

学位論文

「成長因子含有局所硬化ゲルを用いた骨形成促進法の開発」

DM17015 庄司 真太郎

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 整形外科学
指導教授 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

【背景】

骨折の約 5~10%では、遷延癒合や癒合不全が生じると報告されている。特に、高エネルギー外傷による骨折は骨膜損傷や骨欠損を伴うため難治性であり、治療の長期化による患者の心理的社会的損害は多大である。したがって、骨形成促進法の開発は極めて重要である。これまで、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF) や骨形成タンパク-2 (bone morphogenetic protein-2 : BMP-2) などの成長因子の投与による骨形成促進効果が報告されている。しかしながら、投与した成長因子の全身への拡散は、効果の減弱や副作用を招く。したがって、成長因子を局所で徐放する送達担体が必要である。近年、成長因子送達担体として、in situ-forming hydrogel (IFHG) として知られているヒドロゲルが注目されている。しかし、bFGF や BMP-2 の送達担体としての IFHG の骨形成促進効果については不明である。本研究では、bFGF および BMP-2 の送達担体として、デキストランやヒアルロン酸を主骨格とする IFHG を用い、マウス単純骨折モデル、マウス難治性骨折モデル、マウス巨大骨欠損モデルにおける骨形成促進効果を検討した。

【方法】

1. マウス単純骨折モデル

9 週齢雄性 C57BL/6J マウスを大腿骨骨幹部で骨切りし、ステンレス釘で髓内固定したマウス単純骨折モデルを用いた。IFHG はデキストランを主骨格とするもの (IFHG-Dex)、成長因子は bFGF (1 μ g) を用いた。骨折のみの群 (control 群)、骨折部に IFHG-Dex のみを投与した群 (Dex 群)、骨折部に bFGF 含有 IFHG-Dex を投与した群 (bFGF+Dex 群) を作成した。各群において、骨折後 4 週で micro CT を撮影し、新生骨量 (bone volume : BV)、骨塩量 (bone mineral content : BMC) を測定した。また、組織学的評価を行った。

2. マウス難治性骨折モデル

上記マウス単純骨折モデルの骨折部を中心に、3mm 幅にわたり骨膜を焼灼したものを難治性骨折モデルとした。IFHG はヒアルロン酸を主骨格とするもの (IFHG-HA)、成長因子は BMP-2 (2 μ g) を用いた。焼灼のみの群 (control 群)、焼灼部に IFHG-HA のみを投与した群 (IFHG-HA 群)、BMP-2 含有 IFHG-HA を投与した群 (IFHG-HA/BMP 群) を作成した。骨折後 4 週または 6 週で屠殺して大腿骨を採取後 micro CT を撮影し、骨膜焼灼部における BV、BMC を測定した。また、骨癒合率の評価、新生仮骨における骨形成マーカー発現の測定、組織学的評価を行った。

3. マウス巨大骨欠損モデル

9 週齢雄性 C57BL/6J マウスの大腿骨中央に自然治癒不可能な 2mm の骨欠損部を作製し、マウス専用創外固定器で固定したものを巨大骨欠損モデルとした。IFHG はヒアルロン酸を主

骨格とするもの (IFHG-HA)、成長因子は BMP-2 (2 μ g) を用いた。骨欠損のみ群 (control 群)、骨欠損部に IFHG-HA のみを投与した群 (IFHG-HA 群)、骨欠損部に BMP-2 含有 PBS を投与した群 (PBS/BMP 群)、骨欠損部に BMP-2 含有 IFHG-HA を投与した群 (IFHG-HA/BMP 群) を作製した。骨欠損作製直後および 14 日後に軟 X 線撮影を行い、骨形成を評価した。術後 14 日で屠殺して大腿骨を採取後に micro CT を撮影し、骨欠損部における BV、BMC を測定した。また、組織学的を行った。

【結果】

1. マウス単純骨折モデルに対する bFGF/IFHG-Dex の骨形成促進効果

bFGF+Dex 群は、他の 2 群と比較して BV、BMC とも有意に高値であった。control 群、Dex 群の間に BV、BMC の有意差はなかった。組織学的評価では、bFGF+Dex 群は他の 2 群よりも旺盛な仮骨形成が認められた。

2. マウス難治性骨折モデルに対する BMP-2/IFHG-HA の骨形成促進効果

IFHG-HA/BMP 群は、control 群、IFHG-HA 群と比較して BV、BMC とも有意に高値であった。IFHG-HA/BMP 群は、micro CT 画像および組織切片標本において新生仮骨による骨折部の架橋を認め、骨癒合率も有意に高かった。また、新生仮骨中の骨形成マーカー発現量も有意に高かった。

3. マウス巨大骨欠損モデルに対する BMP-2/IFHG-HA の骨形成促進効果

軟 X 線撮影では、IFHG-HA/BMP 群と PBS/BMP 群で骨欠損部に新生骨を認めた。対照的に、IFHG-HA 群と control 群のマウスでは、新生骨形成はほとんど認めなかった。また、IFHG-HA/BMP 群と PBS/BMP 群では、IFHG-HA 群や control 群と比較して、BV、BMC が有意に増加していた。さらに、IFHG-HA/BMP 群は、PBS/BMP 群と比較して、BV、BMC が有意に高値であった。組織学的評価では、IFHG-HA/BMP 群と PBS/BMP 群で、骨欠損部に多量の海綿骨を認めた。

【考察】

bFGF は骨折治癒過程の初期における未分化間葉系細胞に対し増殖促進作用を有する。デキストランは酸や熱による不活性化やタンパク分解から bFGF を保護し、また、デキストランゲルは bFGF を徐放し血管新生を促進すると報告されている。本研究で用いた IFHG-Dex と bFGF を併用して骨折部に投与することで、骨形成を促進することができた。この bFGF 含有 IFHG-Dex は、bFGF の活性を保持し、骨形成促進法として有用である可能性がある。

BMP-2 のシグナル伝達は骨折治癒過程の初期に開始され、また、後期においても重要な役割を果たしている。ヒアルロン酸ゲルは BMP-2 を保持し、生体内で骨形成を促進すると報告されている。本研究で用いた BMP-2 含有 IFHG-HA は、マウス難治性骨折モデルやマウス巨大骨欠損モデルにおいて骨形成を促進することができた。BMP-2 含有 IFHG-HA は、BMP-2 の活性を保持し、骨膜損傷や広範な骨欠損を伴う難治例に対する骨形成促進法として有用である可能性がある。

【結語】

bFGF 含有 IFHG-Dex は、マウス単純骨折モデルにおいて骨形成促進効果を認めた。BMP-2 含有 IFHG-HA は、マウス難治性骨折モデル、マウス巨大骨欠損モデルにおいて骨形成促進効果を認めた。成長因子含有局所硬化ゲルは、新たな骨形成促進材として有用である可能性がある。

目次

	頁
1. 序論 -----	1
2. 方法	
2-1. 局所硬化デキストランゲルの作製 -----	2
2-2. in vitro における bFGF 含有局所硬化デキストランゲルにおける bFGF 徐放試験 -----	3
2-3. 局所硬化ヒアルロン酸ゲルの作製 -----	3
2-4. in vitro での BMP-2 含有局所硬化ヒアルロン酸ゲルにおける BMP-2 徐放試験 -----	3
2-5. マウス単純骨折モデルにおける bFGF 含有 IFHG-Dex の骨形成促進効果 の検討	
2-5-1. マウス単純骨折モデルの作製 -----	4
2-5-2. 新生骨の骨量および骨塩量の測定 -----	4
2-5-3. 組織学的評価 -----	4
2-6. マウス難治性骨折モデルにおける BMP-2 含有 IFHG-HA の骨形成促進 効果の検討	
2-6-1. マウス難治性骨折モデルの作製 -----	5
2-6-2. 骨膜焼灼部における新生骨の骨量および骨塩量の測定 -----	5
2-6-3. 組織学的評価 -----	5
2-6-4. real time PCR -----	5
2-7. マウス巨大骨欠損モデルにおける BMP-2 含有 IFHG-HA の骨形成促進 効果の検討	
2-7-1. マウス巨大骨欠損モデルの作製 -----	6
2-7-2. 放射線学的評価 -----	6
2-7-3. 骨欠損部における新生骨の骨量および骨塩量の測定 -----	7
2-7-4. 組織学的評価 -----	7
2-8. 統計手法 -----	7
3. 結果	
3-1. in vitro における bFGF 含有局所硬化デキストランゲルにおける bFGF 徐放試験 -----	7

