

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861195

研究課題名(和文)進化分子工学と先端接着技術による脆弱性骨折の予防・治療

研究課題名(英文) Treatment and prevention for fragility fracture using molecular evolution engineering and advanced adhesive technology

研究代表者

杉本 佳久 (Sugimoto, Yoshihisa)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：80423309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CBD-BMP4を用いて結合性改変BMPの生体内定着安定性、基材定着安定性の評価を行い、CBD-BMP4はBMP4単独よりもin vitroおよびin vivoともに明らかに良好な定着安定性を示した。

頭蓋骨に骨孔を作成したマウスと、ウサギの大腿骨にCBD-BMP4とBMP4を投与し、骨再生能を比較した。いずれにおいてもCBD-BMP4投与群で有意に良好な骨再生能を認めた。また、マウス大腿骨を用いたモデルにおいて、骨形成マーカーの発現をreal-time PCRで評価すると、ALPやosteocalcinにおいてCBD-BMP4投与群で有意に高い発現を認めた。

研究成果の概要(英文)：We have studied about treatment and prevention for fragility fracture using molecular evolution engineering and advanced adhesive technology. CBD-BMP4 showed significantly better fixing stability both in vitro and vivo than BMP4. We assessed bone regeneration using CBD-BMP4 and BMP4 within bone defect of mice and rabbits. CBD-BMP4 showed good bone regeneration. According to real-time PCR, CBD-BMP4 indicated higher expression in ALP and osteocalcin.

研究分野：整形外科

キーワード：生体材料 結合性改変成長因子 コラーゲン結合性ドメイン BMP

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢者の骨折や関節疾患は「寝たきり」へと移行する大きな要因である。高齢者では基礎疾患に骨粗鬆症を持っていることが多く、現状では投薬により骨粗鬆症の治療が行われているが、骨折後の骨癒合率の低下や偽関節が ADL を低下させ、問題となることも多い。

(2) 我々は骨折治療により有効な新しい材料を開発すべく、理化学研究所とも連携し、コラーゲンに対し特異的に結合する改変 BMP を開発した。

2. 研究の目的

(1) 骨折などの整形疾患において、BMP 等の成長因子は治療に非常に効果的に働く。しかし、これらの機能を十分に発揮させるには、まず患部にそれらの薬剤を留め、必要に応じて効果的に徐放させる技術を開発しなければならない。

(2) 本研究では、理化学研究所と岡山大学で共同開発した進化分子工学の手法を用いて創製する結合性改変成長因子といった先端接着材料を効果的に用いることにより、骨粗鬆症患者の骨折予防や骨折治療に有効な新しい骨組織再生・再建技術を開発することである。

3. 研究の方法

(1) CBD (collagen binding domain)-BMP4 の生体内定着安定性、基材定着安定性の評価として、in vitro ではコラーゲンゲル内に CBD-BMP4 あるいは通常の BMP4 を留置して、経時的にゲルから放出された CBD-BMP4 と BMP4 を測定した。In vivo ではウサギ大腿骨にコラーゲンスポンジとともに、蛍光標識した CBD-BMP4 あるいは BMP4 を注入し、経時的に評価した。

(2) 骨形成能の評価として、ウサギ大腿骨にコラーゲンスポンジによる scaffold とともに CBD-BMP4, BMP4 あるいは CBD や PBS を投与し、4 週後に μ -CT と組織標本で骨形成を評価した。また、マウス大腿骨においては scaffold なしで実験を行い、2 週後に蛍光標識で、4 週と 8 週後に μ -CT による評価を行った。また、マウスの頭蓋骨に骨孔を作成し、骨欠損部における骨再生能を μ -CT と組織学的に評価した。

(3) 骨形成マーカーの発現について CBD-BMP4 あるいは BMP4 をマウス的大腿骨に投与し、4 週後にその患部から骨髓細胞を採取し、ALP, bone sialoprotein (BSP), osteocalcin などの骨形成マーカーの発現について real-time PCR で評価した。

4. 研究成果

(1) In vitro では CBD-BMP4 は 7 日以上コラーゲンゲル内に留まることができたが、BMP4 単独では 1 日でそのほとんどがゲル外に放出されていた(図 1)。In vivo では CBD-BMP4 は 2 週間以上生体内の投与部位に留まることができたが、BMP4 単独では 3 日以内に生体内より消失した(図 2)。以上より CBD-BMP4 は BMP4 単独よりも in vitro および in vivo とともに明らかに良好な定着安定性を示した。

