

学位論文

「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」

(コラーゲン様ポリペプチド poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ とコラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子による骨形成促進法の開発)

DM14011 関口 裕之

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程

臨床系学群 整形外科学

指導教授名 高相 晶士

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

論文要旨

目的：高齢化に伴い骨折患者数は年々増加している。骨折は寝たきりの原因の上位にあげられ、高齢者骨折に伴う寝たきりは認知症や肺炎など、重篤な合併症を引き起こす。また、我が国の交通事故負傷者数は、70万人にもものぼる。交通外傷後の骨折は、骨折治癒に必須な軟部組織や骨膜損傷を伴うため極めて難治性であり長期に渡る治療は患者に肉体的・精神的苦痛を与える。従って、高齢者骨折や、交通外傷後の難治性骨折に対する骨折治癒促進法開発は極めて重要である。bFGF (塩基性線維芽細胞増殖因子) は骨形成を促進することが知られているが、体内では速やかに拡散することや、高用量の使用は、腎毒性、悪性腫瘍活性化などの副作用を伴う可能性があることから、局所での徐放システムの開発が重要である。コラーゲンは最も一般的に使用されている担体であるが、動物由来コラーゲンの使用は、BSEなどの未知の感染の可能性など副作用の危険性が懸念されている。poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ は、Pro-Hyp-Glyのコラーゲンに特異的な3重螺旋構造を有しているコラーゲン様ポリペプチドである。CBD は、Pro-Hyp-Gly に特異的に結合することが報告されている。過去に、マウス大腿骨骨折モデルにおいて、ブタ由来のI型アテロコラーゲンとクロストリジウム属由来のコラーゲン結合 bFGF (bFGF-s2b-s3) の組み合わせで骨形成を促進することが報告されている。poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ と bFGF-s2b-s3 の併用による安全性の高い骨形成促進法の確立を行った。一方、Clostridium histolyticum は class I collagenase (ColG), class II collagenase (ColH) を発現し、class I collagenase (ColG) のC末端には2つのCBD (s3a s3b) が存在する。class II collagenase のC末端には、PKD domain (s2b) CBD (s3) が存在する。そこで、これら PKD、CBD をアンカーに持つ4種類のコラーゲン結合型 bFGF を作製し、コラーゲン結合型 bFGF の最適化を図った。さらに、骨折部の骨膜損傷を伴う難治性骨折モデルを作成し poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ と最適化したコラーゲン結合型 bFGF を、難治性骨折モデルに投与し有用性を検討した。

方法：3つの実験を行った。1. まず、高齢者を模擬した骨折モデルを作成した。骨折治癒が遅延することが知られている10ヶ月齢 C57BL/6J マウスを用いて、大腿骨骨幹部骨折モデルを作成した。(ワイヤーソーを用い大腿骨骨幹部で骨切りし、膝顆部から逆行性にステンレス釘で骨折部を固定した。) 骨折部に、PBS (コントロール)、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3

を添加後、マイクロ CT を用いた骨量 (Bone volume, BV)、骨塩量 (bone mineral content, BMC) の計測および組織学的検討 (HE 染色) を行った。poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ の特性を調べるために CD スペクトル、レーザーミクロンサイザーを用いて、熱耐性、粒子径を測定した。2. 次に、4 種類のコラーゲン結合型 bFGF の最適化を行った。9 週齢 C57BL/6J マウスを用いて、大腿骨骨幹部骨折モデルを作成した。骨折部に PBS (コントロール)、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3b、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b を添加後、マイクロ CT 解析、組織学的検討を行った。In vitro として Biacore を用いてコラーゲンペプチドに対する結合能を測定した。また、10 週齢の SD ラットの顆部内外側から、骨膜を採取し、コラーゲナーゼ処理を行ったのちに、得られた細胞を培養後、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3b、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b を添加し、WST-assay にて細胞増殖能の評価を行った。3. 最後に、9 週齢 C57/BL6J マウスを用いて、骨折部周囲骨膜を障害させた難治性大腿骨骨幹部骨折モデルを作成した。(骨幹部をワイヤーソーで骨切りし、ステンレス釘で膝顆部から逆行性に固定したのちに、骨折部周囲 3 mm を電気メスで焼却した。) 骨折部に PBS (コントロール)、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b を添加後、マイクロ CT、X 線撮影を行い骨形成促進効果、骨癒合改善効果を評価した。結果：1. CD スペクトル、レーザーミクロンサイザーからコラーゲン様ポリペプチド (poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀) は高い熱耐性、細かい粒子径を有していた。また、マイクロ CT の結果から、骨折後 4 週において、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 は poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF よりも有意に骨形成能 (BV, BMC) が高かった。組織学的評価では骨折後 2 週において、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 は、骨折部周囲に大きな軟骨形成を認めた。2. 4 種類のコラーゲン結合型 bFGF の骨形成促進効果の比較では、マイクロ CT において、骨折後 4 週で、CBD を二つ持つ poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b が最も骨形成能 (BV, BMC) が高かった。組織学的評価では、骨折後 2 週で、他群に比較して仮骨内に大きな軟骨形成を促進した。WST-assay の結果から bFGF/s3a-s3b は骨膜に存在する PMCs (periosteal mesenchymal cells) の増殖能が高かった。Biacore の結果から、ColG 由来の poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3b は、ColH 由来の poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 に比較して、コラ

ーゲン様ポリペプチドとの結合が約 10 倍高かった。3. また、難治性大腿骨骨幹部骨折モデルの実験では、マイクロ CT にて、骨折後 4 週後で、

poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b は BV BMC とともに有意に高値を認めた。骨癒合率は、骨折後 2 週、4 週で有意差はなかったが、6 週ではコントロール (PBS) 20% に対して、(poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b) 60% と骨癒合率を改善させた。

考察：コラーゲン様ポリペプチド (poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀) は高い熱耐性、細かい粒子径を有していた。また、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ と bFGF-s3a-s3b の組み合わせは高齢者を模擬したマウス骨折モデルにおいて、軟骨形成促進を介して骨形成を促進した。このことから、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ とコラーゲン結合型 bFGF の組み合わせは動物由来コラーゲンをを用いない骨形成促進法として有用である可能性が示唆された。さらに、4 種類のコラーゲン結合型 bFGF の比較では bFGF-s3a-s3b は他のコラーゲン結合型 bFGF よりもコラーゲン様ポリペプチドと強固に結合し、骨膜に存在する間葉系細胞の増殖能が最も高いことが明らかになった。このことから poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 は骨折部において、骨折部周囲の骨膜における間葉系細胞の増殖を促し、軟骨形成を促進することで骨形成を促進する可能性が示唆された。難治性骨折モデルに対し、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b を投与すると、骨折部周囲の骨形成促進、骨癒合率の改善を認めた。poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b は骨膜欠損部の外側の正常骨膜に作用し、大きな軟骨形成、新生骨形成を促すことで、骨折部周囲の新生骨の架橋を促し、骨癒合率を改善する可能性が示唆された。

結語：poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ とコラーゲン結合型 bFGF の組み合わせ、特に poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b は高い骨形成作用を持ち、マウス大腿骨骨折モデルやマウス大腿骨難治性骨折モデルにおいても有用であることが示唆された。これらの新規材料は今後骨折治療戦略において、有用な選択肢の一つとなる可能性があると考えられた。

目次

1. 序論	-----	1
2. 方法		
2-1	bFGF, コラーゲン結合型 bFGF, poly (Pro-Hyp-Gly) ₁₀ の生成	----- 2
2-2	円偏光二色性	----- 2
2-3	粒子径測定	----- 3
2-4.1	大腿骨骨折モデル作成 (10 ヶ月齢マウス)	----- 3
2-4.2	新生骨量と骨塩量の定量的評価	----- 3
2-4.3	組織学的評価	----- 4
2-4.4	統計学的評価	----- 4
2-5	コラーゲン様ミニペプチドの作成	----- 4
2-6	コラーゲン結合試験 (BIACORE)	----- 4
2-7	4 種類のコラーゲン結合型 bFGF の生成	----- 5
2-8	細胞増殖試験	----- 5
2-9.1	大腿骨骨折モデル作成 (9 週齢マウス)	----- 5
2-9.2	新生骨と骨塩量の定量的測定	----- 6
2-9.3	組織学的評価	----- 6
2-9.4	統計学的評価	----- 7
2-10.1	難治性大腿骨骨折モデルの作成	----- 7
2-10.2	新生骨と骨塩量の定量的評価	----- 7
2-10.3	骨癒合評価	----- 8
2-10.4	統計学的評価	----- 8
3. 結果		
3-1.	poly (Pro-Hyp-Gly) ₁₀ の形態的特徴	----- 8
3-2.	高齢者骨折モデルにおける poly (Pro-Hyp-Gly) ₁₀ /bFGF-s2b-s3 の 骨形成効果 (In vivo)	----- 9
3-3.	組織学的評価	----- 9
3-4.	4 種類のコラーゲンアンカーの結合力評価	----- 9
3-5	4 種類のコラーゲン結合型 bFGF の生物学的活性評価	----- 10
3-6	骨折モデルにおける 4 種類のコラーゲン結合型 bFGF の骨形成評価 (In vivo)	----- 10
3-7	組織学的評価	----- 10
3-8	難治性骨折モデルにおける poly (Pro-Hyp-Gly) ₁₀ /bFGF-s3a-s3b の 骨形成評価 (In vivo)	----- 11

3-9	難治性骨折モデルにおける poly (Pro-Hyp-Gly) ₁₀ /bFGF-s3a-s3b の	11
	骨癒合率評価	
4.	考察	11
4-1	高齢者骨折モデルにおける poly (Pro-Hyp-Gly) ₁₀ /bFGF-s2b-s3 の	
	骨形成促進効果	11
4-2	4 種類のコラーゲン結合型 bFGF の骨形成促進効果	12
4-3	難治性骨折モデルにおける poly (Pro-Hyp-Gly) ₁₀ /bFGF-s3a-s3b の	
	骨形成効果、骨癒合率改善効果	14
5.	総括	14
6.	今後の課題	15
7.	謝辞	15
8.	引用文献	16
9.	業績目録	23
10.	図表説明	26

1. 序論

現在、我が国は超高齢社会を迎えて、それに伴い、骨折患者数は上昇している。骨折後、約 5-10%で遷延癒合や偽関節に陥ることが報告され、筋骨格系の機能障害を引き起こすことがある。¹⁾ また、交通事故負傷者は年間 70 万にものぼる。交通外傷後骨折は、組織損傷、骨膜損傷を伴い、極めて難治性である。骨折は寝たきりの原因の第 4 位にあげられ、難治性骨折に対する治療法の開発は重要である。