3-2.	in vitro における BMP-2 含有局所硬化ヒアルロン酸ゲルにおける BMP-2 徐放試験 -----	7
3-3.	マウス単純骨折モデルに対する bFGF/IFHG-Dex の骨形成促進効果 -----	7
3-4.	マウス難治性骨折モデルに対する BMP-2/IFHG-HA の骨形成促進効果 --	7
3-5.	マウス巨大骨欠損モデルに対する BMP-2/IFHG-HA の骨形成促進効果 --	8
4.	考察 -----	8
5.	今後の課題 -----	10
6.	総括 -----	10
7.	謝辞 -----	10
8.	引用文献 -----	10
9.	業績目録 -----	15
10.	図表 -----	16

1. 序論

全骨折のうち約 5~10%では、遷延癒合や癒合不全などが生じると報告されている^{1,2}。特に、交通外傷などの高エネルギー外傷による骨折では、骨膜損傷や骨欠損を伴うことも多いため難治性となる。このような骨折部の遷延癒合や癒合不全は、最終的に偽関節や変形癒合を来して機能障害に繋がり、患者の QOL を著しく低下させる要因となる。また、治療やリハビリテーションが長期間に渡るため、患者の社会復帰は遅れ、社会的損害は多大である。したがって、骨形成促進法の開発は極めて重要な課題である。

骨形成促進法の一つに成長因子を局所に投与する方法がある。これまで、スポンジ、ゲルなどの様々な形状の担体を用いた成長因子徐放による骨形成促進法が報告されている³⁻⁵。骨形成を促進する成長因子として様々なもの知られているが、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF) や骨形成タンパク-2 (bone morphogenetic protein-2 : BMP-2) などが代表的である。

線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor : FGF) は 23 種類の構造類似性を持つポリペプチドファミリーで構成されており、血管新生や間葉系幹細胞の分化促進に重要な役割を果たしている^{6,7}。FGF ファミリーの中でも特に bFGF は骨基質へ多く蓄積しており、骨形成の初期段階、すなわち、間葉系幹細胞の増殖や軟骨形成の時期の骨膜に発現しており、骨芽細胞や軟骨細胞などの多くの細胞の増殖を促進する^{3,8-12}。動物モデル研究では、組換えヒト bFGF (rhbFGF) の局所投与は、骨折や骨欠損の再生や粗鬆骨の再生において骨形成性を示すことが報告されている¹³⁻¹⁵。さらに、臨床試験では、bFGF が骨切り術後や脛骨骨幹部骨折における骨癒合を促進することが報告されている^{3,10}。しかし、生体内では投与後にすみやかに局所から拡散してしまうことや、高用量の bFGF の使用は、血小板減少、腎毒性、悪性細胞活性化などの副作用を伴う可能性が報告されている¹⁶⁻¹⁸。

一方、骨形成タンパク (bone morphogenetic protein : BMP) は、骨誘導能を有するタンパクとして発見され、これまでに約 20 種が同定されている¹⁹。BMP は初期発生の体軸形成や器官形成において重要な役割を果たしているが、中でも BMP-2 は強力な骨誘導性を有し、局所投与により骨および軟骨の形成を促進すると報告されている^{4,5}。しかし、BMP-2 は単独で局所投与した場合は拡散してしまうため、骨形成効果の減弱や異所性骨化などの副作用を生じる可能性が懸念されている^{20,21}。したがって、これらの成長因子の使用においては、投与部位で成長因子を持続的に徐放する成長因子送達担体と併用することが望ましい。

成長因子送達担体としては様々な材料が報告されている。コラーゲンスポンジまたはハイドロキシアパタイトのような移植可能な担体は、骨折治癒を促進するために臨床的に使用されている。しかし、これらの生体材料は移植のために外科的処置を必要とし、侵襲的である²²。対照的に、注入可能な材料は、外科的な移植が必要な材料と比べて成長因子投与時の侵襲性が低いという利点があるが、投与後に周囲に拡散してしまうという欠点がある²³。近年、この注入型の移植材料として、過酸化水素水とワサビペルオキシダーゼ (horseradish

peroxidase : HRP) による酵素的架橋法を用いたヒドロゲルが注目されている。このヒドロゲルはデキストランやヒアルロン酸などの天然多糖類からなり、局所投与後にゲル化して硬化する²⁴。一般的に *in situ-forming hydrogel* (IFHG) として知られ、良好な細胞適合性、反応速度の調節が可能、基質特異性など、生物医学的用途に適した特性を有しており、組織工学、軟骨修復、創傷治癒などへの応用とその有用性が示されている²⁵⁻²⁷。しかし、IFHG を bFGF や BMP-2 の送達担体として骨折治療へ使用した場合の骨形成促進効果については不明である。

bFGF は骨折治癒過程の初期段階において、骨膜組織に存在する未分化間葉系細胞の増殖を促進する¹⁴。従って、bFGF 投与は骨膜組織が残存している単純骨折症例における骨形成の促進に有用であると考えられる。また、デキストランは bFGF の安定化剤として作用すると報告されている²⁸。これらの理由から、成長因子として bFGF を用い、その送達担体としてデキストランを主骨格とする IFHG と併用し、自然治癒するマウス単純骨折モデルに対する骨形成促進効果を検討した。

一方、骨膜が損傷された難治性骨折や、巨大骨欠損を伴うような骨折に対しては、bFGF が骨形成促進効果を発揮できない可能性が考えられる。このような難治性の骨折の場合、異所性骨化を誘導可能な BMP-2 が成長因子として有用であると考えられる。また、骨折治療における BMP-2 の送達担体として、ヒアルロン酸ゲルの有用性が報告されている²⁹⁻³⁶。これらの理由から、ヒアルロン酸を主骨格とする IFHG と BMP-2 を併用し、骨膜を焼灼したマウス難治性骨折モデル、および、自然治癒不可能なマウス巨大骨欠損モデルに対する骨形成促進効果を検討した。

2. 方法

2-1. 局所硬化デキストランゲルの作製

過去の報告を参考にして、デキストランと *p*-nitrophenyl chloroformate (PNC) を組み合わせて *p*-ニトロフェニルカーボネートの誘導体を形成し、これをアミノリシス反応によりチラミン (Tyramine : TA) で処理してデキストラン-チラミン抱合体 (Dex-TA) を合成した³⁷。デキストラン (40 g, 471 mmol OH, Meito Sangyo Co., Ltd., Nagoya, Japan) を *N,N*-dimethylformamide (DMF, 1,600 mL, LiCl 30.9 g 含有) に 90°C の窒素下で溶解後、0°C に冷却し、PNC (23.8 g, 120 mmol) とピリジン (9.2 ml) を攪拌しながら溶解させた。デキストランと PNC と水酸基の供給モル比は約 0.25 であった。次いで、*p*-ニトロフェニルカーボネート基で活性化されたデキストラン (Dex-PNC) を冷却したエタノール (2,000 ml) 中で沈殿させたのちに濾過し、エタノールおよびジエチルエーテルで慎重に洗浄後に真空オープン中で乾燥した。その後、Dex-PNC を DMF 740 mL に溶解し、窒素下で TA (9.1 g, 65 mmol) を加え室温で 3 時間反応させた。生成物を冷却したエタノール (800 mL) 中で沈殿させたのちに濾過し、ジエチルエーテルおよびエタノールで洗浄した。得られた Dex-TA 抱合体を、限外濾過および凍結乾燥後の単離を用いてさらに精製した。局所硬化デキストランゲル (IFHG-Dex) は、触媒酵素としての

