

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861209

研究課題名(和文) 経皮的脊椎圧迫骨折治癒促進シーズの探索

研究課題名(英文) Investigation of vertebral compression fracture healing methods

研究代表者

齋藤 亘(Saito, Wataru)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：60439099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前に細菌コラゲナーゼに存在するコラーゲン結合ドメインと塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の融合タンパク(CB-bFGF)とコラーゲン材料との併用によりマウス大腿骨骨折モデルにおける骨形成を促進できることを示した。本研究では、骨形成促進シーズの椎体圧迫骨折治療法への応用を試みた。コラーゲンパウダー(CP)あるいは粉砕脱灰骨(DBP)にCB-bFGFを用いてbFGFを結合させた後にラット椎体骨欠損モデルに投与した。CP/CB-bFGF、DBP/CB-bFGFはCP、DBP単独に比べ高い骨形成能を有していた。これらのマテリアルは椎体圧迫骨折の治癒促進に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We previously constructed a fusion protein consisting (CB-bFGF) of bFGF and the collagen binding domain (CBD) of Clostridium histolyticum collagenase and revealed that CB-bFGF markedly enhances bone formation in mouse femoral fracture model, suggesting that the combination of CB-bFGF with an collagen materials would promote vertebral fracture. Here, to attempt to apply the bone formation seeds to the vertebral fracute repair, we developed an injectable collagen powder (CP)/ CB-bFGF and demineralized bone powder (DBP)/CB-bFGF composite. CP/ CB-bFGF and BP/CB-bFGF composite accelerates bone formation in a vertebral bone defect model in rat and clearly showed that the composite also increases bone mineral density at fracture sites compared to CP and DBP alone. Our results suggest that CP/ CB-bFGF and DBP/CB-bFGF may be useful for promoting vertebral fracture healing in the clinical setting.

研究分野：運動器再生医療

キーワード：椎体骨折 塩基性線維芽細胞増殖因子 コラーゲン結合ドメイン コラーゲン結合型成長因子

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会に伴い骨粗鬆症に伴う脊椎圧迫骨折患者数は年々増加している。脊椎圧迫骨折は骨粗鬆症性骨折の中で最も発生率が高く米国では、年間 700,000 件発生(45 秒に 1 件発生)し、年間 260,000 人が最初の有痛性脊椎圧迫骨折の診断を受けると言われている。高齢者における骨折は脳血管疾患、高齢による衰弱に次ぐ寝たきり原因の 3 位であり、骨折後の死亡率は同年代の平均死亡率の約 2 倍になるとの報告もある。高齢化の進むわが国の 65 歳以上における骨折治療に要する年間医療費の総額は約 6000 億円と推測されており、この額は 65 歳以上の年間医療費の約 4%を占めている。従って高齢者の骨折治療法の確立は医学的、医療経済的、社会的に重要な意味を持つ。

これまでの基礎研究により、細菌性コラゲナーゼのコラーゲン結合ドメインを用いて塩基性線維芽細胞増殖因子を骨組織に結合することで、骨移植後の骨形成を促進できることを示した。さらに、局所注入可能なコラーゲンパウダーにコラーゲン結合型線維芽細胞増殖因子を結合後、投与することでマウス大腿骨骨折後の仮骨形成を促進できることを示した。しかし、椎体骨折に対する効果は明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は骨形成促進シーズを骨粗鬆症性椎体骨折治療法に応用すべく、ラット椎体骨折モデルに対する骨折治療促進効果を検討することである。

3. 研究の方法

(1)コラーゲンパウダーに対する CB-bFGF の結合性の検討

コラーゲンパウダー 5mg(CP)と 0.58 nmole の CB-bFGF を 4 で 60 分間反応させた。遠心後、上清を ELISA 法で分析することで骨組織と CB-bFGF の結合性を検討した。

(2)ラット椎対骨折モデルに対する CB-bFGF とコラーゲンパウダーの併用効果の検討

Wistar ラットの尾椎に 16G 針を用いて直径 1.7mm の骨欠損を作製した。5mg CP と CB-bFGF を 4 で 60 分間反応させ、CP/CB-bFGF 複合体を作製後、欠損部に投与した (CP/CB-bFGF 群)。また、比較対象として bFGF と CP を混合後、投与した群 (bFGF 群)、リン酸緩衝液 (PBS) と CP を混合後、投与した群 (CP/PBS 群) を作製した。欠損のみを作製した群をコントロールとして用いた (control 群)(n=10)。術後 14 日に検体を採取し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で 48 時間固定を行った。管電圧 90 kV、電流 108 μ A、ボクセルサイズ 25 μ m の条件でマイクロ CT 用を撮影後、画像解析ソフトを用いて新生骨体積 (mm^3)、骨塩量 (mg) を計測