Basic fibroblast growth factor (bFGF) の骨折部への局所投与は骨折治癒を促進することが知られている。²⁻⁵⁾ bFGF は骨折後早期に骨膜上に発現し、骨芽細胞や軟骨細胞増殖を促進する。^{3, 6-9)} しかしながら、高用量の使用は副作用（腎毒性、悪性腫瘍活性化）を伴うことがあるため、bFGF の局所での徐放システムの開発が必要である。¹⁰⁻¹⁴⁾ コラーゲンは多様性や、生体適合性、低い免疫応答性などから、bFGF や bone morphogenic protein-2 (BMP-2)、その他の成長因子の担体として最も優れているものの一つである。¹⁵⁻¹⁹⁾ 動物由来コラーゲンは骨折治癒にはよく使用されているものであるが、未知の感染や免疫学的リスクなどの副作用が懸念されており、人体に親和性のある担体の開発が望まれている。²⁰⁻²¹⁾

Pro-Hyp-Gly はコラーゲンに特異的なアミノ酸配列である。(Pro-Hyp-Gly)₁₀ は最も広く知られているコラーゲン様ペプチドであり、安定した 3 重螺旋構造を有している。²²⁻²³⁾ poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ は高分子量のコラーゲン様ポリペプチドである。また、(Pro-Hyp-Gly)_n は動物モデルにおいて創傷治癒を促進する²⁴⁻²⁷⁾ といった報告や、(Pro-Hyp-Gly)₅ は in vitro において、薬剤の徐放に有用であるといった報告がある。²⁸⁾ このことから、(Pro-Hyp-Gly)_n 由来のポリペプチドが骨折治癒における成長因子の担体になりうる可能性がある。しかしながら、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ が bFGF の担体に適しているかということは不明である。過去にマウス大腿骨骨折モデルにおいて、ブタ I 型アテロコラーゲンと Clostridium histolyticum 由来のコラーゲン結合ドメイン (CBD) と bFGF の融合タンパク (bFGF-s2b-s3) の組み合わせで骨形成を促進することが報告されている。²⁹⁾ s2b-S3 は ((Pro-Hyp-Gly)₁₀)₃ と特異的に結合することが報告されている。³⁰⁾ 今回、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ と bFGF-s2b-s3 の併用により、安全性の高い骨形成促進法の確立を行った。

Clostridium histolyticum は class I collagenase (ColG), class II collagenase (Col H) を発現し、これらのコラゲナーゼは 3 種類のドメイン、catalytic (s1)、polycystic kidney disease (PKD, s2)、collagen binding domains (CBD, s3) からなる。Class I collagenase の C 末端には

2つのCBD (s3a s3b)が存在する。Class II collagenaseのC末端にはPKD domains (s2b)、CBD (s3)が存在する。^{31 32)} Col1G由来のCBDを二つ有する galectin-9-s3a-s3bは、Col1H由来の galectin-9-s2b-s3よりも結合力が強いことが報告されている。³³⁾ そこで、PKD、CBDをアンカーに持つ、4種類のコラーゲン結合型bFGFを作成し、マウス大腿骨骨折モデルに投与し、コラーゲン結合型bFGFの最適化を行った。

さらに、マウス大腿骨骨折部の骨膜損傷を伴う難治性骨折モデルを作成した。poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀最適化したコラーゲン結合型bFGFを難治性骨折モデルに投与し、有用性を検討した。

2. 方法

2-1. bFGF, コラーゲン結合型bFGF, poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀の生成

遺伝子組み換えヒトbFGFは科研製薬 (Tokyo, Japan) から購入した。ペプシン可溶性ウシI型コラーゲンは株式会社ニッピ (Tokyo, Japan) より購入した。コラーゲン結合型bFGF (bFGF-s2b-s3)は岡山大学大学院医歯薬学研究科病原細菌学分野 松下治博士より提供を受けた。

poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀はPHG (Tokyo, Japan) より購入した。

2-2. 円偏光二色性

poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀の形態的特徴を明らかにするために、円偏光二色性 (CD) を用いた。poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀を4℃ 5 mM 酢酸溶液で24時間透析を行った。15分間の遠心後CD分析前に0.1 mg/ml濃度に調節した。20℃と80℃において、波長190-250 nmの円偏光二色性スペクトルをCDスペクトロスコープ (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) を用いて測定した。コントロールとして、ペプシン可溶性ウシI型コラーゲンをを用いて、20℃と50℃において、円偏光二色性スペクトルを行った。また、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀とペプシン可溶性ウシI型コラーゲンの波長220 nmでのモル楕円率を測定した。

2-3. 粒子径測定

10mg/ml の poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ とペプシン可溶性ウシ I 型コラーゲンをレーザーマイクロサイザー LM-30 (Seishin, Tokyo, Japan) を用いて測定を行った。(D10、D50、D90 は累積サイズ分布でそれぞれ 10%、50%、90% になる粒子径を示している。)

2-4.1 大腿骨骨折モデル作成 (10 ヶ月齢マウス)

poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ とコラーゲン結合型 bFGF (bFGF-s2b-s3) の効果を調べるために実験を行った。すべての手技は北里大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。高齢マウスは骨形成が遅延することが知られており、過去の報告と同様に、10 ヶ月齢雄性 C57/BL6J マウスを用いて骨折モデルを作成した。^{34,35)} 10 ヶ月齢雄性 C57/BL6J マウスは日本チャールズリバー (Yokohama, Japan) から購入した。イソフルラン吸入後、ドミトール、ベトルファール、ミダゾラムを 3:1:1 で混合した三種混合麻酔薬を筋肉内に投与し、麻酔下で大腿骨骨折モデルを作成した。マウスの左脚の膝蓋骨内側部に約 4 mm の皮切を置き、膝蓋骨を脱臼させた。0.5 mm 径ドリルで大腿骨顆間部から逆行性にドリリングし、0.2 mm タングステンガイドワイヤーを挿入した。骨切りは、左大腿部皮膚を 1 cm 切開し、大腿骨を露出し、大腿骨骨幹部で 0.2 mm サージカルワイヤーソー (RIS system) を用いて行った。0.2 mm タングステンガイドワイヤーを抜去したのち、逆行性に 0.5 mm 径ステンレススクリューを挿入し、骨切り部を固定した。骨折モデルを作成後、骨折部には、リン酸緩衝液 (PBS コントロール)、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀、0.058 nmoles bFGF (0.058 nmoles poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF)、0.058 nmoles bFGF-s2b-s3 (0.058 nmoles poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3) を添加した。(各 n=8) コラーゲン結合型 bFGF 濃度はコラーゲン材料と bFGF-s2b-s3 を用いた過去の研究を参考にした。²⁹⁾

2-4.2 新生骨量と骨塩量の定量的評価

マウスは 4 週で屠殺後、周囲の筋肉とともに大腿骨を採取した。大腿骨は 4% パラホルムアルデヒドに 48 時間つけて固定後、PBS に置換した。大腿骨の μ -CT (inspeXio SMX-90CT; ShimaDzu, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。撮影条件は、acceleration voltage, 90 kV; current, 110 mA; voxel size, 1024×1024 である。

解析範囲は大腿骨中央から 10 mm の範囲 (500 スライス) とした。撮影後、callus volume (CV; 新生骨量) と Bone Mineral Contents (BMC; 骨塩量) を 3D イメージ解析ソフト (Tri-3D-Bon; Ratoc System Engineering, Tokyo, Japan) を用いて行った。³⁶⁾ 今研究では 300 mg/cm³ の骨密度を持つ骨を新生骨と定義した。

2-4.3 組織学的評価

poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 の骨形成促進メカニズムを調べるために、組織学的検討を行った。各群 (PBS, poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀, poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF, poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3) で、大腿骨骨折モデルを作成後、2 週後に屠殺し、大腿骨を採取した。20%EDTA 溶液で 28 日間脱灰を行った。脱灰後、パラフィン包埋し、3 μm で切片を作成した。組織学的評価のために、HE (hematoxylin and eosin) 染色を行った。

2-4.4 統計学的評価

コントロール群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ 群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF 群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3) 群における新生骨量と骨塩量の比較には、一元配置分散分析、多重比較 (Fisher's LSD 法) 検定を用いた。P 値が 0.05 以下を有意差ありとした。統計解析ソフトは SPSS Ver 11 (IBM, Chicago, America) を用いた。

2-5. コラーゲン様ミニペプチドの作成

今回、コラーゲン結合試験で使用したコラーゲン様ミニペプチドは早稲田大学先進理工学部 科学・生命科学科 小出隆規博士より提供を受けた。

2-6. コラーゲン結合試験

コラーゲンアンカー (s3a-s3b, s3b, s2b-s3, s3) と前述のコラーゲン様ミニペプチドの結合は、BIACORE 装置 (Biacore, Uppsala, Sweden)³⁸⁾ を用いて解離係数 (Kd) を測定した。

2-7. 4種類のコラーゲン結合型 bFGF の生成

今回使用した4種類のコラーゲン結合型/bFGF-s3, bFGF-s2b-s3, bFGF-s3b, bFGF-s3a-s3b は、岡山大学大学院医歯薬学研究科病原細菌学分野 松下治博士より提供を受けた。【図 5】

2-8. 細胞増殖試験

10 週齢雄性 Wistar rats の大腿骨遠位から骨膜を採取した。採取した骨膜は 0.2% I 型コラーゲナーゼ溶液中 (Wako Pure Chemical) で 37 °C 2 時間酵素 (コラーゲナーゼ) 処理を行った。酵素処理後の細胞懸濁液を 40 μ m のセルストレーナーで濾過し、骨膜細胞 (periosteal mesenchymal cell; PMCs 1×10^4 cells/cm²) を得た。PMCs を 6well plate に播種後、10%ウシ胎児血清を含む α -minimum essential medium (α -MEM) 培地も用いて 37 °C、7 日間培養した。7 日後、0.25% トリプシン-EDTA 溶液で処理し、得られた PMCs (1.25×10^3 cells/cm²) を 96-well plates 上 (BD Falcon, NJ, USA) で α -MEM 培地を用いて培養した。濃度が 0 (コントロール), 0.1 pM, 1 pM, 10 pM である bFGF, bFGF-s3, bFGF-s2b-s3, bFGF-s3b, bFGF-s3a-s3b で PMC s 細胞を刺激し、細胞増殖活性を WST-8 kit (Nacalai Tesque, Tokyo, Japan) を用いて評価した。統計学的評価には、一元配置分散分析、多重比較 (Fisher's LSD 法) 検定を用いた。P 値が 0.05 以下を有意差ありとした。統計解析ソフトは SPSS Ver 11 (IBM, Cicago, America) を用いた。

2-9.1 大腿骨骨折モデル作成 (9 週齢マウス)

次に、4種類のコラーゲン結合型 bFGF の最適化の実験を行った。すべての手技は北里大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。9 週齢雄性 C57/BL6J マウスを用いて骨折モデルを作成した。9 週齢雄性 C57/BL6J マウスは日本チャールズリバーから購入した。前述のように、イソフルラン吸入後、0.2 ml の三種混合麻酔薬を筋肉内に投与し、麻酔下で大腿骨骨折モデルを作成した。マウスの左脚の膝蓋骨内側部に約 4mm の皮切を置き、膝蓋骨を脱臼させた。0.5 mm 径ドリルで大腿骨顆間部から逆行性にドリリングし、0.2 mm タングステンガイドワイヤーを挿入した。骨切りは、左大腿部皮膚を 1 cm 切開し、大腿骨を露出し、大腿骨骨幹部で 0.2 mm サージカルワイヤーソー (RIS system) を用いて行った。0.2 mm タングステンガイドワイヤーを抜