HRP、および 10 mM リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline : PBS; pH 7.4) 中の過酸化水素水の存在下で Dex-TA ポリマーを架橋することによって作製した。具体的には、Dex-TA と bFGF (1 μ g) または PBS を含む 0.8 単位/mL の HRP 溶液 (最終濃度 : 2 % w/v) と、過酸化水素水溶液 (最終濃度 : 4 mM) とを混和することで IFGF-Dex 作製した。

2-2. in vitro における bFGF 含有局所硬化デキストランゲルにおける bFGF 徐放試験

IFHG-Dex からの bFGF の徐放性を評価するために、0.5 mL のプラスチック製マイクロチューブに 1 μ g の bFGF を含有させた IFHG-Dex 25 μ L を注入し、次いで 200 μ l の PBS をチューブに追加した。マイクロチューブを 37 °C の恒温槽に留置し、開始後 1、4、8、24、48 時間の時点で、PBS を採取して新しい PBS に交換し、開始後 72 時間の時点まで PBS を採取した。bFGF は骨折治癒の初期段階において未分化間葉系細胞に増殖促進作用を示すことが報告されているため¹⁴、72 時間後までの観察とした。採取した各時間帯の PBS は -30 °C で保存し、市販の ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いて PBS 中の bFGF 濃度を推定した。

2-3. 局所硬化ヒアルロン酸ゲルの作製

過去の報告を参考にして、ヒアルロン酸 (HA) -チラミン (TA) 共役体を合成した^{38, 39}。具体的には、TA (最終濃度 12.5 mM ; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を 25 mM 50 kDa HA 溶液 (Kewpie Corporation Fine Chemical Division, Tokyo, Japan) に溶解し、2.5 mM 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (FUJI- FILM Wako Pure Chemical Corporation) と 2.5 mM N-ヒドロキシスクシンイミド (FUJI- FILM Wako Pure Chemical Corporation) を加え、共役反応を開始した。0.1 M NaOH を添加し、反応中の pH を 4.7 に維持した。室温で一晩攪拌した後、溶液の pH を 7.0 に上昇させ、分画分子量 1 kDa のチューブを用いて透析を行った。透析は、チューブ内で塩化ナトリウム 100 mM 溶液に対して 2 日間、蒸留水とエタノールの混合物 (混合比 3:1) に対して 1 日間、蒸留水に対して 1 日間行った。最終的に精製液を凍結乾燥して HA-TA を得た。IFHG-HA は、触媒酵素としての HRP (FUJI-FILM Wako Pure Chemical Corporation)、および 10 mM PBS (pH 7.4) 中の過酸化水素水の存在下で HA-TA ポリマーを架橋することによって調製した。HA-TA ポリマー溶液 (最終濃度 2 % w/v) を、2 μ g の BMP-2 (PEPRO-TECH, Inc. Rocky Hill, NJ, USA) あるいは PBS (IFH-HA/PBS) と、過酸化水素水溶液 (最終濃度 4 mM) を含む 0.8 単位/mL の HRP 溶液 (最終濃度 0.8 単位/mL) を混和することで、IFHG-HA を作製した。

2-4. in vitro での BMP-2 含有局所硬化ヒアルロン酸ゲルにおける BMP-2 徐放試験

IFHG-HA からの BMP-2 の徐放性を評価するために、0.5 mL のプラスチック製マイクロチューブに 2 μ g の BMP-2 を含有させた IFHG-HA 25 μ L を注入し、次いで 200 μ l の PBS をチュ

ープに追加した。マイクロチューブを 37 °C の恒温槽に留置し、1、4、8、24、48、96 時間、1、2、3 週間の時点で、PBS を採取して新しい PBS に交換し、開始後 3 週間の時点まで PBS を採取した。BMP-2 のシグナル伝達は骨治癒の初期段階で開始され、また、軟骨および骨形成の後期においても重要であるとされるため⁴⁰⁻⁴²、6 週までの観察を予定した。しかし、ゲルと PBS の境界が不明瞭となり 6 週時点の PBS は回収不可能であった。採取した各時間帯の PBS は -30 °C で保存し、BMP-2 ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いて PBS 中の BMP-2 濃度を推定した (n = 5)。

2-5. マウス単純骨折モデルにおける bFGF 含有 IFHG-Dex の骨形成促進効果の検討

2-5-1. マウス単純骨折モデルの作製

9 週齢の雄性の C57BL/6J マウスを用いた (Charles River Laboratories Japan, Inc., Yokohama, Japan)。無菌条件下で左大腿部外側を 10 mm 切開し、筋間を展開して大腿骨骨幹部を露出した。左膝蓋骨は、膝蓋骨外側縁を 4 mm 切開し内側に脱臼した。顆間窩にドリルで 0.5 mm の穴を開けた後、ステンレス製の針 (直径 0.5 mm) を髓腔内に逆行的に挿入した。大腿骨骨幹部中央を直径 0.22 mm のワイヤーソーを用いて骨切りし、ステンレス針の髓腔内挿入で安定化させ、マウス単純骨折モデルとした。骨折のみの群 (control 群)、骨折部に IFHG-Dex 25 μ L のみを投与した群 (Dex 群)、骨折部に 1 μ g の bFGF 含有 IFHG-Dex 25 μ L を投与した群 (bFGF+Dex 群) を作成した (各群 n = 8)。bFGF の投与量は過去の報告に準拠した⁴³。各群において、骨折後 4 週で屠殺して大腿骨を採取後 micro CT を撮影し、新生骨の骨量 (bone volume : BV) および骨塩量 (bone mineral content : BMC) を測定した。また、組織学的評価を行った。マウスは、研究期間中は 12 時間明暗サイクル下で、温度 23 ± 2 °C、湿度 55 ± 10 % に維持されたセミバリア動物収容システムで飼育した。すべての動物実験は、北里大学動物倫理委員会のガイドライン (承認番号 : 2019-127) に準拠して実施した。

2-5-2. 新生骨の骨量および骨塩量の測定

すべてのマウスは処置後 4 週で屠殺して周囲の筋肉とともに大腿骨を摘出し、4 %パラホルムアルデヒド中で 48 時間、4 °C で固定した。大腿骨を PBS に移し、マイクロフォーカス X 線 CT システム (inspeXio SMX-90CT ; Shimadzu, Tokyo, Japan) を用いて、加速電圧 90 kV、電流 110 mA、ボクセルサイズ 20 μ m/pixel、マトリックスサイズ 1,024 \times 1,024 の条件で撮影した。過去の報告に準拠し^{23, 44}、得られた大腿骨全体の CT 画像を 3 次元 (3D) 画像解析ソフトウェアアプリケーション (Tri-3D-Bon ; Ratoc System Engineering, Tokyo, Japan) を用いて解析し、骨折部を中心とした 10 mm 幅 (500 スライス) における新生骨の骨量および骨塩量を定量化した。新生骨は閾値 300 mg/cm^3 以上の領域とした。

2-5-3. 組織学的評価

処置後 4 週で摘出した大腿骨を 20 %エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA) 溶液中で 4 週間脱灰した。その後、組織をパラフィンに包埋し、大腿骨の長軸