した。

(3)脱灰骨パウダー/CB-bFGF 複合体の骨形成能の検討

骨組織にはコラーゲンに加え、骨形成タンパク (BMP) が存在する。bFGF と BMP の併用で相乗効果が得られることが知られていることから、脱灰骨パウダー/CB-bFGF は新規椎体骨折治療シーズと成り得ると考えた。骨組織をポリトロンで破碎後、脱灰することで局所投与可能な脱灰骨パウダー (DBP) を作製した。5mg DBP と CB-bFGF を 4 で 60 分間反応させ、DBP/CB-bFGF 複合体を作製後、骨折部に投与した (DBP/CB-bFGF 群)。また、比較対象として bFGF と CP を混合後、投与した群 (bFGF 群)、リン酸緩衝液 (PBS) と DBP を混合後、投与した群 (DBP/PBS 群) を作製した (n=10)。

4. 研究成果

(1)コラーゲンパウダーに対する CB-bFGF の結合性の検討

ELISA の結果、CP 1mg あたり 150 umoles の CB-bFGF が結合することが明らかになった。

(2)ラット椎対骨折モデルに対する CB-bFGF とコラーゲンパウダーの併用効果の検討

CP/bFGF 群は control 群、CP 群に比べ新生骨量、骨塩量ともに多かったが、有意な差は認められなかった。一方、CP/CB-bFGF 群における新生骨量、骨塩量は control 群、CP 群に比して有意に多かった (図 1,2)。

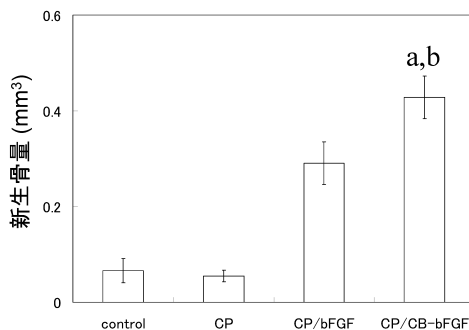


図 1. 投与後の新生骨量

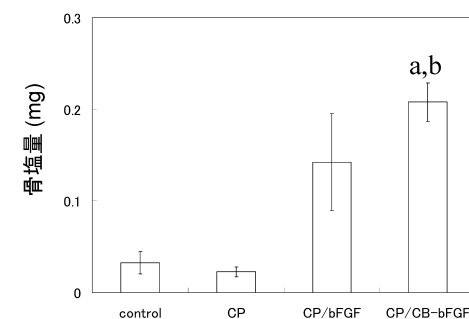


図 2. 投与後の骨塩量

(3)脱灰骨パウダー/CB-bFGF 複合体の骨形成

能の検討

DBP/bFGF 群, DBP/CB-bFGF 群は DBP 群に比べ有意に高い骨形成能を示した。また、DBP/CB-bFGF 群は DBP 群に比べ有意に新生骨量、骨塩量が多かった。

これらの結果から、コラーゲンパウダー、脱灰骨パウダーとコラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子複合体は椎体骨折治癒促進に有用である可能性が示唆された。

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 7 件)

1. Saito W, Mizuno K, Inoue G, Imura T, Nakazawa T, Miyagi M, Shirasawa E, Uchida K, Takaso M. Perioperative evaluation of respiratory muscle strength after scoliosis correction in Duchenne muscular dystrophy Asian Spine J, in press (査読有)
2. Saito W, Namba T, Inoue G, Imura T, Miyagi M, Nakazawa T, Shirasawa E, Uchida K, Takaso M. Spinal correction in patients with Fukuyama congenital muscular dystrophy. J orthop Sci, in press doi: 10.1016/j.jos.2017.02.005. (査読有)
3. Inoue G, Uchida K, Matsushita O, Fujimaki H, Saito W, Miyagi M, Sekiguchi H, Nishi N, Ohtori S, Yogoro M, Takaso M. Effect of Freeze-Dried Allograft Bone with Human Basic Fibroblast Growth Factor Containing a Collagen-Binding Domain From Clostridium Histolyticum Collagenase on Bone Formation After Lumbar Posterolateral Fusion Surgery in Rats, Spine, in press doi: 10.1097/BRS.0000000000002074. (査読有)
4. Sekiguchi H, Uchida K, Inoue G, Matsushita O, Saito W, Aikawa J, Tanaka K, Fujimaki H, Miyagi M, Takaso M. Acceleration of bone formation during fracture healing by poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀ and basic fibroblast growth factor containing polycystic kidney disease and collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum* collagenase., J Biomed Mater Res A, 104(6):1372-8, 2016 doi: 10.1002/jbm.a.35670. (査読有)
5. Fujimaki H, Inoue G, Uchida K, Miyagi M, Saito W, Sato A, Takaso M. Elevation of microglial basic fibroblast growth factor contributes to development of

neuropathic pain after spinal nerve ligation in rats. Spine, 41(3):E108-15, 2016 doi: 10.1097/BRS.0000000000001131. (査読有)