去したのち、逆行性に 0.5mm 径ステンレススクリューを挿入し、骨切り部を固定した。骨折モデルを作成後、骨折部には、リン酸緩衝液 (PBS コントロール)、0.058 nmoles bFGF (0.058 nmoles poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF)、0.058 nmoles bFGF-s3 (0.058 nmoles poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3)、0.058 nmoles bFGF-s2b-s3 (0.058 nmoles poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3)、0.058 nmoles bFGF-s3b (0.058 nmoles poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3b)、0.058 nmoles bFGF-s3a-s3b (0.058 nmoles poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b) を添加した。(各 n=8) コラーゲン結合型 bFGF 濃度はコラーゲン材料と bFGF-s2b-s3 を用いた過去の研究を参考にした。²⁹⁾

2-9.2 新生骨量と骨塩量の定量的測定

マウスは 4 週で屠殺後、周囲の筋肉とともに大腿骨を採取した。大腿骨は 4%パラホルムアルデヒドに 48 時間つけて固定後、PBS に置換した。大腿骨の μ -CT (inspeXio SMX-90CT; ShimaDzu, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。撮影条件は、acceleration voltage, 90 kV; current, 110 mA; voxel size, 1024×1024 である。解析範囲は大腿骨中央から 10 mm の範囲 (500 スライス) とした。撮影後、CV、BMC を 3D イメージ解析ソフト (Tri-3D-Bon; Ratoc System Engineering, Tokyo, Japan) を用いて行った。³⁶⁾ 今研究では 300 mg/cm³ の骨密度を持つ骨を新生骨と定義した。

2-9.3 組織学的評価

poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b の骨形成促進メカニズムを調べるために、組織学的検討を行った。各群 (PBS, poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF, poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3, poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3, poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3b, poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b) で、大腿骨骨折モデルを作成後、2 週後に屠殺し、大腿骨を採取した。20%EDTA 溶液で 28 日間脱灰を行った。脱灰後、パラフィン包埋し、3 μ m で切片を作成した。組織学的評価のために、HE (hematoxylin and eosin) 染色を行った。

2-9.4 統計学的評価

コントロール群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF 群, poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3 群, poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 群, poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3b 群, poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b 群) における新生骨量と骨塩量の比較には、一元配置分散分析、多重比較 (Fisher's LSD 法) 検定を用いた。P 値が 0.05 以下を有意差ありとした。統計解析ソフトは SPSS Ver 11 (IBM, Chicago, America) を用いた。

2-10.1 難治性大腿骨骨折モデルの作成

最後に難治性大腿骨骨折モデルを作成し、実験を行った。すべての手技は北里大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。9 週齢雄性 C57/BL6J マウスを用いて骨折モデルを作成した。9 週齢雄性 C57/BL6J マウスは日本チャールズリバーから購入した。前述のように、イソフルラン吸入後、0.2 ml の三種混合麻酔薬を筋肉内に投与し、麻酔下で大腿骨骨折モデルを作成した。マウスの左脚の膝蓋骨内側部に約 4mm の皮切を置き、膝蓋骨を脱臼させた。0.5 mm 径ドリルで大腿骨顆間部から逆行性にドリリングし、0.2 mm タングステンガイドワイヤーを挿入した。骨切りは、左大腿部皮膚を 1 cm 切開し、大腿骨を露出し、大腿骨骨幹部で 0.2 mm サージカルワイヤーソー (RIS system) を用いて行った。0.2 mm タングステンガイドワイヤーを抜去したのち、逆行性に 0.5 mm 径ステンレススクリューを挿入し、骨切り部を固定した。骨切り部を固定したのち、バイポーラ電気手術器を用いて、骨切り部周囲骨膜を全周性に 3 mm 焼却した。骨折部には、PBS (コントロール)、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀、0.058 nmoles bFGF (0.058 nmoles poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF)、0.058 nmoles bFGF-s2a-s3b (0.058 nmoles poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b) を添加した。(各 n=8) コラーゲン結合型 bFGF 濃度はコラーゲン材料と bFGF-s2b-s3 を用いた過去の研究を参考にした。²⁹⁾

2-10.2 新生骨と骨塩量の定量的評価

マウスは 2, 4, 6 週で屠殺後、周囲の筋肉とともに大腿骨を採取した。採取した大腿骨は 4%パラホルムアルデヒドに 48 時間固定後、PBS に置換した。大腿骨の μ -CT (inspeXio SMX-90CT; ShimaDzu, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。撮影条件は、acceleration voltage, 90 kV; current, 110 mA; voxel size, 1024×1024 である。

解析範囲は大腿骨中央から 10 mm の範囲 (500 スライス) とした。撮影後、新生骨と骨塩量を 3D イメージ解析ソフト (Tri-3D-Bon; Ratoc System Engineering, Tokyo, Japan) を用いて行った。³⁶⁾ 今研究では 300 mg/cm³ の骨密度を持つ骨を新生骨と定義した。

2-10.3 骨癒合評価

マウスを 2, 4, 6 週で屠殺、 μ CT 撮影後、レントゲン撮影を行った。

レントゲンは 2 方向撮影をおこなった。骨癒合判定は、複数の整形外科医師によって行った。2 方向中、一か所でも架橋がみられるものを骨癒合と判定した。

2-10.4 統計学的評価

コントロール群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ 群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF 群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b 群における新生骨量と骨塩量の比較には、二元配置分散分析、多重比較 (Fisher's LSD 法) 検定を用いた。また、各群での骨癒合率の比較は、Fisher's Exact Test を用いた。P 値が 0.05 以下を有意差ありとした。統計解析ソフトは SPSS Ver 11 (IBM) を用いた。

3. 結果

3-1. poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ の形態的特徴

CD スペクトルの結果では、ペプシン可溶性ウシ I 型コラーゲンで 20 °C において、コラーゲンに特徴的な特徴的な 220 nm 付近で極大がみられた。50 °C で処理すると、220 nm 付近の極大は消失した。一方、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ では、80 °C で処理しても、220 nm 付近での極大は、消失しなかった。【図 1 (A B C)】このことから、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ は高い熱耐性を持つことが示唆された。

粒子径を計測してみると、ペプシン可溶性ウシ I 型コラーゲンで、D10, D25, D50, D75, D90 でそれぞれ 86.25, 128.50, 200.70, 308.88, 434.93 μ m であった。poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ は、D10, D25, D50, D75, D90 で、それぞれ 49.85, 75.01, 114.96, 172.05, 237.79 μ m であった。【図 2】

3-2. 大腿骨骨折モデルにおける poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 の骨形成効果 (In vivo)

高齢者を模擬した大腿骨骨折モデルにおける、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ とコラーゲン結合型 bFGF の骨形成効果を μ CT (4 週) で評価した。【図 3 (A B C D)】4 週での 3D 画像で、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 群で最も大きな新生骨形成を認めた。また poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ 群は 4 週で PBS 群に比較して、有意に CV の増加を認めたが、BMC は有意差がなかった。poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF 群は PBS 群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ 群に比較して、有意に CV の増加を認めたが、BMC に関しては、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ 群と比較して有意差がなかった。poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 群は、PBS 群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ 群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF 群と比較して、CV、BMC ともに有意に高値を認めた。【図 3 (E F)】

3-3. 組織学的評価 (HE 染色)

マウス骨折モデルでは、骨折後、約 14 日で軟骨形成が起こることが報告されている。³⁸⁾ poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 の新生骨形成促進のメカニズムを調べるため、骨折後 14 日目の組織学的検討を行った。poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF で大きな軟骨形成を認めた。【図 4】poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF 群では骨折部周囲に線維芽組織を認めたが、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 群では認められなかった。以上より、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 群は軟骨形成を促進することが示唆された。

3-4. 4 種類のコラーゲンアンカーの結合力評価

4 種類のコラーゲンアンカー (s3a-s3b, s3b, s2b-s3, s3) とコラーゲン様ミニペプチド ((H-Gly-Pro-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₁₂-NH₂) の解離係数を表面プラズモン共鳴を用いて測定した。【表 1】 s2b-s3 は s3 よりも解離係数が低かった。また、ColG アンカー (s3a-s3b, s3b) は ColH アンカー (s2b-s3, s3) に比べて、約 10 倍解離係数が低かった。以上より、ColG アンカーは ColH アンカーよりも強固にコラーゲンペプチドと結合することが示唆された。

3-5. 4種類のコラーゲン結合型 bFGF の生物学的活性評価

4種類のコラーゲン結合型 bFGF の生物学的活性を調べるために、ラット骨膜細胞増殖試験を行った。【図 6】 0.1pM では bFGF-s3a-s3b を添加した群ではコントロール群 (α -MEM) に比較して有意に PMCs の増加を認めた。一方、bFGF, bFGF-s3, bFGF-s2b-s3, bFGF-s3b を添加した群では明らかな増加を認めなかった。1, 10 pM では bFGF, 4種類のコラーゲン結合型 bFGF とともに、コントロール群 (α -MEM) に比較して有意に PMCs の増加を認めた。

3-6. 骨折モデルにおける 4種類のコラーゲン結合型 bFGF の骨形成効果

(In vivo)

9週齢マウス大腿骨骨折モデルを作成し、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/4種類のコラーゲン結合型 bFGF 複合体の骨形成効果を μ CT を用いて評価した。骨折後4週の 3DCT において、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b 群で最も大きな新生骨形成を認めた。

【図 7】 poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF 群、4種類のコラーゲン結合型 bFGF 群 (poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3, poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3, poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3b, poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b) でコントロール群 (PBS 群) に比較して、CV、BMC とともに有意に高値を認めた。また、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3b 群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b 群は poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF 群よりも CV が有意に高かった。poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b 群は CV、BMC とともに全群と比較して有意に高値を認めた。【図 8】

3-7. 組織学的評価

poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b の新生骨形成効果のメカニズムを調べるために、骨折後2週での組織学的評価を行った。【図 9】 poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3 群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3b 群でコントロール群と比較して大きな仮骨形成を認めた。poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b 群は他群と比較して最も大きな仮骨形成を認めた。このことは、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b 群が最も軟骨形成を促進することが示唆された。

3-8. 難治性骨折モデルにおける poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b の骨形成評価 (In vivo)

9 週齢マウス大腿骨骨切り部周囲骨膜を焼却した難治性大腿骨骨折モデルを作成した。poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b の難治性骨折モデルに対する骨形成効果を評価するために、骨折後、2, 4, 6 週で μ CT による CV, BMC の測定を行った。4 週において、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b 群は、コントロール群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ 群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF 群よりも CV, BV ともに有意に高値を認めた。【図 10】

3-9. 難治性骨折モデルにおける poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b の骨癒合率評価 (In vivo)

マウス大腿骨骨折モデルに対する骨癒合促進効果を調べるために、骨折後 2, 4, 6 週で Xp による骨癒合判定を行った。【表 2】
2 週では、全群で骨癒合を認めなかった。4 週では、コントロール群 20%、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ 群 20%、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF 群 30%、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b 群 30%と有意差はなかったが、6 週では、コントロール群 20%、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ 群 20%、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF 群 30%、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b 群 60%と poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b 群で骨癒合率の改善を認めた。