に沿って矢状面で 3 μm の切片とした。各大腿骨の切片は、ヘマトキシリンおよびエオジン (HE) 染色を行い組織学的に評価した。

2-6. マウス難治性骨折モデルにおける BMP-2 含有 IFHG-HA の骨形成促進効果の検討

2-6-1. マウス難治性骨折モデルの作製

マウス単純骨折モデルと同様の手順で骨切りおよび髓腔内固定を行ったあと、骨折部を中心に約 3 mm 幅の骨膜を全周性にバイポーラピンセット (AARON940、Bovie Medical Corporation, NY, USA) を用いて 1.2 W の電力設定で 10 秒間焼灼した。本研究の予備研究では、非焼灼モデルでは 4 週目に骨癒合が得られたが、焼灼モデルでは、焼灼部位での骨形成は不良であり、骨折後 6 週時点でも骨癒合は得られなかった (図 1)。したがって、本研究ではこの骨膜焼灼モデルを難治性骨折モデルとした。焼灼のみの群 (control 群)、焼灼部に IFHG-HA 25 μL のみを投与した群 (IFHG-HA 群)、2 μg の BMP-2 含有 IFHG-HA 25 μL を投与した群 (IFHG-HA/BMP 群) を作製した (各群 $n=16$)。BMP-2 の投与量は過去の報告に準拠した⁴⁵。処置後 6 週で屠殺して大腿骨を採取後、各群とも 10 匹分の大腿骨は micro CT を撮影し、骨膜焼灼部における BV、BMC を測定したほか、骨癒合率の評価や組織学的評価を行った。残りの 6 匹分の大腿骨は新生仮骨における骨形成マーカー発現を real time PCR 法を用いて評価した。マウスは、2-3-1 と同様の条件下で飼育した。すべての動物実験は、北里大学動物倫理委員会のガイドライン (承認番号: 2019-084) に準拠して実施した。

2-6-2. 骨膜焼灼部における新生骨の骨量および骨塩量の測定

処置後 6 週に大腿骨を摘出後、2-3-2 と同様の条件でマイクロ CT を撮影した。得られた CT データを解析し、大腿骨の骨膜焼灼部 3mm 幅の領域 (150 スライス) の新生骨の骨量および骨塩量を定量化した。新生骨は閾値 300 mg/cm^3 以上の領域とした^{23,44}。骨癒合率は、CT 画像上で骨折部の前方・後方・内側・外側の 4 方向のうち、2 方向以上で新生仮骨が骨折部を架橋して連続性が認められるものを骨癒合ありとした。

2-6-3. 組織学的評価

採取した大腿骨をカルボキシメチルセルロース (CMC) ゲルで包埋後、ヘキサソ、ドライアイスを使用して凍結させた。凍結されたブロックは、CM 3050S IV クライオミクロトーム (Leica Instruments, Heidelberg, Germany) に設置し、-25 $^{\circ}\text{C}$ に維持されたクライオチェンバーでタングステンカーバイドブレードを使用して厚さ 6 μm の切片に切断し、-25 $^{\circ}\text{C}$ で乾燥させた。切断面はクライオフィルム (Finetec, Tokyo, Japan) で覆った。連続切片を Von Kossa 染色で染色し、組織学的に評価した (Kureha Special Laboratory Co., Ltd., Tokyo, Japan)。骨膜焼灼部 3 mm 幅の領域に生じた新生骨の面積を、ImageJ version 1.52 (National Institutes of Health, Bethesda, MD) のフリーハンドトレーシングツールを用いて定量化した ($n=10$)。

2-6-4. real time PCR

処置後 6 週で屠殺し、各群のマウス大腿骨の骨膜焼灼部の新生仮骨を採取した。仮骨から

Total RNA を抽出し、SuperScript III RT (Invitrogen 社) を用いて過去の報告通りに cDNA 合成を行った⁴⁶。骨形成マーカーであるアルカリホスファターゼ (*Alpl*)、オステオカルシン (*Bglap*) およびオステリックス (*Osx*) の遺伝子発現を real time PCR 法を用いて評価した。定量 PCR はリアルタイム PCR 検出システム (CFX-96; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて行った。PCR 反応は、95 °C で 60 秒、その後、95 °C で 5 秒間、および 60 °C で 30 秒間を 40 サイクルとした。標的遺伝子の mRNA 発現レベルはグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (*Gapdh*) を用いて標準化した。プライマーはプライマーブラストソフトを用いて設計し、北海道システムサイエンス株式会社(札幌、日本)が合成した以下のプライマーを使用した。
Alpl-sense 5'-CCACTATGTCTGGAACCGCA-3' および *Alpl*-antisense 5'-GAGAGCGAAGGGTCAGTCAG-3' (プロダクトサイズ 132 bp) を用いた。*Bglap*-センス 5'-AGTGTGAGCT TAACCCTGCT-3' および *Bglap*-アンチセンス 5'-ATAGATGC GTTTGTAGGCGGT-3' (製品サイズ 74 bp) ; *Osx*-センス 5'-GCTGCGGGTATCCTGACTCT-3' および *Osx*-アンチセンス 5'-CGGTGGTAGTTACGGTCCG-3' (プロダクトサイズ 187 bp) ; *Gapdh* センス 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'、および *Gapdh*-アンチセンス 5'-ACACATTGGGGGTAGGAA CA-3' (プロダクトサイズ 223 bp)。各遺伝子の mRNA 発現は、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて *Gapdh* の発現で補正し正規化した。

2-7. マウス巨大骨欠損モデルにおける BMP-2 含有 IFHG-HA の骨形成促進効果の検討

2-7-1. マウス巨大骨欠損モデルの作製

本実験には、24 匹の 9 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (Charles River Laboratories Japan, Inc., Yokohama, Japan) を用いた。マウスの右大腿骨の中央に自然治癒不可能な 2 mm の骨欠損部を作製し、MouseExFix Simple L® (Research Implant System, RIS, Davos, Switzerland) で固定したものを巨大骨欠損モデルとした。骨欠損のみ群 (control 群)、骨欠損部に IFHG-HA 25 mL のみを投与した群 (IFHG-HA 群)、骨欠損部に 2 μ g の BMP-2 含有 PBS 25 mL を投与した群 (PBS/BMP 群)、骨欠損部に 2 μ g の BMP-2 含有 IFHG-HA 25 mL を投与した群 (IFHG-HA/BMP 群) を作製した (各群 n=6)。また、実用化を見据え、ゲルを PBS に置き換えた PBS/BMP-2 群を作製し、比較検討を行った。処置直後および 14 日後に軟 X 線撮影を行い、骨形成を評価した。術後 14 日で屠殺して大腿骨を採取後に micro CT を撮影し、骨欠損部における BV、BMC を測定した。また、組織学的を行った。マウスは、2-3-1 と同様の条件下で飼育した。すべての手術および取り扱いは、北里大学動物倫理委員会のガイドライン (許可番号: 2019-127) に準拠して行った。

2-7-2. 放射線学的評価

新生骨形成評価のため、処置後 0 日、および、14 日目に、X 線装置 (SOFTEX-CMB4; SOFTEX Corporation, Kanagawa, Japan) を用いて麻酔下で大腿骨の軟 X 線撮影を行った。X 線は、X-Ray IX Industrial Film (Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、露光時間 10 秒、電圧 35 kV、

電流 3.0 mA で撮影した。

2-7-3. 骨欠損部における新生骨の骨量および骨塩量の測定

すべてのマウスは処置後 14 日で屠殺して周囲の筋肉とともに大腿骨を摘出した。2-3-2 と同様の方法で大腿骨を固定し、また、同様の条件でマイクロ CT を撮影した。得られた CT データを解析し、大腿骨の骨欠損部領域の新生骨の骨量および骨塩量を定量化した（欠損部中央を中心とする 1500 スライス）。新生骨は閾値 100 mg/cm^3 以上の領域とした。

2-7-4. 組織学的評価

処置後 14 日で大腿骨を摘出し、2-3-3 と同様の方法で HE 染色を行い、組織学的に評価した。

2-8. 統計手法

すべての統計分析は、SPSS (バージョン 25.0; SPSS, Chicago, IL, USA) を使用して実施した。グループ間の差を分析するために、one-way ANOVA に続いて Bonferroni の post-hoc 比較検定を採用した。統計的有意性の指標として $p < 0.05$ を用いた。