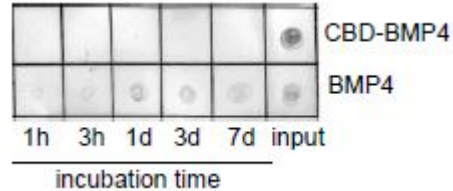


図 1 In vitro でのコラーゲンゲルからの CBD-BMP4 と BMP4 の放出

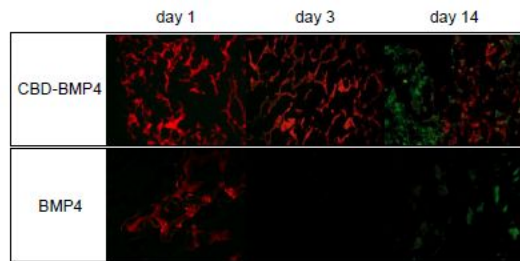


図 2 In vivo でのコラーゲンスポンジの蛍光標識像。赤：CBD-BMP4/BMP4 緑：骨組織

(2) ウサギ大腿骨においては、4 週後の μ -CT で CBD-BMP4 投与群はその他の群よりも有意に良好な骨形成能を示した(図 3)。

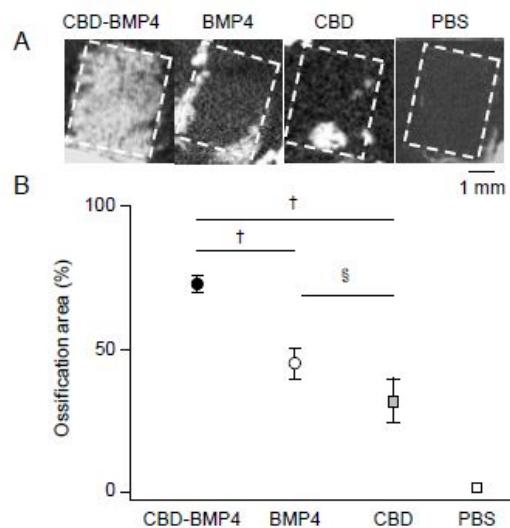


図 3 ウサギ大腿骨における μ -CT 像。
(A) 点線部：コラーゲンスポンジ
(B) スポンジ内の骨化領域

同様にウサギ大腿骨において、4 週後の組織標本で CBD-BMP4 投与群はその他の群よりも有意に良好な骨形成能を示した(図 4)。

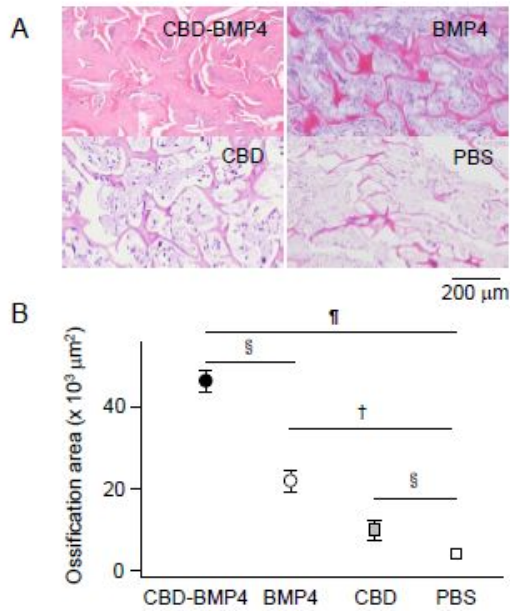


図 4 ウサギ大腿骨における組織標本。
(A) コラーゲンスポンジ部の HE 染色
(B) スポンジ内の骨化面積

マウス大腿骨において、2 週後の蛍光標識で CBD-BMP4 投与群はその他の群よりも有意に良好な骨形成能を示した(図 5)。

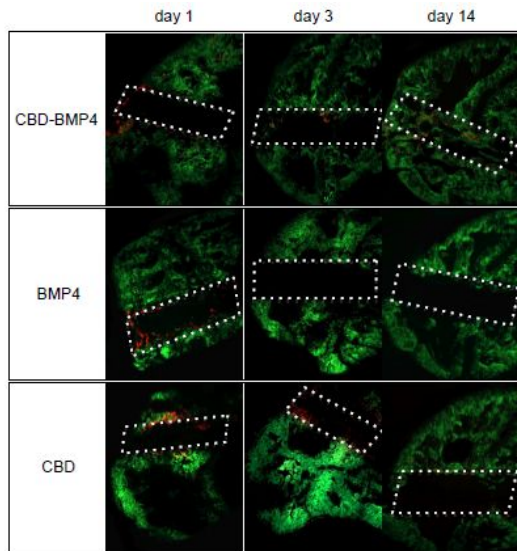


図 5 マウス大腿骨における蛍光標識像。
点線部：骨孔 赤：CBD-BMP4/BMP4/CBD
緑：骨組織

