後の評価を定量化すると、加温群全体と非加温群との間に有意差を認めた ($P=0.003$) (図 2)。



Control

Hyperthermia

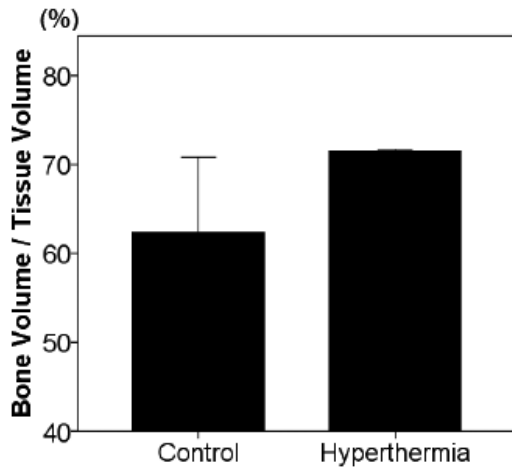


図 2. 加温 2 週後におけるマイクロ CT 評価

43-46 群それぞれで検定すると、特に 45 ($P=0.013$)と 46 ($P=0.031$)で非加温群との間に有意差を認めた。44 では P 値 0.087 であった。加温後 4 週後の評価では加温群全体と非加温群の比較では P 値 0.109、8 週後では P 値 0.868 を示し、加温から時間が経過するとともに骨形成促進効果が低減していた。HE 染色による組織学的評価では、43 -46 加温群すべてにおいて 2 週間の時点で加温部周辺に著明な骨新生を認めた (すべての群で $P<0.05$)。ALP 染色では非加温群と比べて加温群において加温部辺縁に著明な ALP 陽性染色を認め、TRAP 染色では、非加温群では加温部辺縁よりも骨新生部中心に ALP 陽性染色を認めた。Villanueva-Goldner 染色では、赤色に染まる類骨形成は加温群と非加温群で同等の陽性度であったが、緑色に染まる石灰化骨の領域は有意に加温群において増加していた ($P<0.01$) (図 3)。

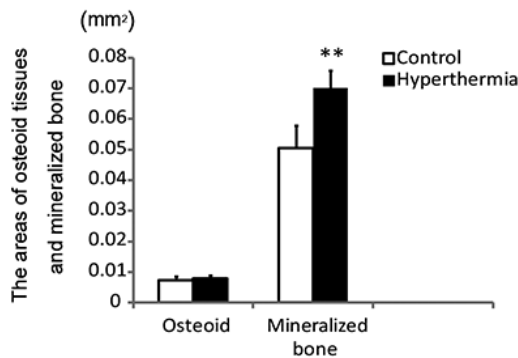


図 3. Villanueva-Goldner 染色による評価

(3) 臨床応用されている物質による加温材料の調整

鉄粒子を含み、すでに造影剤として臨床適用となっているリゾピストを、人工骨として臨床適用のあるハイドロキシアパタイト (リジェノス) に陰圧下で吸着させ、前段階実験において交番磁場下に有効に加温されることを確認した。

(4) (3) の加温材料を用いたラットモデルお

ける加温による骨形成

マイクロ CT 評価では、週 1 回加温群は非加温群と比較して、2 週の時点で有意に骨新生の増加を認めた。骨新生は主に移植ハイドロキシアパタイト周辺に見られたが、周辺には見られなかった (図 4)。

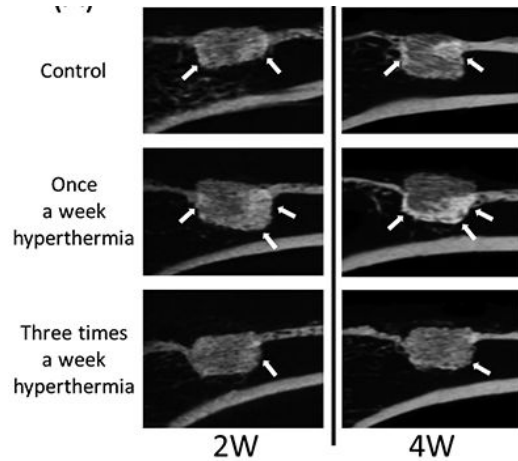


図 4. ラット加温による骨形成

週 3 回加温群は非加温 4 週の時点でも週 1 回加温群と非加温群との間に有意差を認めた。逆に週 3 回加温群では 4 週の時点で非加温群よりも骨新生は低下していた。

Villanueva-Goldner 染色では 2 週、4 週の両者において緑色に染まる石灰化骨の領域が週 1 回加温群で有意に増加していた。ALP と TRAP の二重染色では、加温群で ALP、TRAP 陽性細胞の有意な増加を認めた。

(5) (3) の加温材料を用いたウサギモデルにおける加温による骨形成

週 1 回加温群では非加温群と比較して、移植ハイドロキシアパタイト内に有意な骨形成増加を認めた。またラット加温モデルと異なり、ハイドロキシアパタイト内 ($P<0.05$) だ

