

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名            黒田 晃義



論 文 題 目

Effect of Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)/Hydroxyapatite/In Situ-Formed Hyaluronan Hydrogel Composites on Bone Formation in a Murine Model of Posterolateral Lumbar Fusion

(マウス腰椎後側方固定術モデルにおける骨形成タンパク質 2/ハイドロキシアパタイト/局所硬化ヒアルロン酸ハイドロゲル複合体が骨形成に及ぼす影響)

指 導 教 授 承 認 印

高相 勝士



# Effect of Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)/Hydroxyapatite/In Situ-Formed Hyaluronan Hydrogel Composites on Bone Formation in a Murine Model of Posterolateral Lumbar Fusion

(マウス腰椎後側方固定術モデルにおける骨形成タンパク質 2/ハイドロキシアパタイト/局所硬化ヒアルロン酸ハイドロゲル複合体が骨形成に及ぼす影響)

氏 名 黒田 晃義

---

## 【背景】

腰椎後側方固定術 (PLF) は、脊椎固定術の一般的な術式であるが、強固な固定のためには骨融合を促進するためにボーンストックを追加する必要がある。ボーンストックには自家骨や同種骨、人工骨などがある。しかし、自家骨は移植による免疫反応の心配がなく、局所的に採取できるが、骨採取部位の疼痛などの合併症を伴う。同種骨は供給源が限られている。整形外科領域では人工骨として合成ハイドロキシアパタイト (HAP) や  $\beta$ -リン酸三カルシウム ( $\beta$ -TCP) などのリン酸カルシウム (CaP) 系生体材料がしばしば採用される。CaP の組成や微細構造は、骨組織に酷似しておりより骨形成に期待できるが、CaP の骨誘導活性は限定的であるため、骨環境が不活性な移植部位では骨形成が不良になることがある。

骨形成タンパク質 2 (BMP-2) は、間葉系前駆細胞 (MPC) の骨芽細胞系への誘導と分化を促進し、骨基質を形成する骨誘導タンパク質である。BMP-2 は、米国食品医薬品局 (FDA) により承認され、骨治療薬として広く使用されている。脊椎手術の椎体間固定術においても吸収性コラーゲンスポンジ (ACS) 上に BMP-2 を投与する方法が用いられている。さらに、PLF でも、骨形成を促進する目的で BMP-2 を送達する様々な CaP キャリアが報告されている。しかし、これらの CaP 担体では初期に BMP-2 が大量放出されることで、臨床においては骨形成を減少させなどの副作用を誘発する可能性がある。

この問題を克服するために、コラーゲン、デキストラン、プルラン、ヒアルロン酸(HA)などの天然多糖類から構築される in situ 形成ハイドロゲル (IFH) に着目した。IFH は水溶液中で過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) と西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) の酸化的カップリング反応により硬化する。これまでの研究において、HA から構築された IFH (IFH-HA) は、骨折や骨欠損部位において BMP-2 の徐放が可能であることを報告した。しかし、BMP-2 と CaP を組み合わせた場合の効果については、まだ不明な点が多く残されている。そこで今回は、IFH-HA を用いた HAP に BMP-2 を導入し、BMP-2/IFH-HA/HAP 複合体の PLF モデルマウスにおける骨形成への影響を検討した。

#### 【方法】

HA-TA (Hyaluronan-Tyramine) コンジュゲートを作成し、HAP (10 mg) を 0.8 units/mL HRP と 2  $\mu\text{g}$  BMP-2 を含む 2% HA-TA polymer solution 中に沈めた。硬化反応を開始するために、BMP2/HA-TA/HRP 溶液中の HAP に 4mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加した。対象として BMP2/HA-TA/HRP 溶液中の HAP に  $\text{H}_2\text{O}_2$  の代わりに PBS を添加し硬化させない群と、PBS に HAP を加えたのみの control 群を作成した。

C57BL/6J マウス (10 週齢) の第 6-7 肋骨突起間 (右側) に上記 3 群を充填し、PLF モデルとした。術後 4 週で屠殺し  $\mu\text{CT}$  画像を撮影した。

また、 $\mu\text{CT}$  解析後、組織切片を作成しマッソン・トリクローム染色を行い、第 6-7 肋骨突起間の新生骨の評価をした。

#### 【結果】

Control 群および BMP2/HA-TA 群では、術後 4 週目に骨癒合を認めなかった、(癒合率、Control 群、0/10 ; BMP2/HA-TA 群、0/10)。一方、BMP2/IFH-HA 群では肋骨突起 6 と 7 の間に新たに形成された骨と骨結合が認められた。骨量は、control 群および BMP2/HA-TA 群と比較して、BMP2/IFH-HA 群で有意に増加した。さらに、

BMP2/IFH-HA 群では、BMP2/HA-TA 群と比較して骨塩量が増加していた。

組織学的検査では、 $\mu$ CT の結果と同様に、BMP-2/IFH-HA 群で多くの新生骨が認められたが、BMP-2/HA-TA 群および Control 群ではほとんど確認されなかった。

### 【考察】

ACS への BMP-2 投与は椎体間固定術では一般的な治療である。PLF においても BMP-2/ACS を  $\beta$ -TCP と HAP からなる合成骨で包んだものは自家海綿骨移植より優れた効果の報告もある。今回、PLF のマウスモデルを用いて BMP2/HAP/IFH-HA 複合体と BMP-2/HAP/TA-HA 複合体の骨形成促進に対する有用性を比較した。IFH-HA/HAP/BMP-2 複合体が脊椎固定を補強するための新しい治療法となる可能性を示唆された。

骨再生過程の初期段階における BMP2 シグナルの活性化は、炎症と MPC の活性化を引き起こし、MPC の骨芽細胞分化に極めて重要な役割を果たしている。このことは、BMP2 の一定濃度での継続的な放出が、移植部位の骨形成を早めるために有用である可能性を示唆している。in vitro であるが IFH-HA は 14 日間にわたり血小板由来の成長因子を放出し続け MPC の増殖を促進する報告があるが、同様に我々は IFH-HA が in vitro で 14 日間継続的に BMP2 を放出することを過去に報告している。これらのことから、BMP2/HAP/IFH-HA コンポジットは、BMP-2 を放出し続けることができるため、高い骨誘導能を有する可能性が示唆された。

### 【結論】

PLF のマウスモデルにおいて、BMP2/ヒドロキシアパタイト複合材と組み合わせたヒアルロン酸から構築された in situ 形成ハイドロゲルの骨形成における評価を行った。BMP2/HAP と IFH-HA からなる複合体は、PLF のマウスモデルにおいて新生骨形成を促進し、脊椎固定術の増強に有効であることが示唆された。