4. 考察

4-1. 高齢者骨折モデルにおける poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 の骨形成促進効果

今研究において、第一の実験で、コラーゲンに特徴的な 3 重螺旋構造を持つコラーゲン様ポリペプチドである poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ と bFGF-s2b-s3 の組合せが、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ や bFGF よりも骨形成効果が高いことを示した。また、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ はコラーゲンと同様な 3 重螺旋構造を持ち、CD スペクトルにおいて、コラーゲンと同様に 220 nm 付近で極大を持ち、80 °C の高温でも極大は消失せず、高い熱耐性を持つことが分かった。これらの結果から、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 は臨床においても骨形成促進剤として、有用な材

料となる可能性が示唆された。

臨床においては、これまで骨折部や骨欠損部に移植可能な数多くのコラーゲン材料の研究が行われてきた。²¹⁾ しかしながら、コラーゲンは体内では体熱のため、不安定である。コラーゲン材料を移植するためには、外科的な手術が必要であり、大きな手術侵襲は術後合併症を伴う可能性がある。poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ に関しては、過去にも報告があるが²³⁾ 今回は、10 mg/ml の濃度で実験を行い、過去の報告より濃度が高く、粒子径が大きくなった。しかし、10 mg/ml の poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ は問題なく投与することができた。以上から、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ は、骨折臨床において、動物由来コラーゲンをを用いない安全で、構造的に熱耐性にすぐれ、担体として局所へ注射しやすい材料であると考えられた。

近年では、bFGF は人の脛骨骨折後、骨形成を促進することが報告されている。^{3 9)} 今研究で、 μ CT の結果から、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 は、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ 単独よりも、骨形成を促進することが分かった。これは、我々が過去にマウス大腿骨骨折モデルに、コラーゲン材料/bFGF を局所投与したの結果と同様であった。²⁹⁾ この結果から、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ が、動物由来コラーゲン材料の代替として、bFGF の有用な担体となりうる可能性が示唆された。

また、過去にコラーゲン材料/bFGF-s2b-s3 の組合せで、骨膜上の骨形成を促進することを報告している。^{39 40)} コラーゲン材料/bFGF-s2b-s3 をマウス大腿骨骨折モデルに投与すると、コラーゲン材料と bFGF よりも高い骨形成促進効果を報告した。²⁹⁾ 今研究では、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 は poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF よりも、高い軟骨形成作用と骨形成促進作用を持つことが分かった。この結果は、コラーゲン材料/bFGF-s2b-s3、コラーゲン材料/bFGF と同様であった。以上の結果から、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 複合体は、実臨床において、動物由来コラーゲンをを用いない、新規の骨形成促進治療剤として有用である可能性が示唆された。本研究にはいくつかの限界がある。poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 複合体が骨形成を促進することは分かったが、骨形成のメカニズムは不明である。また、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 を投与後に bFGF の生体内徐放に関しても分かっていない。また、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ の粒子径を計測したが、どのくらいの粒子径が骨形成を促進するのに有用であるかは分かっていない。

4-2. 4 種類のコラーゲン結合型 bFGF の骨形成促進効果

クロストリジウム属コラゲナーゼの C 末端には、コラーゲンアンカーが存在する。

コラーゲンアンカーは3重螺旋構造の膠原線維やコラーゲンペプチドに結合し、1本鎖ポリペプチドには結合しない。⁴¹⁾コラーゲンアンカーは、PKD、CBDの2つのドメインを有している。クロストリジウム属コラーゲナーゼは様々な、PKD、CBDドメインを持っている。われわれは、コラーゲン材料(高密度コラーゲンシート、コラーゲンパウダー、脱灰骨)などと*Clostridium histolyticum* collagenase ColH由来のPKD(s2b)とCBD(s3)をアンカーに持つコラーゲン結合型bFGF(bFGF-s2b-s3)の組合せで新生骨形成を促進することを示した。^{29 36)}また、高齢週マウス骨折モデルにおいて、動物由来コラーゲンの代替として、コラーゲン材料であるpoly(Pro-Hyp-Gly)₁₀とbFGF-s2b-s3の組合せが、poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀とbFGFのみよりも高い新生骨形成作用があることが分かった。⁴²⁾次の実験として、PKD、CBDをアンカーに持つ4種類のコラーゲン結合型bFGFを作成した。コラーゲンアンカーの種類を変えることによって、担体であるコラーゲン材料へ結合力を最適化できるのではないかとということで実験を行った。poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀とコラーゲンアンカーの結合力を調べるために、リガンドとして、ペプチド(H-Gly-Pro-Arg-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₁₂-NH₂)を作成した。K_DはCBD(s3b)で4.54±0.15×10⁻⁵M、これは、過去の報告である(G(POG)₈)とのK_Dの値(5.72±0.473×10⁻⁵M)とほぼ同等であった。また、*Clostridium histolyticum* class I collagenase ColG由来のコラーゲンアンカー(s3a-s3b, s3b)は*Clostridium histolyticum* class II collagenase ColH由来のアンカー(s2b-s3, s3)よりもペプチドとの高い結合力が分かった。今回、*Clostridium histolyticum* class I collagenase ColG由来のs3a-s3b, s3b間に結合力の差はなかったが、理由として、リガンドとして使用したペプチドの長さが短かった可能性がある。今後、さらに長いペプチドを作成し、X線回析などを用いて検討する余地がある。

次に、4種類のコラーゲン結合型bFGFと、bFGFに関して、PMCsの細胞増殖試験を行った。4種類のコラーゲン結合型bFGFとbFGFは濃度依存性にPMCsの増殖を促進したことから、bFGFは様々なコラーゲンアンカーと結合しても活性は失われないことが分かった。また、0.1-1.0 pMの低い濃度において、bFGF-s3a-s3bが最も高い骨膜細胞増殖能を持つことが分かった。

また、マウス大腿骨骨折モデルを用いてpoly(Pro-Hyp-Gly)₁₀と4種類のコラーゲン結合型bFGFの骨形成作用を調べた。過去に、bFGF-s2b-s3はbFGF-s3よりもコラーゲン材料と強く結合し、より骨形成作用を促進することを報告している。⁴³⁾今回の4種類のコラーゲンアンカーでは、ColGアンカーはColHアンカーよりコラーゲンペプチドへの結合力は10倍高いことが分かった。これは、in vivoの結果と一致

しており、ColI 由来コラーゲン結合型 bFGF は ColII 由来のコラーゲン結合型 bFGF よりも骨膜細胞の増殖を促進し、新生骨形成を促進することが分かった。

したがって、骨形成能はコラーゲンアンカーの結合力に相関し、さらに、CBD を二つ持つ、s3a-s3b (ColI) は poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ との組み合わせで bFGF を骨折部に長く徐放し、仮骨形成を促進することが示唆された。これらの結果から、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b は骨折治癒促進剤として臨床においても有用な治療法の一つとなりうる可能性が示唆された。

4-3. 難治性骨折モデルにおける poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2a-s3b の骨形成効果、骨癒合率改善効果

最後に、交通外傷を模擬した難治性マウス大腿骨骨折モデルを作成した。難治性骨折モデルは過去にさまざま報告があるが、⁴³⁻⁴⁶⁾ 今回、骨折部周囲骨膜 (3 mm) を焼却したモデルを作成した。この骨膜焼却モデルに、最も新生骨形成効果が強い poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b を用いて、検討を行った。

poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b 群は 4 週において、CV、BMC とともに PBS 群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ 群、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF 群より有意に高値であったことから、難治性骨折モデルにおいても骨形成を促進することが示唆された。

また、レントゲンによる骨癒合率を評価してみると、コントロール群は、6 週での骨癒合率が 20% と高率に骨癒合を認めないことが分かった。それに対し、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b 群は 6 週で骨癒合率 60% と改善を認めた。以上の結果から、メカニズムを考えてみると、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b は骨折後早期に、残存骨膜に存在する間葉系細胞の増殖を促し、仮骨形成、新生骨形成を促進し、骨癒合率を改善させることが示唆された。以上より poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b は臨床において、骨膜を損傷するような難治性骨折に対し、有用な治療選択肢の一つになりうる可能性が示唆された。

5. 総括

Clostridium histolyticum collagenase 由来のコラーゲンアンカー-PKD (s2b)、CBD (s3) と人工コラーゲン poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ を用いて、局所に注入可能な bFGF の投与システムを開発した。コラーゲン結合型 bFGF と動物由来コラーゲンも用いない poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ を組み合わせることにより、マウス大腿骨骨折モデルにおいて、新生骨量、骨塩量が有意に増加することが分かった。また、コラーゲン結

合型 bFGF の最適化を行った結果、Col1G 由来の CBD を二つ持つ bFGF-s3a-s3b と poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ の組合せが、最も高い骨形成促進作用を持つことが明らかになった。交通外傷を模擬した難治性骨折モデルを作成し、

poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/ bFGF-s3a-s3b を投与してみると、仮骨量、骨塩量ともに有意に増加し、骨癒合率の改善が見られた。以上より、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ とコラーゲン結合型 bFGF (特に bFGF-s3a-s3b) は実臨床においても骨形成促進剤、骨折治癒促進剤として有用な材料となる可能性があることが示唆された。

6. 今後の課題

poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/コラーゲン結合型 bFGF は、高齢者骨折や、難治性骨折に有用である可能性が示唆された。しかし、骨折部に bFGF をどのくらいの期間徐放するか、などメカニズムに関しては不明な部分も多い。さらなる in vitro, in vivo の実験系の追加が必要と考えられた。また、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b の投与により、難治性骨折モデルで骨癒合率を改善させたが、100%骨癒合させることはできなかった。Clostridium histolyticum collagenase 由来のコラーゲンアンカーはさまざまな成長因子と結合することができるため、今後、BMP-2 など、他の成長因子と組み合わせて、検討を行っていくことも課題であると考えられる。

7. 謝辞

本研究を終えるにあたり、北里大学医学部整形外科学 高相晶士教授、井上玄准教授、内田健太郎講師、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病原細菌学分野 松下治教授、早稲田大学先進理工学部化学・生命科学科 小出隆規教授には、ご指導、ご鞭撻を賜り、ここに心から厚く御礼を申し上げます。また、岡山大学医学生 濱本奈々さん、神寛樹君には、動物実験や CT 解析など一緒に手伝っていただき深くお礼申し上げます。最後に、北里大学大学院整形外科学研究室博士課程在籍の各先生、技術員の大貫裕子さん、北里大学医学部整形外科学医局員の各先生には普段より叱咤激励やご支援いただけましたことを深く感謝申し上げます。

8. 引用文献

1. Nakajima F, Nakajima A, Ogasawara A, Moriya H, Yamazaki M. Effects of a single percutaneous injection of basic fibroblast growth factor on the healing of a closed femoral shaft fracture in the rat. *Calcif Tissue Int.* 2007;81:132-138.
2. Conway JD, Shabtai L, Bauernschub A, Specht SC. BMP-7 versus BMP-2 for the treatment of long bone nonunion. *Orthopedics.* 2014;37:e1049-e1057.
3. Kawaguchi H, Oka H, Jingushi S, Izumi T, Fukunaga M, Sato K, et al. A local application of recombinant human fibroblast growth factor 2 for tibial shaft fractures: A randomized, placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res.* 2010;25:2735-2743.
4. Papanna MC, Al-Hadithy N, Somanchi BV, Sewell MD, Robinson PM, Khan SA, et al. The use of bone morphogenic protein-7 (OP-1) in the management of resistant non-unions in the upper and lower limb. *Injury.* 2012;43:1135-1140.
5. Wei S, Cai X, Huang J, Xu F, Liu X, Wang Q. Recombinant human BMP-2 for the treatment of open tibial fractures. *Orthopedics.* 2012;35:e847-e854.
6. Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1992;200:165-170.
7. Ueno M, Urabe K, Naruse K, Uchida K, Minehara H, Yamamoto T, et al. Influence of internal fixator stiffness on murine fracture healing: Two types of fracture healing lead to two distinct cellular events and FGF-2 expressions. *Exp Anim* 2011;60:79-87.
8. Bourque WT, Gross M, Hall BK. Expression of four growth factors during fracture repair. *Int J Dev Biol.* 1993;37:573-579.

