

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861210

研究課題名(和文) 高密度コラーゲン材料と多血小板血漿を併用した新たな椎体固定法の開発

研究課題名(英文) Establishment of novel method for spinal fusion using bone allograft and collagen-binding basic fibroblast growth factor

研究代表者

井上 玄 (Inoue, Gen)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：80594209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：現在、脊椎領域では、長範囲矯正固定術などの侵襲の大きな手術が普及し、椎体の骨癒合不全は成績不良に直結する重大な問題となっている。本研究では確実に骨癒合を得る方法を模索すべく、高密度にコラーゲンを含む同種骨組織とコラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子(CB-bFGF)を用いた骨形成促進法の開発を行った。ラット後側方固定モデルを用いて検討を行った結果、CB-bFGFを結合させた同種骨は、同種骨単独に比べ高い骨形成能を有していることが明らかになった。また、組織学的検討から、CB-bFGF結合同種骨は軟骨形成促進を介して骨形成を促進していることが明らかになった。本方法は骨癒合促進に有用かもしれない。

研究成果の概要(英文)：In spinal surgery, allogenic bone is often applied to the fusion surgery. However, studies have shown that the use of allograft alone has limited efficacy for achievement of the bone fusion. In the present study, we developed an allogenic bone powder (BP) with basic fibroblast-derived growth factor containing a polycystic kidney disease domain (PKD) and collagen-binding domain (CBD) from *Clostridium histolyticum* collagenase (ColH) and investigated the stimulatory effects of bFGF-PKD-CBD combined with allogenic bone powder (BP) on bone growth in a rat lumbar posterolateral fusion surgery model. BP mixed with either PBS (PBS/BP) or 0.58 nmoles bFGF-PKD-CBD (bFGF-PKD-CBD /BP) was grafted into intertransverse space of rats lumbar spine. bFGF-PKD-CBD/ BP composite accelerates callus formation compared to PBS/BP in a rat lumbar posterolateral fusion surgery model. Our results suggest that bFGF-PKD-CBD/BP may be useful for promoting spinal bone fusion in the clinical setting.

研究分野：脊椎外科

キーワード：コラーゲン 同種骨 コラーゲン結合型成長因子

1. 研究開始当初の背景

現在、脊椎領域では、長範囲矯正固定術などの侵襲の大きな手術が普及し、椎体の骨癒合不全は成績不良と直結する重大な問題となっている。それに従い現在、脊椎手術において、確実に骨癒合を得る方法が模索されている。

2. 研究の目的

本申請研究において、コラーゲン材料を 3D 合成する技術を用い作成した人工コラーゲン scaffold に、骨癒合に有効に働く成長因子を豊富に含有した多血小板血漿あるいは分離血清を添加して行なう、新たな椎体固定法を検討する。また、人工コラーゲン scaffold と同種骨で作成した scaffold で骨癒合形態の違いを比較・検討し有効な固定法の確立を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

多血小板血漿と 3D コラーゲン scaffold (右図、図 1) による骨癒合法の確立を試みた。



図 1. 3D スカフォールド

しかし、多血小板血漿に含まれる成長因子量にバラつきがある点、3D スカフォールドへの成長因子吸着量が少ないことが明らかになった。そこで、同種骨を scaffold とした骨癒合促進法の確立を行った。

(1) 粉砕骨に対する CB-bFGF の結合性の検討

10 週齢 Wistar rat より大腿骨、脛骨を採取した。骨髄組織を除去後、クロロホルム/メタノールで 18 時間処理後脱脂乾燥骨を作製した。表面積を大きくし、結合量を高めるべ

く、骨組織の破砕を行った。粒度計を用いて粉砕骨の粒子径を測定した。2.5、5、20 mg の粉砕骨と 0.58 nmole の CB-bFGF を 4 で 30 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。

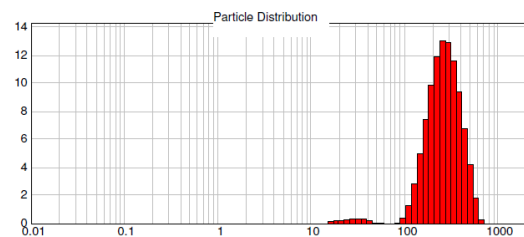
(2) ラット後側方固定術モデルに対する CB-bFGF と粉砕骨の併用効果の検討