6. Saito W, Uchida K, Matsushita O, Inoue G, Sekiguchi H, Aikawa J, Fujimaki H, Takaso M. Acceleration of callus formation during fracture healing using basic fibroblast growth factor-kidney disease domain-collagen binding domain fusion protein combined with allogenic demineralized bone powder. J Orthop Surg Res, 10;59, 2015 doi: 10.1186/s13018-015-0201-0. (査読有)
7. Ueno M, Uchida K, Saito W, Matsushita O, Yogoro M, Nishi N, Ogura T, Hattori S, Inoue G, Tanaka K, Takahira N, Takaso M. Acceleration of bone union after structural bone grafts with collagen-binding basic fibroblast growth factor anchored-collagen sheet for critical-size bone defects. Biomed Mater, 9(3):035014, 2014 doi: 10.1088/1748-6041/9/3/035014. (査読有)

[学会発表](計 9 件)

1. 関口裕之、内田健太郎、井上玄、相川淳、齋藤 亘、宮城正行、松下治、藤巻寿子、高野昇太郎、名倉直重、高相晶士. 新規コラーゲン結合型線維芽細胞増殖因子による骨形成促進法の開発. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016 年 10 月 13-14 日, 福岡国際会議場 (福岡)
2. Fujimaki H, Inoue G, Uchida K, Miyagi M, Saito W, Takaso M. Nerve reconstruction with oriented collagen tubes combined with basic fibroblast growth factor. 43rd The International Society for the Study of the Lumbar Spine Annual Meeting, 2016 年 5 月 16-20 日, Singapore
3. 関口裕之、内田健太郎、井上玄、相川淳、齋藤 亘、宮城正行、藤巻寿子、大貫裕子、高相晶士. 人工コラーゲンゲルとコラーゲン結合型線維芽細胞増殖因子による骨折後の骨形成促進効果の検討. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015 年 10 月 22-23 日, 富山国際会議場 (富山)
4. 藤巻寿子、井上玄、内田健太郎、宮城正行、相川淳、齋藤 亘、関口裕之、高相晶士. コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた人工神経による末梢神経再生. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015 年 10 月 22-23 日,

富山国際会議場（富山）

5. 内田健太郎、松下 治、齋藤 亘、井上玄、高相晶士. 細菌分子によるマトリックスアンカーリング機構を応用した骨形成促進法の開発. 第 18 回北里微生物アカデミー研究集会, 2015 年 8 月 6 日, 北里大学 (相模原)
6. 内田健太郎、堀川恭佑、井上玄、松下 治、齋藤 亘、成瀬康治、藤巻寿子、占部憲、高相晶士. 線維芽細胞増殖因子アンカーリング間葉系細胞積層シートの骨形成能の検討. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2014 年 10 月 9-10 日, 城山観光ホテル (鹿児島)
7. 齋藤 亘、内田健太郎、井上玄、松下治、大貫裕子、藤巻寿子、関口裕之、相川 淳、高平尚伸、高相晶士. Bone Powder とコラーゲン結合型線維芽細胞増殖因子による骨折後の骨形成促進効果の検討. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2014 年 10 月 9-10 日, 城山観光ホテル (鹿児島)
8. 齋藤 亘、内田健太郎、井上 玄、松下治、大貫裕子、藤巻寿子、関口裕之、相川 淳、高平尚伸、高相晶士. Bone powder とコラーゲン結合型線維が細胞増殖因子による骨折後の骨形成促進効果の検討. 第 33 回日本運動器移植・再生医学研究会, 2014 年 9 月 24 日, 広島県医師会館 (東京).
9. Saito W, Uchida K, Ueno M, Matsushita O, Inoue G, Nishi N, Ogura T, Hattori S, Fujimaki H, Tanaka K, Takaso M. Acceleration of bone formation during fracture healing by injectable collagen powder and human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain from *Clostridium histolyticum* collagenase, APASTB/JSTT Combined Scientific Meeting 2014, 2014 年 8 月 27-29 日, 長良川コンベンションセンター (岐阜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 亘 (SAITO, Wataru)
北里大学・医学部・助教

研究者番号：60439099