9. Kawaguchi H, Jingushi S, Izumi T, Fukunaga M, Matsushita T, Nakamura T, et al. Local application of recombinant human fibroblast growth factor-2 on bone repair: A dose-escalation prospective trial on patients with osteotomy. *J Orthop Res.* 2007;25:480-487.
10. Kato T, Kawaguchi H, Hanada K, Aoyama I, Hiyama Y, Nakamura T, et al. Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits. *J Orthop Res.* 1998;16:654-659.
11. Kawaguchi H, Kurokawa T, Hanada K, Hiyama Y, Tamura M, Ogata E, et al. Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology.* 1994;135:774-781.
12. Nakamura K, Kawaguchi H, Aoyama I, Hanada K, Hiyama Y, Awa T, et al. Stimulation of bone formation by intraosseous application of recombinant basic fibroblast growth factor in normal and ovariectomized rabbits. *J Orthop Res.* 1997;15:307-313.
13. Radomsky ML, Aufdemorte TB, Swain LD, Fox WC, Spiro RC, Poser JW. Novel formulation of fibroblast growth factor-2 in a hyaluronan gel accelerates fracture healing in nonhuman primates. *J Orthop Res.* 1999;17:607-614.
14. Ueno M, Uchida K, Saito W, Matsushita O, Yogoro M, Nishi N, et al. Acceleration of bone union after structural bone grafts with a collagen-binding basic fibroblast growth factor anchored-collagen sheet for critical-size bone defects. *Biomed Mater.* 2014;9:035014
15. Aro HT, Govender S, Patel AD, Hernigou P, Perera de GA, Popescu GI,

et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2: A randomized trial in open tibial fractures treated with reamed nail fixation. *J Bone Joint Surg Am.* 2011;93:801-808.

16. Inui K, Maeda M, Sano A, Fujioka K, Yutani Y, Sakawa A, et al. Local application of basic fibroblast growth factor minipellet induces the healing of segmental bony defects in rabbits. *Calcif Tissue Int.* 1998;63:490-495.

17. Piez KA, Sherman MR. Characterization of the product formed by renaturation of alpha 1-CB2, a small peptide from collagen. *Biochemistry* 1970; 9:4129-4133.

18. Swiontkowski MF, Aro HT, Donell S, Esterhai JL, Goulet J, Jones A, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88:1258-1265.

19. Kanematsu A, Marui A, Yamamoto S, Ozeki M, Hirano Y, Yamamoto M, et al. Type I collagen can function as a reservoir of basic fibroblast growth factor. *J Control Release.* 2004;99:281-292.

20. Aguzzi A, Montrasio F, Kaeser PS. Prions: health scare and biological challenge. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:118-26.

21. Leikina E, Merts MV, Kuznetsova N, Leikin S. Type I collagen is thermally unstable at body temperature. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:1314-1318.

22. Persikov AV, Xu Y, Brodsky B. Equilibrium thermal transitions of collagen model peptides. *Protein Sci.* 2004;13:893-902.

23. Kishimoto T, Morihara Y, Osanai M, Ogata S, Kamitakahara M, Ohtsuki C, et al. Synthesis of poly(Pro-Hyp-Gly) (n) by direct poly-condensation of (Pro-Hyp-Gly) (n), where n=1, 5, and 10, and stability of the triple-helical structure. *Biopolymers*. 2005; 79:163-172.
24. Philominathan ST, Koide T, Hamada K, Yasui H, Seifert S, Matsushita O, et al. Unidirectional binding of clostridial collagenase to triple helical substrates. *J Biol Chem*. 2009;284:10868-10876.
25. Johnson G, Jenkins M, McLean KM, Griesser HJ, Kwak J, Goodman M, Steele JG. Peptoid-containing collagen mimetics with cell binding activity. *J Biomed Mater Res*. 2000;51:612-624.
26. Tanihara M, Kajiwara K, Ida K, Suzuki Y, Kamitakahara M, Ogata S. The biodegradability of poly(Pro-Hyp-Gly) synthetic polypeptide and the promotion of a dermal wound epithelialization using a poly(Pro-Hyp-Gly) sponge. *J Biomed Mater Res A*. 2008;85:133-139.
27. Chattopadhyay S, Raines RT. Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*. 2014;101:821-833.
28. Kojima C, Tsumura S, Harada A, Kono K. A collagen-mimic dendrimer capable of controlled release. *J Am Chem Soc*. 2009;131:6052-6053.
29. Saito W, Uchida K, Ueno M, Matsushita O, Inoue G, Nishi N, et al. 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*. 2014;102:3049-3055.
30. Cejas MA, Chen C, Kinney WA, Maryanoff BE. Nanoparticles that display short collagen-related peptides. Potent stimulation of

human platelet aggregation by triple helical motifs. *Bioconjug Chem.* 2007;18:1025-1027.

31. Bauer R. et al. Structures of three polycystic kidney disease-like domains from *Clostridium histolyticum* collagenases ColG and ColH. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2015;71, 565-577.

32. Bauer R, Wilson JJ, Philominathan ST, Davis D, Matsushita O, Sakon J. Structural comparison of ColH and ColG collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum*. *J Bacteriol.* 2013;195, 318-327.

33. Fukata Y. et al. Direct cytotoxic effect of galectin-9 localized on collagen matrices on human immune cell lines. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840, 1892-1901.

34. Philominathan ST, Koide T, Hamada K, Yasui H, Seifert S, Matsushita O, et al. Unidirectional binding of clostridial collagenase to triple helical substrates. *J Biol Chem.* 2009;284:10868-10876.

35. Katano M, Naruse K, Uchida K, Mikuni-Takagaki Y, Takaso M, Itoman M, et al. Low intensity pulsed ultrasound accelerates delayed healing process by reducing the time required for the completion of endochondral ossification in the aged mouse femur fracture model. *Exp Anim.* 2011;60:385-395.

36. Saito W, Uchida K, Matsushita O, Inoue G, Sekiguchi H, Aikawa J, et al. 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.* 2015;10:59.

37. Wilson JJ, Matsushita O, Okabe A, Sakon J. A bacterial collagen-binding domain with novel calcium-binding motif controls domain orientation. *EMBO J.* 2003;22, 1743-1752.
38. Naruse K, Sekiya H, Harada Y, Iwabuchi S, Kozai Y, Kawamata R, et al. Prolonged endochondral bone healing in senescence is shortened by low-intensity pulsed ultrasound in a manner dependent on COX-2. *Ultrasound Med Biol.* 2010;36:1098-1108.
39. Uchida K, Matsushita O, Naruse K, Mima T, Nishi N, Hattori S, et al. 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.* 2014;102:1737-1743.
40. Uchida K, Matsushita O, Nishi N, Inoue G, Horikawa K, Takaso M. Enhancement of periosteal bone formation by basic fibroblast-derived growth factor containing polycystic kidney disease and collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017; (4) :1165-1172.
41. Matsushita O, Koide T, Kobayashi R, Nagata K, Okabe A. Substrate recognition by the collagen-binding domain of *Clostridium histolyticum* class I collagenase. *J Biol Chem.* 2001;276, 8761-8770.
42. Sekiguchi H, Uchida K, Inoue G, Matsushita O, Saito W, Aikawa J, et al. 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.* 2016;104, 1372-1378.
43. Choi P, Ogilvie C, Thompson Z, Miclau T, Helms JA. Cellular and

molecular characterization of a murine non-union model. *J Orthop Res.* 2004;22:1100-1107.

44. Oetgen ME, Merrell GA, Troiano NW, Horowitz MC, Kacena MA, Development of a femoral non-union model in the mouse. *Injury.* 2008;39:1119-1126.

45. Garcia P, Herwerth S, Matthys R, Holstein JH, Histing T, Menger MD, et al. The LockingMouseNail-A new implant for standardized stable osteosynthesis in mice. *J Surg Res.* 2009;169:220-226.

46. Kumar S, Wan C, Ramaswamy G, Clemens TL, Ponnazhagan S. Mesenchymal stem cells expressing osteogenic and angiogenic factors synergistically enhance bone formation in a mouse model of segmental bone defect. *Mol Ther.* 2010;18: 1026-1034.

9. 業績目録

(I) 原著

1. Kentaro Uchida, Gen Inoue, Osamu Matsushita, Kyosuke Horikawa, Hiroyuki Sekiguchi, Wataru Saito, Shotaro Takano, Hisako Fujimaki, Masayuki Miyagi, Masashi Takaso. Basic Fibroblast Growth Factor–Anchored Multilayered Mesenchymal Cell Sheets Accelerate Periosteal Bone Formation. *BioMed Research International*. 2017; 2017: 4371460.
2. Jun Aikawa, Kentaro Uchida, Shotaro Takano, Gen Inoue, Atsushi Minatani, Masayuki Miyagi, Dai Iwase, Hiroyuki Sekiguchi, Manabu Mukai and Masashi Takaso. Expression of calcitonin gene–related peptide in the infrapatellar fat pad in knee osteoarthritis patients. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2017;12 (1) :65.
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 (Phila Pa 1976)*. 2017;42 (17) :E995–E1001.
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. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2016;104 (6) :1372–8.
5. Sekiguchi H, Inoue G, Nakazawa T, Inuma T, Saito W, Uchida K, Miyagi M, Takahira N, Takaso M. Loxoprofen sodium and celecoxib for postoperative pain in patients after spinal surgery: a randomized comparative study. *Journal of Orthopaedic Science*. 2015;20 (4) :617–23

6. Saito W, Uchida K, Matsushita O, Inoue G, Sekiguchi H, Aikawa J, Fujimaki H, Takso 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. Journal of Orthopaedic Surgery and Research. 2015;10:59

7. Yamada T, Uchida K, Onuma K, Inoue G, Aikawa J, Takano S, Sekiguchi H, Fujimaki H, Miyagi M, Takaso M, Hyaluronic Acid (800 kDa) Supplementation of University of Wisconsin Solution Improves Viability of Osteochondral Grafts and Reduces Matrix Metalloproteinase Expression during Cold Preservation. Scientific World Journal. 2015;2015:631369.