Wistar ラットの両側 L4/5 横突起間に片側 150mg の凍結乾燥粉砕骨を移植し PLF を施行した。骨移植前に粉砕骨を PBS と混合した PBS 群と、CB-bFGF 150 µg と混合した CB-bFGF 群の 2 群を作成した (各 n=14)。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 µA、ボクセルサイズ 25 µm 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移植骨周囲の新生骨面積を計測した。非脱灰組織標本を作製して H-E、von Kossa、ALP 染色で評価した。

4. 研究成果

(1) 粉砕骨に対する CB-bFGF の結合性

作製した粉砕骨の平均粒子径は 280 µm であった(図 2)。上清中の CB-bFGF は反応させた粉砕骨量依存性に低下した(図 3)。ELISA の結果から粉砕骨 1mg あたり 0.025 nmole の



CB-bFGF が結合することが明らかになった。

図 2. 粉砕骨の粒度分布

X 軸：粒子径 (µm) Y 軸：体積 (%)

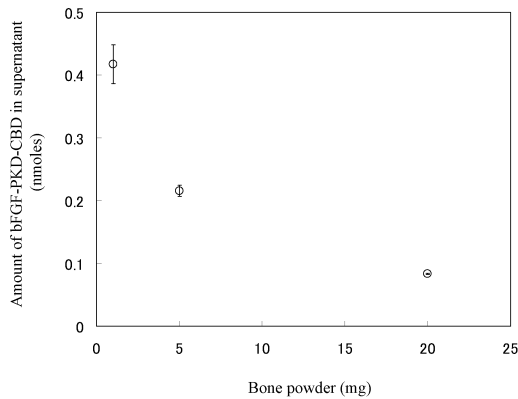


図3. コラーゲン結合試験

X軸：粉碎骨量 (mg) Y軸：結合量 (nmole)

(2) ラット PLF モデルに対するコラーゲン結合型 bFGF (CB-bFGF) と粉碎骨併用効果の検討

移植後 2 週の時点で CB-bFGF 群は PBS 群, 群に比べ多くの新生骨が形成された (図 4)。また、組織学的にも von kossa 陽性領域の新生骨増加が認められた (図 5)。また、CB-bFGF 群では移植 10 日後に旺盛な軟骨形成が認められた。これらの結果から、軟骨形成促進を介して可骨形成を促進している可能性が示唆された。移植骨への CB-bFGF を添加は、骨癒合促進に有用かもしれない。

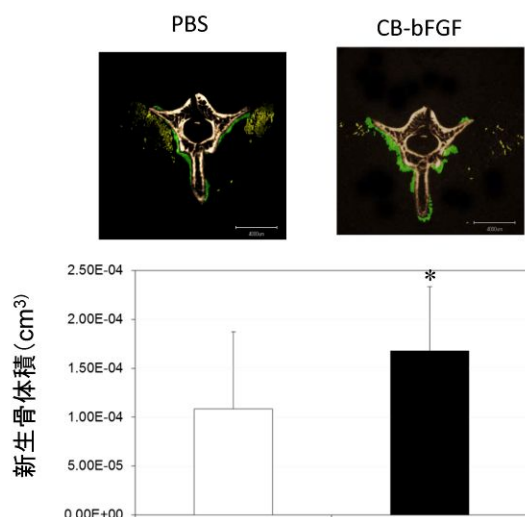


図4. 移植後 2 週の uCT 画像と新生骨量

PBS 群 CB-bFGF 群

既存骨を茶色、新生骨を緑で示した。

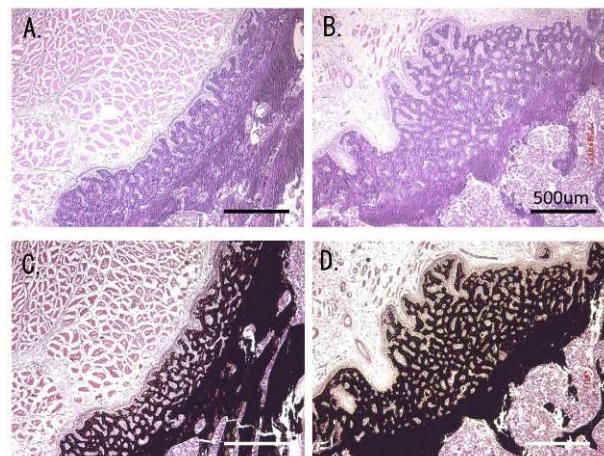


図5. 移植後 2 週の HE 染色、von Kossa 染色像

A-B) HE 染色像 A:PBS 群, B:CB-bFGF 群
C-D) Von Kossa 染色像 C:PBS 群, D:CB-bFGF 群

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11件)