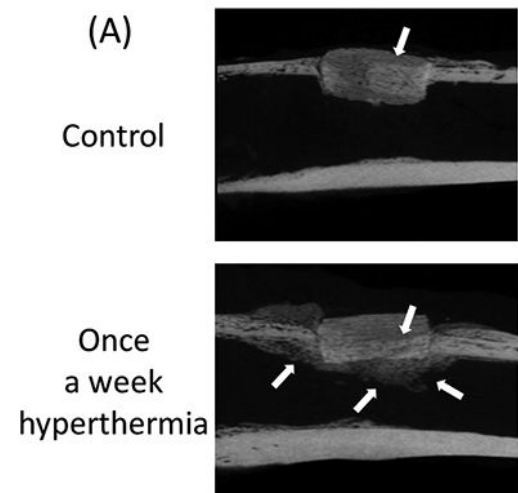


図 5. ウサギ加温による骨形成

けではなく、その周囲にも骨新生の増加を認めた (図 5) ($P<0.05$)。

Villanueva-Goldner 染色では、緑色に染まる石灰化骨だけではなく赤色に染まる類骨の領域についても非加温群と比較して加温分で増加していた。

(6) 骨芽細胞分化と内軟骨性骨化を示す MC3T3 細胞と ATDC-5 細胞に対する加温効果 MC3T3 細胞株に対する ALP 染色は培養後 7 日目より顕微鏡下に陽性染色が見られ、14 日目より肉眼的にも陽性染色が見られた。陽性染色領域を Image J によって定量化したところ、21 日目の評価で加温群 (41、43、45) において非加温群よりも有意に ALP 陽性染色を認めた ($P < 0.03$)。加温群の中では 45 処置群において高い ALP 陽性度を示した ($P = 0.001$ vs 非加温群)。内軟骨性骨化分化を示す ATDC-5 細胞株については、アルシアンブルー染色で軟骨細胞外マトリックス形成を評価した。41、43、45 のいずれの加温処置においてアルシアンブルー染色陽性度は非加温群と比較して上昇していなかった (加温 7 日後、14 日後、21 日後)。加温処置が細胞毒性を有するかの確認目的に MTS アッセイを処置開始後 3 週間まで評価した。いずれの加温群についても非加温群と比較して細胞増殖度に有意差を認めなかった。したがって、加温処置による新規骨形成は骨芽細胞の活性化を介して促進されることが示唆された。

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 1 件)

In vivo heat-stimulus-triggered osteogenesis.
Ikuta K, Urakawa H, Kozawa E, Hamada S, Ota T, Kato R, Honda H, Kobayashi T, Ishiguro N, Nishida Y.
Int J Hyperthermia. 2015 Feb;31(1):58-66.
doi: 10.3109/02656736.2014.988662.
査読有

[学会発表](計 6 件)

2017 Annual Meeting of Orthopedic Research Society,
San Diego (USA) 2017. 3. 19-22
Ota T, Urakawa H, Kozawa E, Ikuta K, Hamada S, Sakai T, Ishiguro N, Nishida Y.
Multiple heat stimuli enhanced osteogenesis of two species in vivo models.

第 30 回記念大会 東海ハイパーサーミア研究会 2016.7.23 名古屋市立大学医学部同窓会館 (愛知県名古屋市)
生田国大, 石黒直樹, 西田佳弘

温熱刺激による新規骨形成法 —臨床応用に向けて—

第 124 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 2015.4.10-11 ホテル日航金沢 (石川県金沢市)
生田国大, 浦川浩, 小澤英史, 濱田俊介, 石黒直樹, 西田佳弘
温熱刺激による新規骨形成促進法

2015 Annual Meeting of Orthopedic Research Society,
Las Vegas (USA) 2015. 3. 28-31
Ikuta K, Urakawa H, Kozawa E, Hamada S, Ishiguro N, Nishida Y.
In Vivo Heat-stimulus Triggered Osteogenesis.

中部地区 医療・バイオ系シーズ発表会 2014 年 12 月 10 日 ウィンクあいち (愛知県名古屋市)
西田佳弘
熱刺激による新規骨新生システム

第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 2014.10.9-10(Day2) 城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市)
生田国大, 浦川浩, 新井英介, 小澤英史, 二村尚久, 濱田俊介, 大田剛広, 石黒直樹, 西田佳弘
温熱刺激による新規骨形成促進法

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: 骨新生用組成物及び骨新生システム
Composition for new bone formation, and new bone formation system
発明者: 西田佳弘, 生田国大, 本多裕之, 加藤竜司, 小林猛
権利者: 国立大学法人名古屋大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2014/064920
出願年月日: 2014.6.5
国内外の別: 外国

取得状況 (計 1 件)

名称: 骨新生用組成物及び骨新生システム
Composition for new bone formation, and new bone formation system
発明者: 西田佳弘, 生田国大, 本多裕之, 加藤竜司, 小林猛
権利者: 国立大学法人名古屋大学
種類: 特許
番号: US 2016/0144032 A1
取得年月日: 2016.5.26
国内外の別: 外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 佳弘 (NISHIDA, Yoshihiro)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：5 0 3 3 2 6 9 8

(2) 研究分担者

小澤 英史 (KOZAWA, Eiji)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：6 0 6 3 5 5 7 2

新井 英介 (ARAI, Eisuke)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：4 0 6 1 2 8 4 1

生田 国大 (IKUTA, Kunihiro)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：4 0 7 3 2 6 5 7

加藤 竜司 (KATO, Ryuji)
名古屋大学・大学院創薬科学研究科・准教授
研究者番号：5 0 3 7 7 8 8 4

本多 裕之 (HONDA, Hiroyuki)
名古屋大学・予防早期医療創成センター・
教授
研究者番号：7 0 2 0 9 3 2 8