(II) 著 書

な し

(III) 総説・講座

な し

(IV) 症例・臨床治験・その他

1. 東山礼治, 相川淳, 岩瀬大, 南谷淳, 関口裕之, 高野昇太郎, 高相晶士, 腓骨筋腱脱臼に対し後足部内視鏡下 Peroneal Groove Deeping を施行した 1 例. 日本足の外科学会誌. 2016;37 (1) :276-278.
2. 東山礼治, 相川淳, 岩瀬大, 南谷淳, 関口裕之, 田澤涼, 高相晶士, 同種アキレス腱を用いた解剖学的鏡視下 ATFL・CFL 再建術を施行したバレエダンサーの 1 例. 日本足の外科学会誌. 2016;37 (1) :279-283.
3. 東山礼治, 相川淳, 岩瀬大, 南谷淳, 善平哲夫, 関口裕之, 渡邊英一郎, 渡邊裕之, 高平尚伸, 高相晶士, 解剖学的鏡視下 ATFL/CFL 再建術における安全な腓骨骨孔作成の工夫. 2016;JOSKAS. 41 (3) :1047-1052.
4. 庄司真太郎, 東山礼治, 相川淳, 岩瀬大, 南谷淳, 関口裕之, 成瀬康治, 占部憲 高

- 相晶士, 両側に発生した腓骨筋癒性扁平足に対し Accessory Anterolateral Talar Facet の鏡視下切除術が著効した 1 例. 日本足の外科学会雑誌. 2015;36 (1) :189-194.
5. 関口裕之, 福島健介, 内山勝文, 山本豪明, 森谷光俊, 高平尚伸, 高相晶士, 大腿骨転子部骨折に対する観血的骨接合術後に骨頭内ブレードが骨盤内穿破した 1 例. 神奈川整形災害外科研究会雑誌. 2014;27 (4) :87-90.
 6. 関口裕之, 東山礼治, 相川淳, 岩瀬大, 南谷淳, 高野昇太郎, 渡邊裕之, 成瀬康治, 占部憲 高相晶士, 足関節外側靭帯損傷に対し同種骨付き膝蓋腱を用いて再建術を行った 2 例. 日本足の外科学会雑誌. 2014;35 (1) :308-312.
 7. 高平尚伸, 河村直, 内山勝文, 福島健介, 森谷光俊, 山本豪明, 峯岸洋次郎, 関口裕之, 相川淳, 岩瀬大, 東山礼治, 高相晶士 人工関節術後の VTE 現状と予防法について 人工関節置換術後における静脈血栓塞栓症予防法の工夫 抗凝固薬の Switch 法. 日本人工関節学会誌. 2014;44:31-32.
 8. 東山礼治, 相川淳, 岩瀬大, 南谷淳, 関口裕之, 高野昇太郎, 成瀬康治, 占部憲, 高相晶士, 薄筋腱を用いて関節鏡視下 ATFL 再建術を施行した 1 例. 日本足の外科学会雑誌. 2014;35 (1) :313-316.
 9. 関口裕之, 東山礼治, 相川淳, 岩瀬大, 鈴木良和, 南谷淳, 高相晶士, 陳旧性足関節靭帯損傷に対し、手術施行後 interference screw の脱転を来した 1 例. 神奈川整形災害外科研究会雑誌. 2012;25 (5) :189-192.

10. 図表説明

表1 コラーゲンアンカーの結合力

Collagen anchor	K_D ($\times 10^{-5}$ M)
s3a-s3b	4.46 \pm 0.45
s3b	4.54 \pm 0.15
s2b-s3	44.5 \pm 0.55
s3	75.2 \pm 0.41

各コラーゲンアンカーとミニペプチド (H-Gly-Pro-Arg-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₁₂-NH₂) の解離係数 (K_D) を測定した。ColI アンカー (s3a-s3b, s3b) は ColII アンカー (s2b-s3, s3) に比べて、約 10 倍解離係数が低かった。

表2 各群における骨折後の骨癒合率

	2 週	4 週	6 週
PBS	0/10 (0%)	2/10 (20%)	2/10 (20%)
poly (Pro-Hyp-Gly) ₁₀	0/10 (0%)	2/10 (20%)	2/10 (20%)
poly (Pro-Hyp-Gly) ₁₀ / bFGF	0/10 (0%)	3/10 (30%)	3/10 (20%)
poly (Pro-Hyp-Gly) ₁₀ / bFGF-s3a-s3b	0/10 (0%)	3/10 (30%)	6/10 (60%)

各群の骨癒合率を示す。難治性骨折モデルに PBS (コントロール)、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF、poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b を投与し、2 週、4 週、6 週での骨癒合率を評価した。6 週 poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b 群で骨癒合率の改善を認めた。

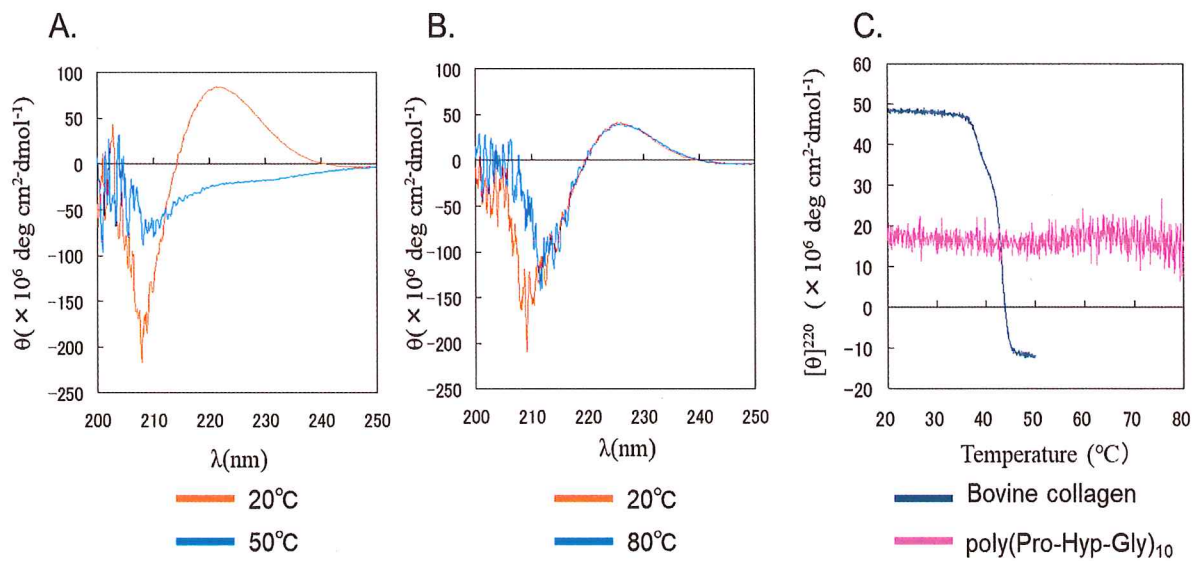


図1 ペプシン可溶性ウシ I 型コラーゲンと poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀ の円偏光二色性
 A: ペプシン可溶性ウシ I 型コラーゲンでは 20°C では 220 nm で極大を認めたが 50 °C では極大は消失した。
 B: poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀ では、20°C、80°C で 220 nm の極大は観察された。
 C: 220 nm のモル楕円率は、プシン可溶性ウシ I 型コラーゲンでは温度が上昇するにつれて減少したが、poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀ では温度が上昇しても変化はなかった。

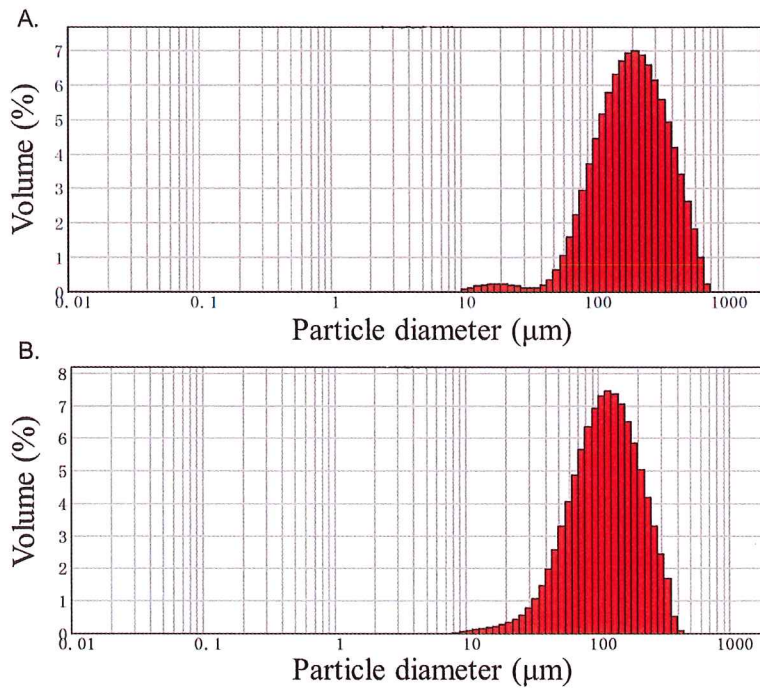


図2 粒子径分布

A: ペプシン可溶性ウシ I 型コラーゲン

B: poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀

poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ はペプシン可溶性ウシ I 型コラーゲンに比較して、細かい粒子径を認めた。