Saito W, Inoue G, Nakazawa T, Imura T, Miyagi M, Uchida K, Namba T, Shirasawa E, Takahira N, Takaso M. Common iliac vein injury during L5-S1 posterior lumbar interbody fusion in a patient with systemic lupus erythematosus receiving steroid treatment: A case report, J Orthop Sci, in press (査読有)

Minato T, Miyagi M, Saito W, Shoji S, Nakazawa T, Inoue G, Imura T, Minehara H, Matsuura T, Kawamura T, Namba T, Takahira N, Takaso M. Spinal Epidural Hematoma after Thoracolumbar Posterior Fusion Surgery without Decompression for Thoracic Vertebral Fracture. Case Rep Orthop, 2016, doi: 10.1155/2016/6295817. (査読有)

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)

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)

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)

Kobori S, Miyagi M, Orita S, Gemba T, Ishikawa T, Kamoda H, Suzuki M, Hishiya T, Yamada T, Eguchi Y, Arai G, Sakuma Y, Oikawa Y, Aoki Y, Toyone T, Takahashi K, **Inoue G**, Ohtori S. Inhibiting I κ B kinase- β downregulates inflammatory cytokines in injured discs and neutropeptides in dorsal root ganglia innervating injured discs in rats. Spine (Phila Pa 1976), 39, 1171-1177, 2014. doi: 10.1097/BRS.0000000000000374. (査読有)

Inoue G, Ueno M, Nakazawa T, Imura T, Saito W, Uchida K, Ohtori S, Toyone T, Takahira N, Takaso M. Teriparatide increases

the insertional torque of pedicle screws during fusion surgery in patients with postmenopausal osteoporosis. J Neurosurg Spine, 21(3):425-31, 2014. doi: 10.3171/2014.5.SPINE13656. (査読有)

Sainoh T, Sakuma Y, Miyagi M, Orita S, Yamauchi K, **Inoue G**, Kamoda H, Ishikawa T, Suzuki M, Kubota G, Oikawa Y, Inage K, Sato J, Nakamura J, Aoki Y, Takaso M, Toyone, Takahashi K, Ohtori S. Efficacy of anti-nerve growth factor therapy for discogenic neck pain in rats, Spine (Phila Pa 1976), 39, E757-762, 2014. doi: 10.1097/BRS.0000000000000340. (査読有)

Inoue G, Takaso M, Miyagi M, Kamoda H, Ishikawa T, Nakazawa T, Imura T, Ueno M, Saito W, Uchida K, Toyone T, Takahashi K, Ohtori S. Risk factors for L5-S1 disk height reduction after lumbar posterolateral floating fusion surgery. J Spinal Disord Tech, 27(5), E187-92, 2014. doi: 10.1097/BSD.0000000000000088. (査読有)

Uchida K, Matsushita O, Naruse K, Mima T, Nishi N, Hattori S, Ogura T, **Inoue G**, Tanaka K, Takaso M., Acceleration of periosteal bone formation by human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain from *Clostridium histolyticum* collagenase, J Biomed Mater Res A, 102(6), 1737-43, 2014. doi:10.1002/jbm.a.34841. (査読有)

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, J Biomed Mater Res A, 102(9):3049-55, 2014.

doi:10.1002/jbm.a.34974. (査読有)

[学会発表](計 4件)

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、高相晶土. 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(富山県富山市)

Inoue G, Ueno M, Nakazawa T, Imura T, Saito W, Uchida K, Takahira N, Takaso M. The effectiveness of teriparatide for insertional torque pedicle screws in patients with postmenopausal osteoporosis, The 10th Meeting of the International Research Society of Spinal Deformities. 2014年6月29日-7月2日, Sapporo (Japan)

Fujimaki H, Inoue G, Uchida K, Sekiguchi H, Ueno M, Saito W, Takahira N, Takaso M. Effect of anti-bFGF neutralizing antibody on neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats, The 41th Annual Meeting of the International Society for the Study of the Lubmar Soine, 2014年6月3-7日, Seoul(Korea)

Inoue G, Uchida K, Fujimaki H, Sekiguchi H, Ueno M, Saito W, Nakazawa T, Imura T, Takahira N, Takaso M. Anti-bFGF neutralizing antibody reduces glial cell activation in dorsal horn in rats CFA-induced discitis, The 41th Annual Meeting of the International Society for the Study of the Lubmar Soine, 2014年6月3-7日, Seoul(Korea)

井上 玄 (INOUE, Gen)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号: 80594209

6 . 研究組織

(1)研究代表者