

平成 28 年 4 月 26 日

平成 27 年度独立行政法人日本学術振興会
藤田記念医学研究振興基金研究助成事業研究概要報告書

独立行政法人日本学術振興会理事長殿

研究者所属・職 大阪市立大学・講師
氏 名 大田 陽一

本助成事業による研究について、次のとおり報告します。

1. 研究課題名 骨髄内環境における骨形成タンパク (BMP) 誘導骨形成技術の開発 (英文名) Development of BMP-induced bone regeneration procedure in bone marrow area
2. 研究実施期間 平成 27 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日
3. 助成金額 1,000,000 円
4. 研究の目的 骨形成タンパク : BMP (bone morphogenetic protein) は生体内で骨形成を強力に誘導するサイトカインであり、欧米では脊椎固定等に限定的に臨床応用されている。しかし、一方では破骨細胞分化と骨吸収機能を促進することが報告されており、骨髄内環境においては造血幹細胞由来の破骨細胞前駆細胞が多く存在するという理由からその効果は不確実である。実際、整形外科領域において、椎体及び長管骨における骨髄内環境の破綻を引き起こす、脊椎椎体骨折や人工関節置換術後のゆるみによる骨欠損が起これると、慢性的な疼痛、歩行障害などによる日常生活活動 (ADL) が傷害され QOL が著しく低下し、治療も難治性となることが多い。特に、脊椎圧迫骨折の椎体形成や人工関節ステム周囲の骨欠損の対応など、骨髄内環境における骨再生は超高齢社会を迎えているなか、臨床上非常に重要な課題である。 そこで本研究では、BMP と骨吸収抑制効果を期待したビスフォスフォネートの composite material を作製し、現時点できわめて困難とされている BMP の骨髄内環境における骨形成能効果の確立及び骨髄内骨欠損治療法の開発を目的とした。 BMP 及びビスフォスフォネートの足場となる効果的な担体物質 (drug delivery system: DDS) は重要である。本研究では、①β-リン酸三カルシウム (β-TCP) は BMP 及びビスフォスフォネート各々の DDS として有用であることがこれまで報告されていること②β-TCP は優れた骨伝導性を持つ骨補填生体材料で、良好な生体親和性を持ち生体内で吸収される特徴があることから、これら BMP/ビスフォスフォネート/β-TCP の複合体により骨髄内環境において必要な部位、局所に必要な量の骨形成を得ることが可能ではないかと着目した。BMP/ビスフォスフォネート/β-TCP - composite material の骨形成に関して、まずは髄外環境での評価を行い、最終的には髄内環境における評価を行うことを目標として研究を行った。

5. 研究概要報告

β-TCP を用いた BMP とビスフォスフォネート併用投与異所性骨形成モデルの作製、 骨髄外環境における BMP/ ビスフォスフォネート / β-TCP - composite material の骨形成評価

直径 6mm、高さ 2mm の β-TCP 円盤状ペレットを乾熱滅菌処理した後、rh-BMP2 (5μg) 及びビスフォスフォネート製剤として Zoledronic acid (ZOL; 2μg, 10μg) を β-TCP 円盤状ペレットに混合共浸潤吸着後、生後 4 週齢 ICR マウスの背筋膜内に埋植し、それら ZOL による BMP 誘導異所性骨形成に対する影響を術後 3 週、6 週及び長期モデルとして 12 週にて評価した。

軟 X 線において、ペレット周囲の異所性骨形成に加えて BMP 単独投与群 (control 群) では経時的にペレット内部に X 線の透過性亢進が認められた。一方、BMP/ZOL 共投与群では内部の明らかな透過性亢進は認められなかった。μCT による解析の結果、骨密度測定では、control 群では術後 12 週において有意に骨密度の低下が認められた (* : p<0.01) のに対し、BMP/ZOL 共投与群では骨密度の低下を認めず全期間において骨密度は維持されていた (図 1)。三次元的骨梁構造の解析においても、control 群では術後 12 週において有意に BV/TV の低下が認められた (* : p<0.05) が、BMP/ZOL 共投与群では術後 12 週までの全期間において BV/TV は維持されていた (図 2、図 3)。組織学的評価では control 群に比べて BMP/ZOL 共投与群ではペレット内部の新生骨形成の増加が認められた。TRAP (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase) 染色の結果では、TRAP 陽性細胞数は術後 3 週、特に 6 週、12 週で control 群に比べて BMP/ZOL 共投与群で有意な減少を認めた (図 4)。