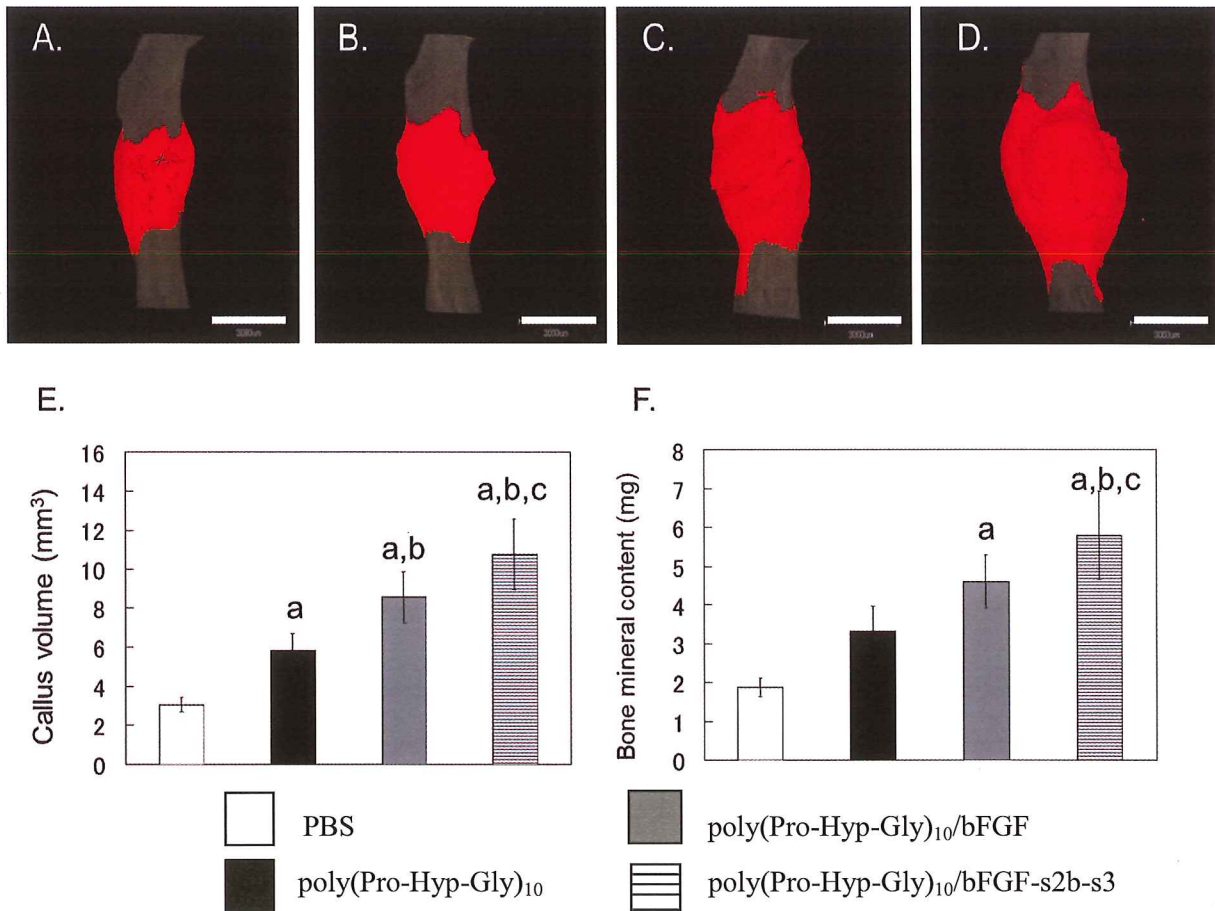


図3 各群における骨折後4週のCT画像および新生骨量、骨塩量

(ABCD) 各群の3D画像を示す。骨折部に A:PBS (コントロール)
 B: poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ C: poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF
 D: poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 を投与し、4 週後の 3D 画像である。赤が新生骨、灰色が既存骨で、スケールバーは 3 mm である。

(EF) 各群の骨折部の (E) 新生骨と (F) 骨塩量のグラフを示す。データは平均値 ± 標準誤差 (n=8) で示す。P<0.05 を統計的有意とした。a は PBS 群との有意差、b: poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀ 群、C: poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF 群との有意差を示している。4 週 poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 群で CV, BMC ともに有意に増加を認めた。

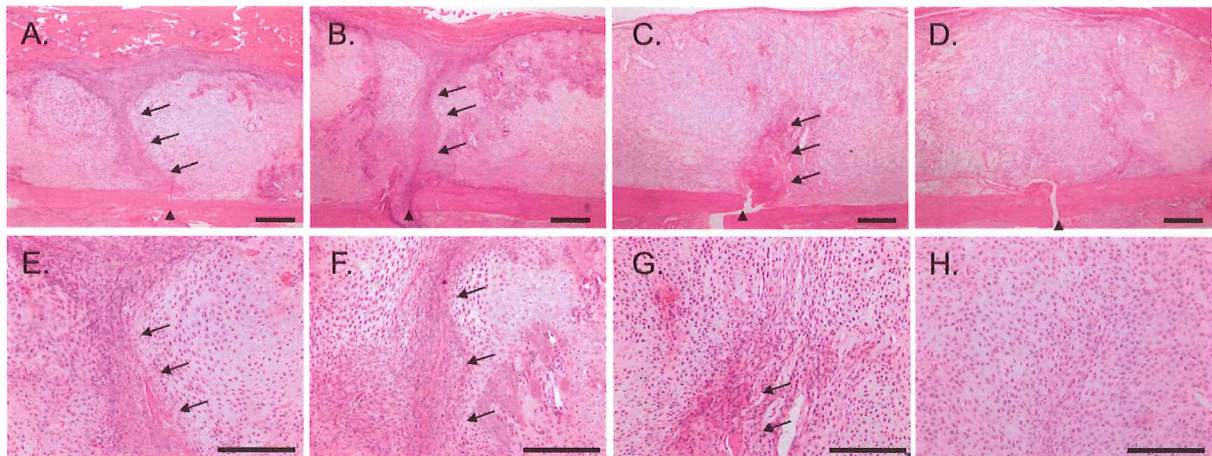


図4 骨折後2週のHE染色像

骨折後、2週でのHE染色像(代表例)を示す。AE:PBS(コントロール),
 BF:poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀, CG: poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF,
 DH:poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 である。大腿骨は20% EDTAで28日間脱灰した。矢印は線維性組織を示している。上矢印は骨折部を示している。スケールバーは500 μmである。poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3 群で軟骨形成の促進を認めた。

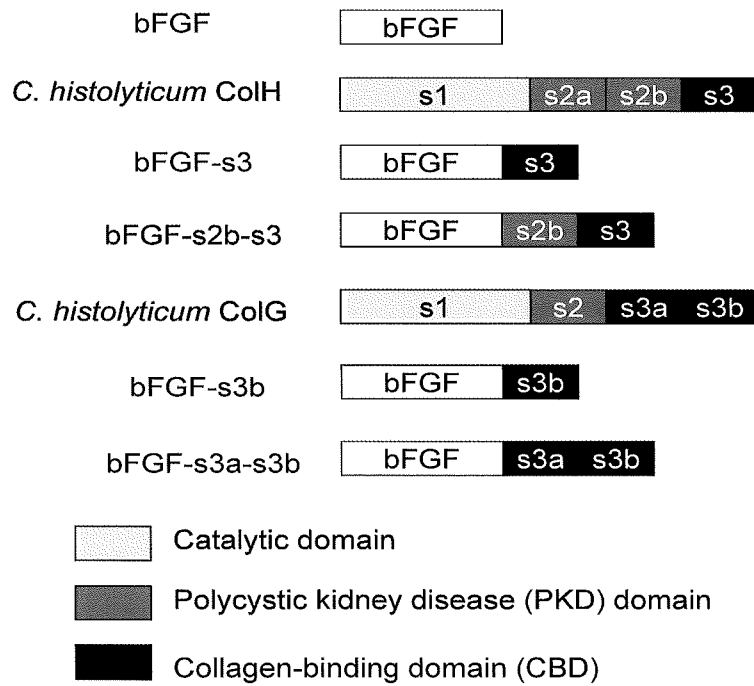


図5 コラーゲン結合型 bFGF の構造

4 種類のコラーゲン結合型 bFGF の構造を示す。今回、*C. histolyticum* ColH 由来の 2 種類 (bFGF-s3, bFGF-s2b-s3) *C. histolyticum* ColG 由来の 2 種類 (bFGF-s3b, bFGF-s3a-s3b) を実験に用いた。

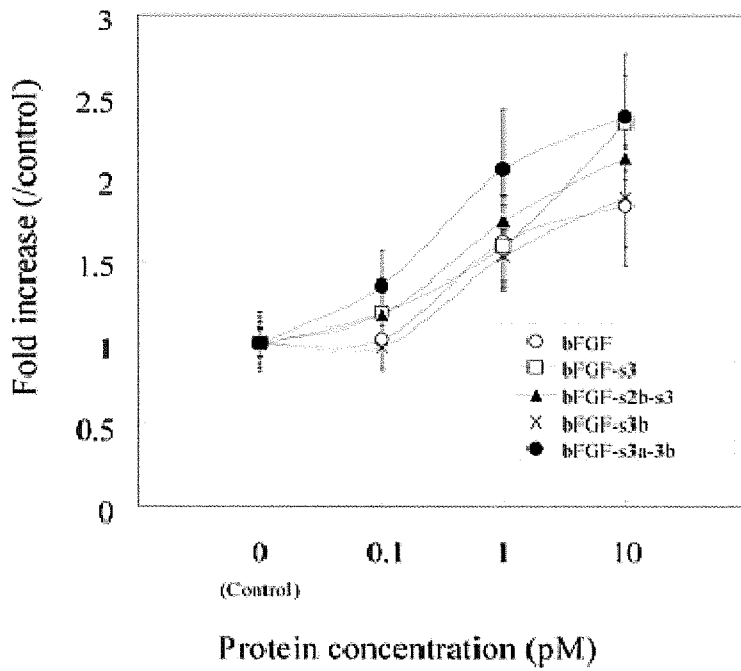


図6 bFGF と4種類のコラーゲン結合型 bFGF の細胞増殖活性 (In vitro)

bFGF, 4種類のコラーゲン結合型 bFGF とともに、濃度依存性に細胞増殖活性の上昇を認めた。データは平均値±標準誤差 (n=8) で示す。

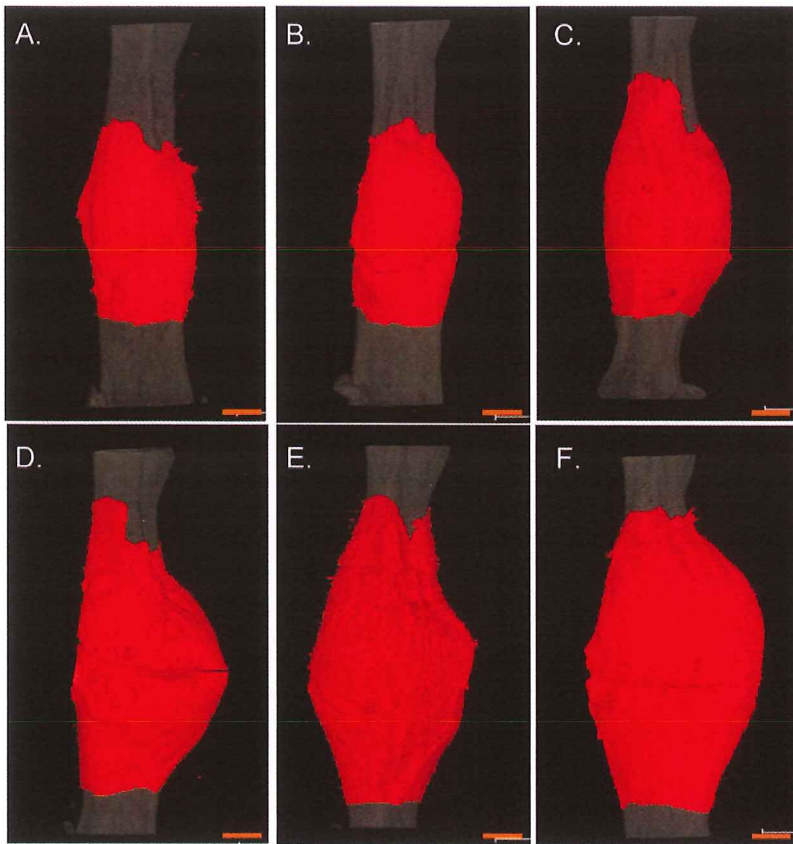


図7 各群における骨折後4週の3DCT画像

(ABCDEF)各群の3D画像を示す。骨折部にA:PBS(コントロール)
 B:poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF, C:poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3,
 D:poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGFs2b-s3, E: poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3b,
 F: poly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3bを注射し、4週後の3D画像である。赤が新生骨、灰色が既存骨で、スケールバーは3mmである。右下のpoly (Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b群で大きな新生骨形成を認めた。