マウス大腿骨において、4 週と 8 週後の μ -CT での評価で CBD-BMP4 投与群はその他の群よりも有意に良好な骨形成能を示した(図 6)。

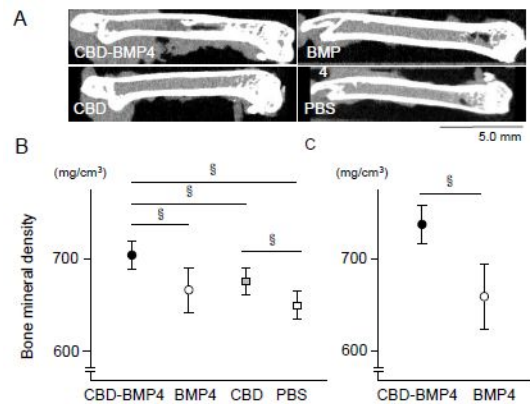


図 6 マウス大腿骨における μ -CT。
(A) 大腿骨矢状断
(B) 骨密度(4 週) (C) 骨密度(8 週)

マウス頭蓋骨欠損部において、2 週後の μ -CT と組織標本での評価で、CBD-BMP4 投与群はその他の群よりも良好な骨形成能を示した(図 7)。

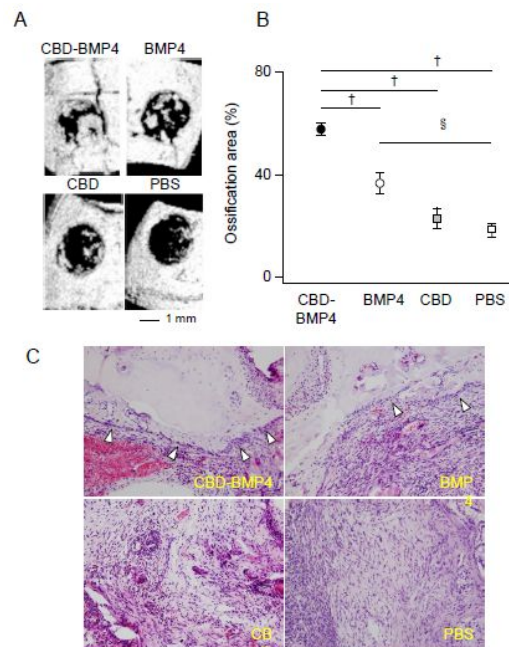


図 7 マウス頭蓋骨における CBD-BMP4 の骨形成能
(A) 3D-CT 像 (B) 骨化範囲 (C) HE 染色

(3) CBD-BMP4 投与群は BMP4 単独投与群よりも ALP, BSP, osteocalcin などが有意に高い発現を示した(図 8)。

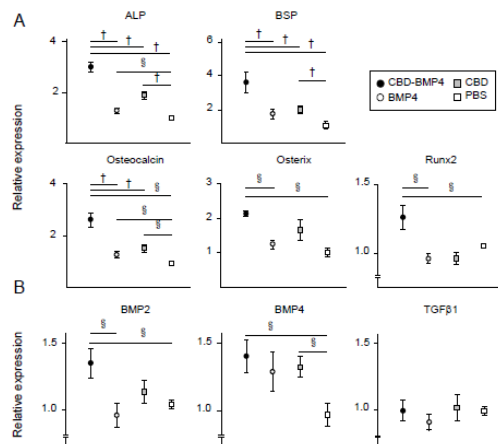


図 8 CBD-BMP4 による骨形成に関する遺伝子発現の亢進。
(A) 骨芽細胞関連因子
(B) 骨成長因子

6. 研究組織

(1) 研究代表者
杉本 佳久 (Sugimoto, Yoshihisa)
岡山大学 大学病院 助教
研究者番号: 80423309

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号:

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等