3. 結果

3-1. in vitro における bFGF 含有局所硬化デキストランゲルにおける bFGF 徐放試験

in vitro における IFHG-Dex からの bFGF 徐放試験の結果を図 2 に示す。bFGF は最初の 4 時間のあいだに多く徐放され、その後の徐放量は低下するが、開始後 72 時間時点でも徐放は続いていた。

3-2. in vitro における BMP-2 含有局所硬化ヒアルロン酸ゲルにおける BMP-2 徐放試験

IFHG-HA からの BMP-2 徐放量は、最初の 4 時間で多く徐放された (図 3)。その後の徐放量は低下するが、開始後 3 週間後も徐放は続いていた。

3-3. マウス単純骨折モデルに対する bFGF/IFHG-Dex の骨形成促進効果

bFGF+Dex 群は、control 群、Dex 群と比較して、BV、BMC とも有意に高値であった ($p < 0.05$ 、図 4)。control 群、Dex 群の間に BV、BMC の有意差はなかった。3D-CT 像では、bFGF+Dex 群は、control 群、Dex 群と比較して大きな新生仮骨を認めた (図 5)。組織学的評価では、bFGF+Dex 群は、control 群、Dex 群よりも大きい新生仮骨の形成を認めた。(図 6)。control 群、Dex 群の新生仮骨の大きさは同等であった。

3-4. マウス難治性骨折モデルに対する BMP-2/IFHG-HA の骨形成促進効果

IFHG-HA/BMP 群は、control 群、IFHG-HA 群と比較して BV、BMC とも有意に高値だった ($p < 0.05$ 、図 7)。IFHG-HA/BMP 群は、micro CT 画像 (図 8) および組織切片標本 (図 9)

において新生仮骨による骨折部の架橋を認め、骨癒合率(表 1)も有意に高かった。一方、control 群、および、IFHG-HA 群では骨膜焼灼部における新生骨はほとんど認められなかった。骨膜焼灼部における新生骨の断面積は、IFHG-HA/BMP 群が有意に高かった。新生仮骨中の骨形成マーカーAlpl、Bglap、Osx の発現量は、IFHG-HA/BMP-2 群が IFHG-HA 群および control 群に比べて有意に上昇していた ($p < 0.05$ 、図 10)。一方、IFHG-HA 群と control 群との間の骨形成マーカー発現量は同等であった。

3-5. マウス巨大骨欠損モデルに対する BMP-2/IFHG-HA の骨形成促進効果

軟 X 線撮影、および、3D-CT 像では、IFHG-HA/BMP 群と PBS/BMP 群で骨欠損部に新生骨を認めた(図 11、12)。対照的に、IFHG-HA 群と control 群のマウスでは、新生骨形成はほとんど認めなかった。また、IFHG-HA/BMP 群と PBS/BMP 群では、IFHG-HA 群や control 群と比較して、BV、BMC が有意に増加していた ($p < 0.001$ 、図 13)。さらに、IFHG-HA/BMP 群は、PBS/BMP 群と比較して、BV、BMC が有意に高値であった ($p < 0.001$ 、図 13)。組織学的評価では、IFHG-HA/BMP 群と PBS/BMP 群で、骨欠損部に多量の海綿骨を認めたが、defect 群、IFHG-HA 群の骨欠損部では線維性組織が存在し、海綿骨は認められなかった(図 14)。

4. 考察

本邦の年齢別の交通事故負傷者数は、20 歳代前半をピークに 10 歳代後半から 30 歳代にかけて多いと報告されている。そのため、交通事故による骨折を模擬するため、モデルマウスの週齢はヒトの若者に相当する 9 週齢を選択した。

過去の研究では、パウダー、シート、スポンジ、ゲルなど様々な形態を持つ担体と bFGF を併用することで、骨形成を促進する効果があることが報告されている^{3, 13-15, 23, 43, 47}。本研究では、bFGF の担体としてデキストランを主骨格とする局所硬化ゲルを用い、マウス単純骨折モデルにおける骨形成促進効果を検討した。マウス単純骨折モデルは自然治癒するため、対照群より大きな新生仮骨が形成されるかどうかを検討した。局所硬化ゲルの主骨格を成すデキストランは、酸や熱による不活性化やタンパク質分解から bFGF を保護し、安定化剤として作用すると報告されている²⁸。また、デキストランゲルは bFGF を徐放し、血管新生を促進すると報告されている⁴⁸。本研究では、1 μg の bFGF と IFHG-Dex を併用することで、マウスの単純骨折モデルにおいて骨形成促進し、大きな新生仮骨が形成された。先行研究では、マウス単純骨折モデルにおいて、1 μg の bFGF と人工コラーゲンゲルを併用しても骨形成の促進には至らないことを示した²³。また、10 μg の bFGF と人工コラーゲンパウダーを骨折部位に投与しても骨形成は促進されなかった⁴³。本研究で用いた IFHG-Dex は、局所硬化することで bFGF の拡散を最小限に防ぎ、その結果骨形成を促進し大きな新生仮骨を形成した可能性が考えられた。したがって、IFHG-Dex は骨形成促進剤としての bFGF の担体として有用である可能性が示唆された。

bFGF は骨折治癒の初期段階において未分化間葉系細胞に増殖促進作用を示すことが報告されている¹⁴。bFGF は体内に直接投与すると急速に拡散する。しかし、骨折治癒過程の初期段階に作用すると考えられているため、拡散を最小限にするためには、投与部位局所で徐放させることが重要である^{14, 16}。本研究では、bFGF 含有 IFHG-Dex からの bFGF 徐放量は、投与後最初の 4 時間において多かった。その後、徐放量は減少したが、72 時間後の PBS 溶液中の bFGF 濃度は 38.7 ng/mL であった。過去の報告では、bFGF は *in vitro* において、1 ng/mL の濃度で骨膜細胞に対して増殖活性を示す⁴⁹。また、マウス骨折モデルでは、骨膜細胞の増殖は骨折発生後 1 日目から 3 日目までに起こっている^{50, 51}。したがって、bFGF 含有 IFHG-Dex は、骨折治癒過程の初期において細胞増殖促進効果を発揮するのに十分な量の bFGF を放出すると推測される。

一方で、bFGF 含有 IFHG-Dex は骨折治癒過程の初期の骨膜に作用するため、骨折治癒に不可欠な骨膜を焼灼して破壊した難治性骨折モデルや、自然治癒不可能な巨大骨欠損モデルにおいては、骨形成促進効果が認められない可能性が考えられた。そのため、成長因子を強力な骨誘導能を有する BMP-2 に変更し、また、局所硬化ゲルの主骨格を BMP-2 の送達担体として有用性が報告されているヒアルロン酸に変更した。過去の研究では、注射または移植可能なヒアルロン酸ゲルは BMP-2 を保持し、生体内で骨形成を促進するとの報告が散見される²⁹⁻³⁶。本研究では、局所投与可能であり、かつ、投与後に局所で硬化するヒアルロン酸ゲルを用いた。この BMP-2 含有 IFHG-HA は、マウス難治性骨折モデルやマウス巨大骨欠損モデルにおいて、骨形成を促進した。IFHG-HA は、注射可能な材料であり、移植可能な材料であるという利点を有しているほか、難治性骨折や巨大骨欠損においても骨形成能を認め、ゲルからの BMP-2 拡散による副作用の発生を最小限に抑えることができる可能性がある。したがって、BMP-2 含有 IFHG-HA は、臨床現場において、難治性骨折や巨大骨欠損の治癒を促進するための有望な材料となる可能性がある。