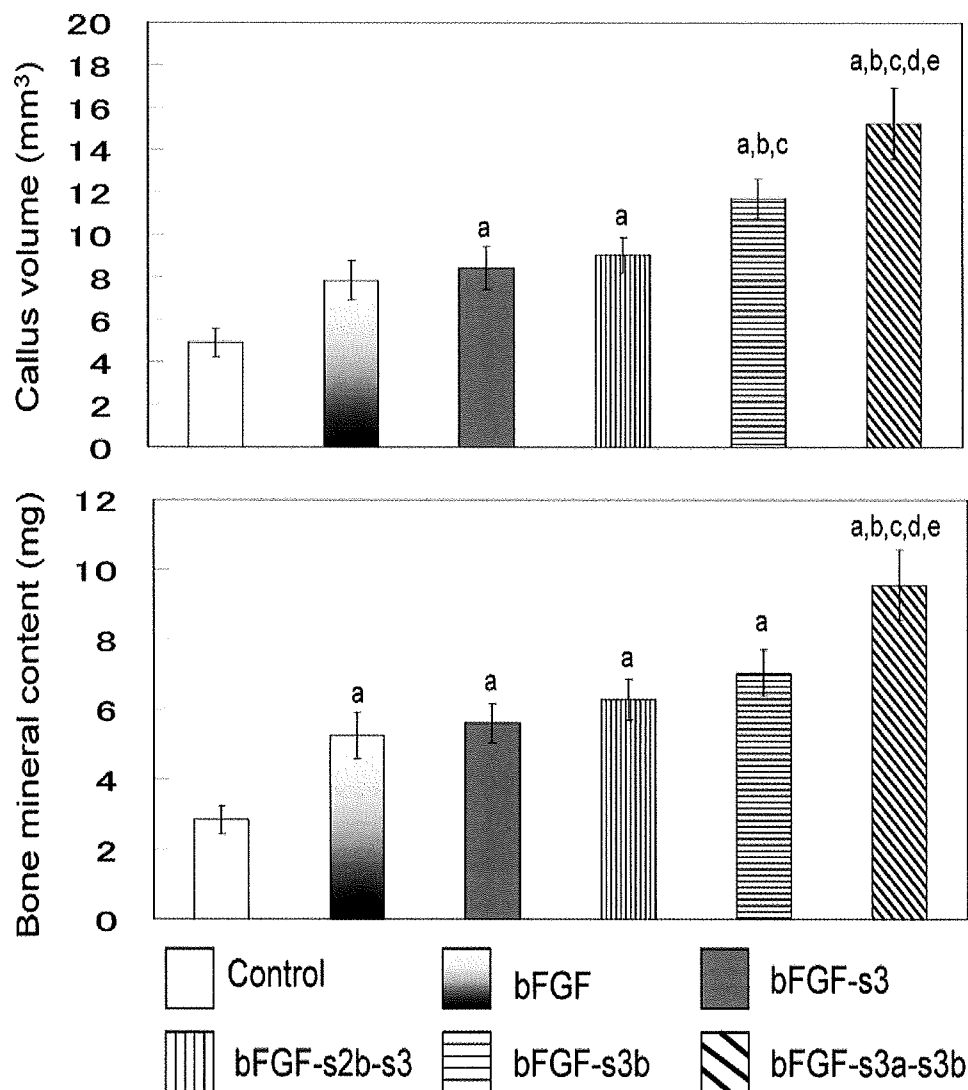


図8 各群における骨折後の4週の新骨量、骨塩量

各群の骨折部の(上)新生骨と(下)骨塩量のグラフを示す。データは平均値±標準誤差(n=8)で示す。P<0.05を統計的有意とした。aはPBS群(コントロール)との有意差、b:poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF群、c:poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3群、d:poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3群、e:poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3b群、との有意差を示している。poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b群でCV BMCともに有意に増加を認めた。

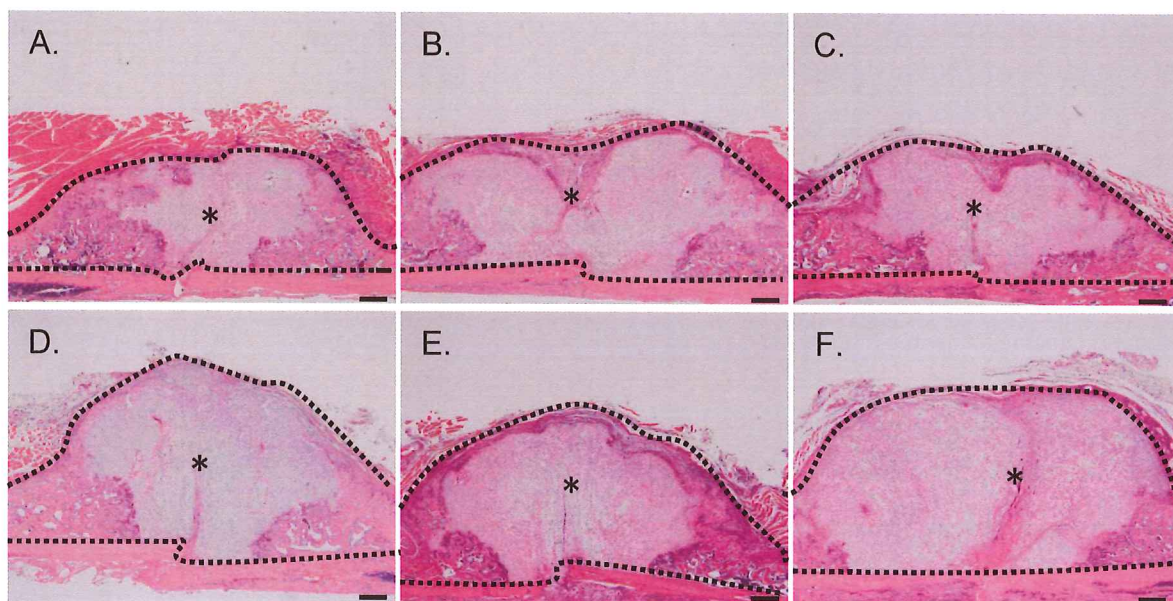


図9 骨折後2週のHE染色像

骨折後、2週でのHE染色像(代表例)を示す。AはPBS(コントロール)、B: poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF、C: poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3、D: poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s2b-s3、E: poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3b、F: poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3bである。ドットで覆われた部分で(*)は仮骨を示している。スケールバーは500 μmである。右下の poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b 群で軟骨形成の促進を認めた。

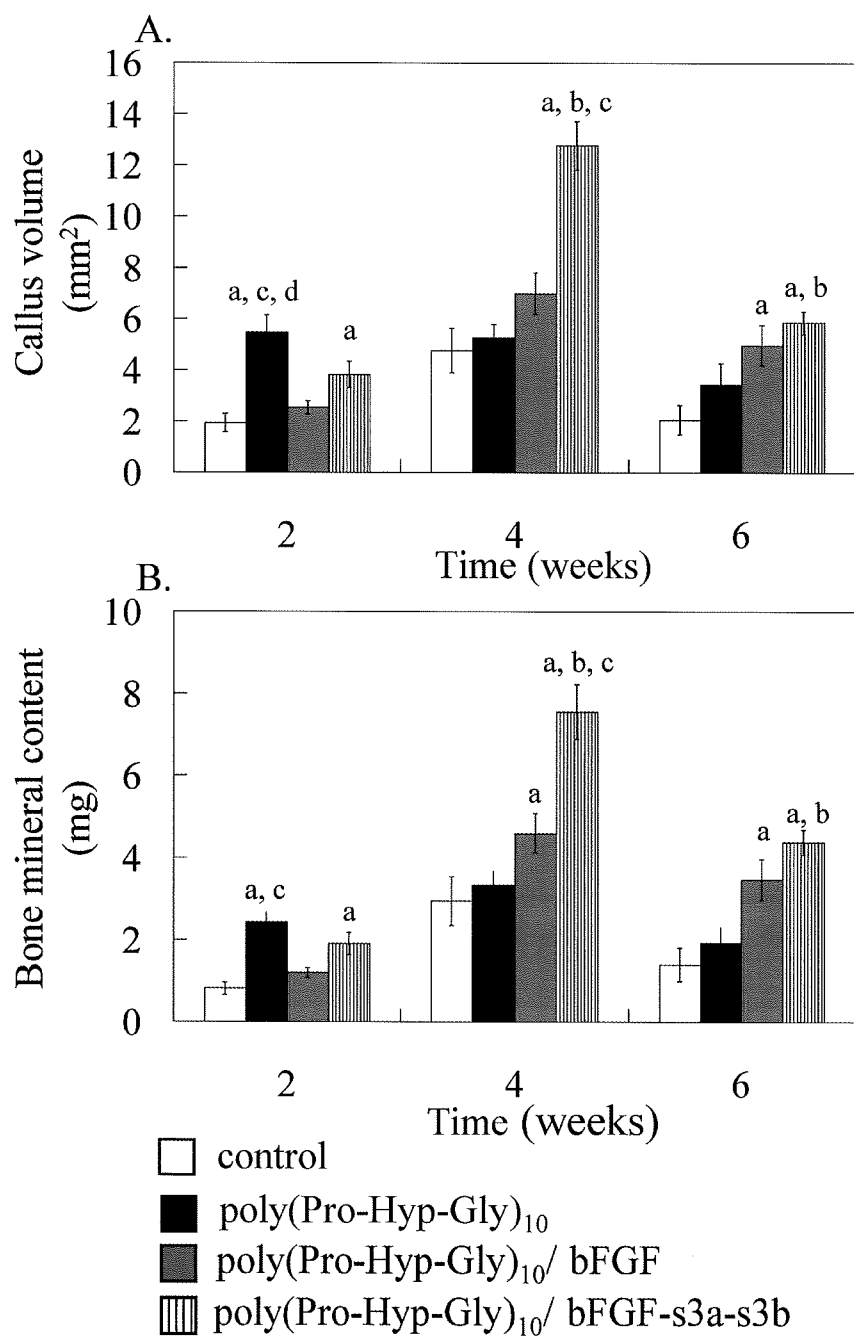


図 10 各群における骨折後の新生骨量、骨塩量（難治性骨折モデル）

各群の骨折部の (A) 新生骨と (B) 骨塩量のグラフを示す。データは平均値±標準誤差 (n=8) で示す。P<0.05 を統計的有意とした。a は PBS 群 (コントロール) との有意差、b: poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀ 群、c: poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF 群との有意差を示している。4 週 poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b 群で CV, BMC とともに有意に増加を認めた。