

学 位 論 文 要 旨

氏 名 齊 藤 亘



論 文 題 目

「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」

(Injectable collagen 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)

指 導 教 授 承 認 印

高 相 鼎 士



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

氏 名 齋藤 亘

【目的】

年間発生する骨折のうち 5-10%が偽関節もしくは遷延癒合に至ることが報告されている。その結果、骨変形や関節変形などをきたし、著しい機能障害に陥る可能性がある。そのため、BMP-2 や bFGF などの成長因子を脱灰骨やコラーゲンなどのキャリアーに吸着させて移植し、骨癒合を促進する研究が行われている。しかし、成長因子と結合させたキャリアーを局所に移植するためには局所を大きく展開する必要があることが問題であった。近年我々は、細菌性コラゲナーゼからコラーゲン結合ドメインを単離し、これをアンカーとした成長因子（コラーゲン結合性成長因子:Collagen Binding-bFGF, CB-bFGF）を作製することに成功した。さらに、CB-bFGF をコラーゲンシートに結合させてラットの大腿骨上に移植することで骨形成を促進することを示した。そこで今回我々は、局所に低侵襲で投与可能な injectable collagen powder (ICP)をキャリアーとした CB-bFGF/ICP 複合材料による骨折後の骨形成促進法の有用性を検討した。

【方法】

材料：Recombinant human bFGF は、科研製薬から購入したものを用いた。ICP はニッピバイオマトリックス研究所より提供を受けた。CB-bFGF は岡山大学医歯薬学総合研究所病原細菌学より提供を受けた。コラーゲン結合試験：0、5、10、15mg のコラーゲンパウダーと 30 μ g の CBD を混合後、上清を SDS-PAGE 法で分析することで ICP とコラーゲン結合ドメイン (CBD)の結合性を検討した。骨形成促進能の検討：10 齢 C57BL/6J マウスの左大腿骨骨幹部中央で 0.22mm サージカルワイヤーを用いて骨切りし、骨折モデルを作成した。大腿骨顆部から逆行性に髄内針を用いて固定したのち、骨折部に CB-bFGF を結合させた ICP を投与した (CP/CB-bFGF 群)。CP/CB-bFGF 群は 0.58nmol と 0.058nmolCB-bFGF を結合させた CB-bFGF 濃度の異なる 2 群を作成した。同様の手技で、リン酸緩衝液 (PBS) と混合させた ICP のみ投与した CP/PBS 群と、ICP と bFGF を混合させた CP/bFGF 群を作成し、これらをコントロール群とした。マウスは手術直後より制限なく歩行を許可し、骨折後 2 週、4 週、6 週で屠殺し大腿骨を摘出した。 μ CT を用いて仮骨量および骨塩量を計測し、比較検討した。

【結果】

コラーゲン結合試験：ICP の用量依存性に上清中の CBD が低下したことから、ICP と CBD の強い結合性が示された。骨形成促進能の検討：0.058nmolCP/CB-bFGF 群は、4 週の時点においてコントロール群との間に骨形成量、骨塩量の差は認められなかったが、0.58nmolCP/CB-bFGF 群は、4 週の時点においてコントロール群に比較し有意に骨形成量、骨塩量が多かった。さらに、6 週の時点における骨形成量、骨塩量は 0.058nmolCP/CB-bFGF 群、0.58nmolCP/CB-bFGF 群の両群においてコントロール群よりも有意に多かった。

【考察】

コラーゲンは、高い汎用性と生体適合性を持ち、免疫原性が低いことから骨形成における最良のキャリアの一つである。これまで、局所に移植可能なコラーゲン材料が骨折の修復に有用であることが数多く報告されてきた。しかし、コラーゲンと成長因子は親和性が低いこと、移植に際し骨折部に侵襲が加わることが問題点として考えられていた。我々は、これらの問題を解決すべく、低侵襲で局所に注入可能な形状であるコラーゲンパウダー(ICP)に CB-bFGF を結合させた新規マテリアル作製を試みた。本研究により、CBD の ICP への結合試験において良好な結合性が確認された。さらに、マウス大腿骨骨折部に作製した CB-bFGF/ICP 複合マテリアルを局所投与することで骨形成促進効果が認められた。このことから、CB-bFGF/ICP 複合マテリアルにより低侵襲骨折治療が実現できる可能性が示唆された。

bFGF は有効な骨形成能を有するが、局所投与後は体液循環や血流によって速やかに拡散するため局所効果を得るためには多量の成長因子が必要であることが報告されている。しかし、大量の bFGF 投与は副作用や発癌性のリスクを増加させることから、使用する bFGF の低用量化は必須である。本研究では約 1/10 濃度の CB-bFGF で bFGF と同等の骨形成能を得ることが証明された。安全性の面からも CP/CB-bFGF は臨床応用可能なマテリアルであると考えられた。