BMP-2 のシグナル伝達は骨治癒の初期段階で開始され、炎症反応と骨膜の活性化をもたらす。BMP-2 はさらに、軟骨および骨形成の後期においても重要である⁴⁰⁻⁴²。したがって、骨折治癒過程において骨形成を促進するためには、BMP-2 を長期的かつ持続的に徐放させることが重要である。本研究で行った徐放試験では、投与した BMP-2 の 23 %が最初の 4 時間のあいだに IFHG-HA から放出された。その後、徐放率は緩やかなレベルに低下したが、間葉系幹細胞の ALP 活性を高めるのに必要な量^{52, 53}に相当する約 100 ng/ml の BMP-2 が、2 週間と 3 週間のあいだに放出された。また、BMP-2 は転写因子オステリックスを介して骨芽細胞の分化を刺激する^{53, 54}。本研究では、BMP-2 投与 6 週間後にもオステリックスの mRNA 発現が増加し、分化マーカーであるアルカリホスファターゼとオステオカルシンの発現も増加していた。したがって、BMP-2 含有 IFHG-HA は、骨折治癒過程における後期の段階においても骨形成を刺激している可能性がある。以上のことから、BMP-2 含有 IFHG-HA は難治性骨折や巨大骨欠損などにおける骨形成を促進するための有用な材料である可能性が示唆される。

5. 今後の課題

本研究では、生体内におけるゲルや bFGF、BMP-2 の分布や、投与後の正確な骨形成促進メカニズムを明らかにしていない。また、小動物モデル（マウス）から得られた知見であり、ヒトへ使用する際は bFGF や BMP-2 が高用量となることが予想されるため、適切ではない可能性がある。そのため、中・大動物を用いて更なる検討をする必要があると考える。また、他の生理活性物質との比較実験を行っていないため、他の担体との比較実験が必要であると考える。

6. 総括

IFHG-Dex と bFGF を併用して骨折部に投与することで、骨形成を促進することができた。この bFGF 含有 IFHG-Dex は、bFGF の活性を保持し、骨形成促進法として有用である可能性がある。また、BMP-2 含有 IFHG-HA は、マウス難治性骨折モデルやマウス巨大骨欠損モデルにおいて骨形成を促進することができた。BMP-2 含有 IFHG-HA は、BMP-2 の活性を保持し、骨膜損傷や広範な骨欠損を伴う難治例に対する骨形成促進法として有用である可能性がある。

7. 謝辞

本研究を終えるにあたり、御指導いただきました北里大学医学部整形外科学 高相晶士教授、井上玄診療教授、内田健太郎講師、技術員の大貫裕子さんに深謝いたします。また、動物実験をする際には、動物実験センターの皆様方に大変お世話になりました。最後に、この調査の一部は、北里大学医学部院生プロジェクト研究、けやき会研究助成、日本損害保険協会交通事故医療一般研究助成からの助成を受けたものです。

8. 引用文献

1. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 1995; 77(6): 940-56.
2. Buza JA, 3rd, Einhorn T. Bone healing in 2016. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2016; 13(2): 101-5.
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(12): 2735-43.
4. Aro HT, Govender S, Patel AD, Hernigou P, Perera de Gregorio A, 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(9): 801-8.
5. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective,

- controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84(12): 2123-34.
6. Nakamura S, Nambu M, Ishizuka T, Hattori H, Kanatani Y, Takase B, et al. Effect of controlled release of fibroblast growth factor-2 from chitosan/fucoidan micro complex-hydrogel on in vitro and in vivo vascularization. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 85(3): 619-27.
 7. Varkey M, Kucharski C, Haque T, Sebald W, Uludag H. In vitro osteogenic response of rat bone marrow cells to bFGF and BMP-2 treatments. *Clin Orthop Relat Res.* 2006; 443: 113-23.
 8. 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(1): 79-87.
 9. Bourque WT, Gross M, Hall BK. Expression of four growth factors during fracture repair. *Int J Dev Biol.* 1993; 37(4): 573-9.
 10. 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(4): 480-7.
 11. Khan SN, Bostrom MP, Lane JM. Bone growth factors. *Orthop Clin North Am.* 2000; 31(3): 375-88.
 12. Canalis E, Centrella M, McCarthy T. Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J Clin Invest.* 1988; 81(5): 1572-7.
 13. 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(6): 654-9.
 14. 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(2): 774-81.
 15. 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(2): 307-13.
 16. Zhao W, Chen B, Li X, Lin H, Sun W, Zhao Y, et al. Vascularization and cellularization of collagen scaffolds incorporated with two different collagen-targeting human basic fibroblast growth factors. *J Biomed Mater Res A.* 2007; 82(3): 630-6.
 17. Epstein SE, Fuchs S, Zhou YF, Baffour R, Kornowski R. Therapeutic interventions for

- enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards. *Cardiovasc Res.* 2001; 49(3): 532-42.
18. Unger EF, Goncalves L, Epstein SE, Chew EY, Trapnell CB, Cannon RO, 3rd, et al. Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast growth factor in stable angina pectoris. *Am J Cardiol.* 2000; 85(12): 1414-9.
 19. Rider CC, Mulloy B. Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochem J.* 2010; 429(1): 1-12.
 20. Carragee EJ, Chu G, Rohatgi R, Hurwitz EL, Weiner BK, Yoon ST, et al. Cancer risk after use of recombinant bone morphogenetic protein-2 for spinal arthrodesis. *J Bone Joint Surg Am.* 2013; 95(17): 1537-45.
 21. Mesfin A, Buchowski JM, Zebala LP, Bakhsh WR, Aronson AB, Fogelson JL, et al. High-dose rhBMP-2 for adults: major and minor complications: a study of 502 spine cases. *J Bone Joint Surg Am.* 2013; 95(17): 1546-53.
 22. Uchida K, Inoue G, Matsushita O, Horikawa K, Sekiguchi H, Saito W, et al. Basic Fibroblast Growth Factor-Anchored Multilayered Mesenchymal Cell Sheets Accelerate Periosteal Bone Formation. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 4371460.
 23. 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(6): 1372-8.
 24. Chen F, Yu S, Liu B, Ni Y, Yu C, Su Y, et al. An Injectable Enzymatically Crosslinked Carboxymethylated Pullulan/Chondroitin Sulfate Hydrogel for Cartilage Tissue Engineering. *Sci Rep.* 2016; 6: 20014.
 25. Jin R, Teixeira LS, Dijkstra PJ, van Blitterswijk CA, Karperien M, Feijen J. Enzymatically-crosslinked injectable hydrogels based on biomimetic dextran-hyaluronic acid conjugates for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2010; 31(11): 3103-13.
 26. Jin R, Moreira Teixeira LS, Dijkstra PJ, Zhong Z, van Blitterswijk CA, Karperien M, et al. Enzymatically crosslinked dextran-tyramine hydrogels as injectable scaffolds for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2010; 16(8): 2429-40.
 27. Jin R, Moreira Teixeira LS, Dijkstra PJ, van Blitterswijk CA, Karperien M, Feijen J. Chondrogenesis in injectable enzymatically crosslinked heparin/dextran hydrogels. *J Control Release.* 2011; 152(1): 186-95.
 28. Kajio T, Kawahara K, Kato K. Stabilization of basic fibroblast growth factor with dextran sulfate. *FEBS Lett.* 1992; 306(2-3): 243-6.
- Huang H, Feng J, Wismeijer D, Wu G, Hunziker EB. Hyaluronic Acid Promotes the