図 1

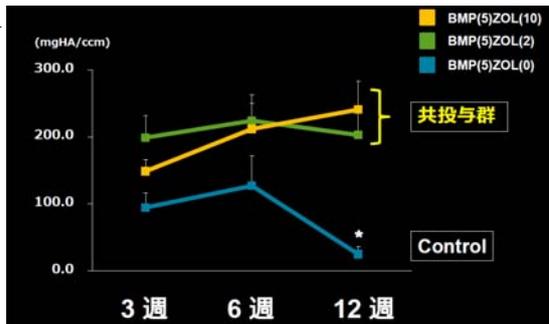


図 2

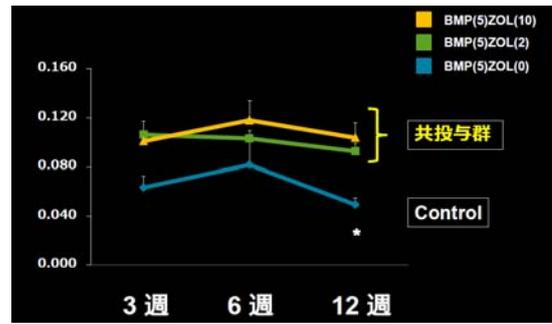


図 3

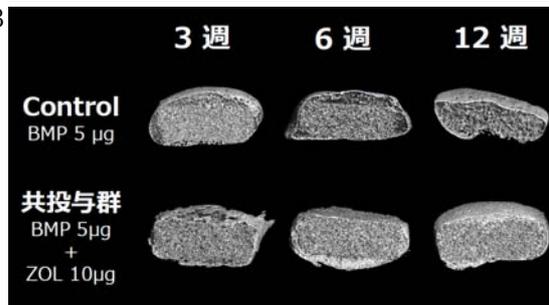
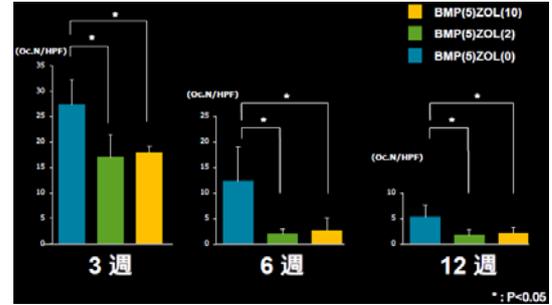


図 4



ZOL の局所共投与を行うことにより、BMP 誘導新生骨形成の増強効果が認められ、新生骨内部の骨量は術後 12 週においても維持されていた。それは局所での破骨細胞機能抑制効果によるものが考えられた。BMP/ZOL/β-TCP-composite は破骨細胞前駆細胞が多く存在する骨髄内環境においてもその効果が期待できる可能性があることが考えられた。

次に、実際の骨髄内環境における BMP 及びビスフォスフォネートの局所共投与における効果を検証するため、直径 6mm、高さ 10mm の円柱状 β-TCP を乾熱滅菌処理した後、rh-BMP2 (30μg) 及び ZOL (60μg) を混合共浸潤吸着後、生後 18 週 New Zealand White ラビット (メス) の左大腿骨顆部を径 6.2mm までドリリングし β-TCP を髄内に埋植し、ZOL による骨髄腔内 BMP 誘導骨形成に対する影響を検討した。X 線撮影の結果、骨髄内において ZOL 非投与群では術後 6 週において β-TCP - composite の X 線透過性が認められ、composite を含め吸収されていることが考えられたが、ZOL 投与及び BMP/ZOL 共投与群では β-TCP - composite 部位の X 線陰影は残存していた。composite 部位における三次元的骨梁構造を組織学的評価とともに解析をすすめている。

6. 研究成果の発表について

独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業の英文称：
「JSPS Fujita Memorial Fund for Medical Research」

研究者所属・職 大阪市立大学 整形外科・講師
氏 名 大田 陽一

○論文発表 発表者名、テーマ名、発表誌名・巻号、発刊年月を記入してください。
また、別刷り2部を必ず添付してください。

○口頭発表 発表者名、テーマ名、会合名、発表年月日を記入してください。

- Koichi Ichikawa, Yoichi Ohta, Kenji Mamoto, Shigekazu Mizokawa, Yukihide Minoda, Yuuki Imai, Kunio Takaoka, Hiroaki Nakamura. Local Co-application of Zoledronate Has Efficacy for Long Term Maintenance of New Bone Formation Induced by Bone Morphogenetic Protein 2. Orthopaedic Research Society 2016 Annual Meeting
2016年3月5日～2016年3月8日

○著 書 著者名、出版社名、刊行年月日、共著または単著の別を明記してください

注：

- (1) 研究成果を学会誌等で発表する場合には、独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業による助成を受けた旨を必ず明記して下さい。
また、その別刷り2部を「研究概要報告書」と共に必ず提出して下さい。
- (2) 本基金の助成に係る代表的な論文、口頭発表及び著書にはタイトルの前に○を付けて下さい。