

# 学 位 論 文 要 旨

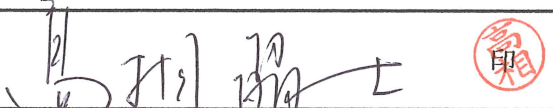
氏 名 関口 裕之



論 文 題 目

「Acceleration of bone formation during fracture healing by  
poly(pro-hyp-gly)<sub>10</sub> 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)<sub>10</sub> 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)

指 導 教 授 承 認 印



「Acceleration of bone formation during fracture healing by poly(pro-hyp-gly)<sub>10</sub> 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)<sub>10</sub> 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)

氏名 関口 裕之

(以下要旨本文)

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)<sub>10</sub> 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)<sub>10</sub> 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 domains (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)<sub>10</sub> 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)<sub>10</sub>、poly(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/bFGF、poly(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/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)<sub>10</sub>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)<sub>10</sub>/bFGF、poly(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/bFGF-s3、poly(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/bFGF-s2b-s3、poly(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/bFGF-s3b、poly(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/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)<sub>10</sub>/bFGF、poly(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/bFGF-s3、poly(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/bFGF-s2b-s3、poly(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/bFGF-s3b、poly(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/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3mm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)<sub>10</sub>、poly(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/bFGF、poly(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/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)<sub>10</sub>)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)<sub>10</sub>/bFGF-s2b-s3はpoly(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/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)<sub>10</sub>/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)<sub>10</sub>/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)<sub>10</sub>/bFGF-s3a-s3b、poly(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/bFGF-s3bは、ColH由来のpoly(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/bFGF-s3、poly(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/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)<sub>10</sub>/bFGF-s3a-s3b は BV BMC とともに優位に高値を認めた。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)<sub>10</sub>/bFGF-s3a-s3b) 60% と有意に骨折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)<sub>10</sub>) は高い熱耐性、細かい粒子径を有していた。また、poly (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> 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)<sub>10</sub> 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)<sub>10</sub>/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)<sub>10</sub>/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)<sub>10</sub>/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)<sub>10</sub> とコラーゲン結合型 bFGF の組み合わせ、特に poly (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>/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。