- Osteogenesis of BMP-2 in an Absorbable Collagen Sponge. *Polymers (Basel)*. 2017; 9(8).
29. Huang H, Feng J, Wismeijer D, Wu G, Hunziker EB. Hyaluronic Acid Promotes the Osteogenesis of BMP-2 in an Absorbable Collagen Sponge. *Polymers (Basel)*. 2017; 9(8).
 30. Kisiel M, Klar AS, Ventura M, Buijs J, Mafina MK, Cool SM, et al. Complexation and sequestration of BMP-2 from an ECM mimetic hyaluronan gel for improved bone formation. *PLoS One*. 2013; 8(10): e78551.
 31. Todeschi MR, El Backly RM, Varghese OP, Hilborn J, Cancedda R, Mastrogiacomo M. Host cell recruitment patterns by bone morphogenetic protein-2 releasing hyaluronic acid hydrogels in a mouse subcutaneous environment. *Regen Med*. 2017; 12(5): 525-39.
 32. Kim SK, Cho TH, Han JJ, Kim IS, Park Y, Hwang SJ. Comparative study of BMP-2 alone and combined with VEGF carried by hydrogel for maxillary alveolar bone regeneration. *Tissue Eng Regen Med*. 2016; 13(2): 171-81.
 33. Martinez-Sanz E, Ossipov DA, Hilborn J, Larsson S, Jonsson KB, Varghese OP. Bone reservoir: Injectable hyaluronic acid hydrogel for minimal invasive bone augmentation. *J Control Release*. 2011; 152(2): 232-40.
 34. Eckardt H, Christensen KS, Lind M, Hansen ES, Hall DW, Hvid I. Recombinant human bone morphogenetic protein 2 enhances bone healing in an experimental model of fractures at risk of non-union. *Injury*. 2005; 36(4): 489-94.
 35. Lee JH, Kim J, Baek HR, Lee KM, Seo JH, Lee HK, et al. Fabrication of an rhBMP-2 loaded porous beta-TCP microsphere-hyaluronic acid-based powder gel composite and evaluation of implant osseointegration. *J Mater Sci Mater Med*. 2014; 25(9): 2141-51.
 36. Zhang Y, Chen H, Zhang T, Zan Y, Ni T, Cao Y, et al. Injectable hydrogels from enzyme-catalyzed crosslinking as BMSCs-laden scaffold for bone repair and regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019; 96: 841-9.
 37. Jin R, Hiemstra C, Zhong Z, Feijen J. Enzyme-mediated fast in situ formation of hydrogels from dextran-tyramine conjugates. *Biomaterials*. 2007; 28(18): 2791-800.
 38. Jin R, Moreira Teixeira LS, Dijkstra PJ, Karperien M, van Blitterswijk CA, Zhong ZY, et al. Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2009; 30(13): 2544-51.
 39. Lee F, Chung JE, Kurisawa M. An injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogel system for protein delivery. *J Control Release*. 2009; 134(3): 186-93.
 40. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2002; 17(3): 513-20.
 41. Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Weber H, Bail HJ, Duda GN, et al. Insight into the

- molecular pathophysiology of delayed bone healing in a sheep model. *Tissue Eng Part A*. 2010; 16(1): 191-9.
42. Niikura T, Hak DJ, Reddi AH. Global gene profiling reveals a downregulation of BMP gene expression in experimental atrophic nonunions compared to standard healing fractures. *J Orthop Res*. 2006; 24(7): 1463-71.
 43. 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(9): 3049-55.
 44. Sekiguchi H, Uchida K, Matsushita O, Inoue G, Nishi N, Masuda R, et al. Basic Fibroblast Growth Factor Fused with Tandem Collagen-Binding Domains from *Clostridium histolyticum* Collagenase ColG Increases Bone Formation. *Biomed Res Int*. 2018; 2018: 8393194.
 45. Tazawa R, Minehara H, Matsuura T, Kawamura T, Uchida K, Inoue G, et al. Effect of Single Injection of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2-Loaded Artificial Collagen-Like Peptide in a Mouse Segmental Bone Transport Model. *Biomed Res Int*. 2019; 2019: 1014594.
 46. 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(7): 1098-108.
 47. 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(3): 035014.
 48. Dogan AK, Gumusderelioglu M, Aksoz E. Controlled release of EGF and bFGF from dextran hydrogels in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005; 74(1): 504-10.
 49. 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(6): 1737-43.
 50. Wang T, Zhang X, Bikle DD. Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing. *J Cell Physiol*. 2017; 232(5): 913-21.
 51. Murao H, Yamamoto K, Matsuda S, Akiyama H. Periosteal cells are a major source of soft callus in bone fracture. *J Bone Miner Metab*. 2013; 31(4): 390-8.
 52. Cha JK, Lee JS, Kim MS, Choi SH, Cho KS, Jung UW. Sinus augmentation using BMP-2 in

- a bovine hydroxyapatite/collagen carrier in dogs. *J Clin Periodontol.* 2014; 41(1): 86-93.
53. Kadowaki A, Tsukazaki T, Hirata K, Shibata Y, Okubo Y, Bessho K, et al. Isolation and characterization of a mesenchymal cell line that differentiates into osteoblasts in response to BMP-2 from calvariae of GFP transgenic mice. *Bone.* 2004; 34(6): 993-1003.
 54. Celil AB, Campbell PG. BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways. *J Biol Chem.* 2005; 280(36): 31353-9.

9. 業績目録

1. Shoji S, Uchida K, Inoue G, Takata K, Mukai M, Aikawa J, Iwase D, Takano S, Sekiguchi H, Takaso M. Increase in CD5L expression in the synovial membrane of knee osteoarthritis patients with obesity. *Cent Eur J Immunol.* in press.
2. Shoji S, Uchida K, Satio W, Sekiguchi H, Inoue G, Miyagi M, Takata K, Yokozeki Y, Takaso M. Acceleration of bone union by in situ-formed hydrogel containing bone morphogenetic protein-2 in a mouse refractory fracture model. *J Orthop Surg Res.* 2020 Sep 18;15(1):426, 2020.
3. Shoji S, Uchida K, Saito W, Sekiguchi H, Inoue G, Miyagi M, Kuroda A, Takaso M. Acceleration of Bone Healing by In Situ-Forming Dextran-Tyramine Conjugates Containing Basic Fibroblast Growth Factor in Mice. *Cureus.* 2020 Aug 27;12(8):e10085, 2020.
4. Takano S, Uchida K, Shoji S, Itakura M, Iwase D, Aikawa J, Mukai M, Sekiguchi H, Inoue G, Takaso M. Vascular Endothelial Growth Factor Is Regulated by the Canonical and Noncanonical Transforming Growth Factor- β Pathway in Synovial Fibroblasts Derived from Osteoarthritis Patients. *Biomed Res Int.* 2019 Sep 29;2019:6959056, 2019.
5. Murata K, Uchida K, Takano S, Shoji S, Iwase D, Inoue G, Aikawa J, Yokozeki Y, Sekiguchi H, Takaso M. Osteoarthritis patients with high haemoglobin A1c have increased Toll-like receptor 4 and matrix metalloprotease-13 expression in the synovium. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2019 Jul 16;12:1151-1159, 2019.
6. Aikawa J, Uchida K, Takano S, Inoue G, Iwase D, Miyagi M, Mukai M, Shoji S, Sekiguchi H, Takaso M. Regulation of calcitonin gene-related peptide expression through the COX-2/mPGES-1/PGE2 pathway in the infrapatellar fat pad in knee osteoarthritis. *Lipids Health Dis.* 2018 Sep 11;17(1):215, 2018.
7. Sekiguchi H, Uchida K, Matsushita O, Inoue G, Nishi N, Masuda R, Hamamoto N, Koide T, Shoji S, Takaso M. Basic Fibroblast Growth Factor Fused with Tandem Collagen-Binding Domains from *Clostridium histolyticum* Collagenase ColG Increases Bone Formation. *Biomed Res Int.* 2018 Mar 25;2018:8393194, 2018.

10. 図表

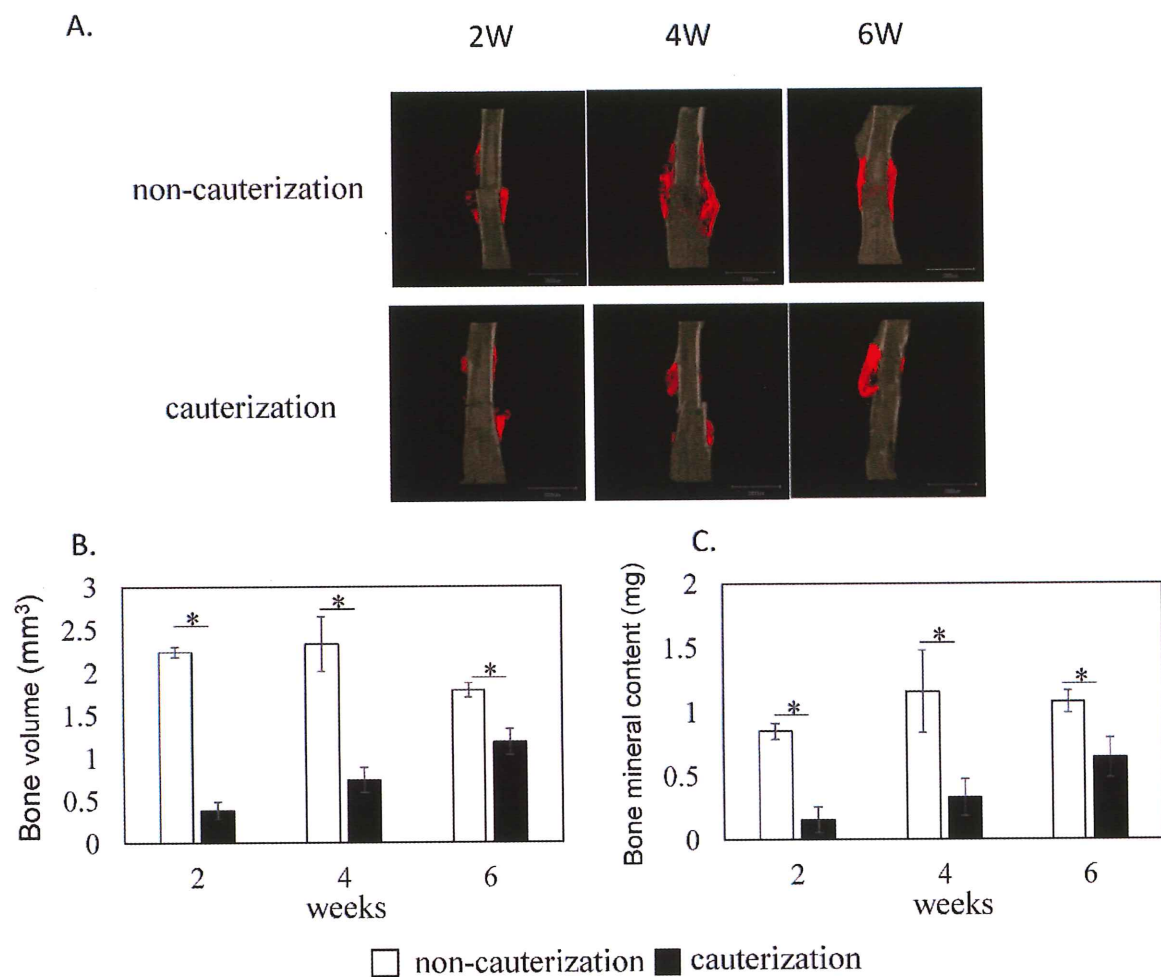


図1：マウスにおける非焼灼骨折モデルと焼灼骨折モデルの骨折治癒過程

A：非焼灼骨折モデルと焼灼骨折モデルの骨折部位の3D micro-CT画像。

B, C：非焼灼群（白棒）と焼灼群（黒棒）の新生骨の骨量（mm³）（B）と骨塩量（mg）（C）の分析。すべてのデータは平均値±標準誤差で示した（n = 5）。*は有意差を示す（p < 0.05）。

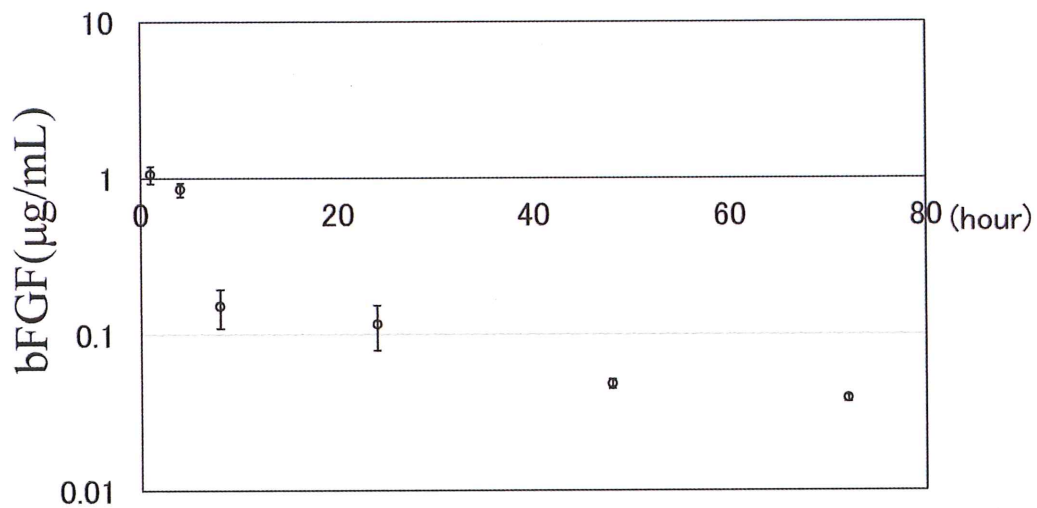


図 2 : in vitro における bFGF 含有局所硬化デキストランゲルにおける bFGF 徐放
各時点における PBS 中の bFGF 濃度。すべてのデータは平均値±標準誤差で示した (n = 5)。

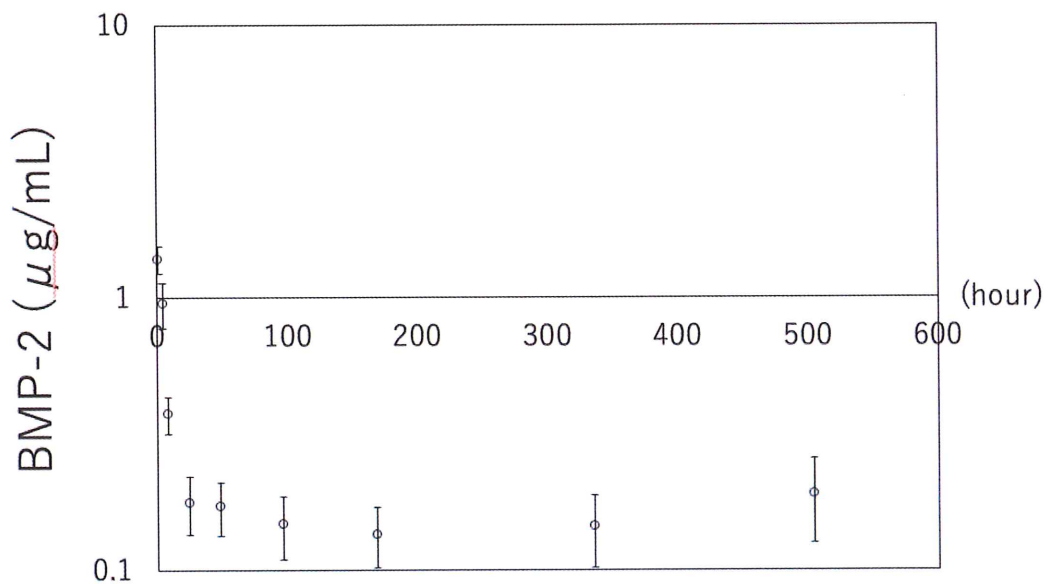


図 3 : in vitro における BMP-2 含有局所硬化ヒアルロン酸ゲルにおける BMP-2 徐放
各時点における BMP-2 の累積徐放量。すべてのデータは平均値±標準誤差で示した (n = 5)。

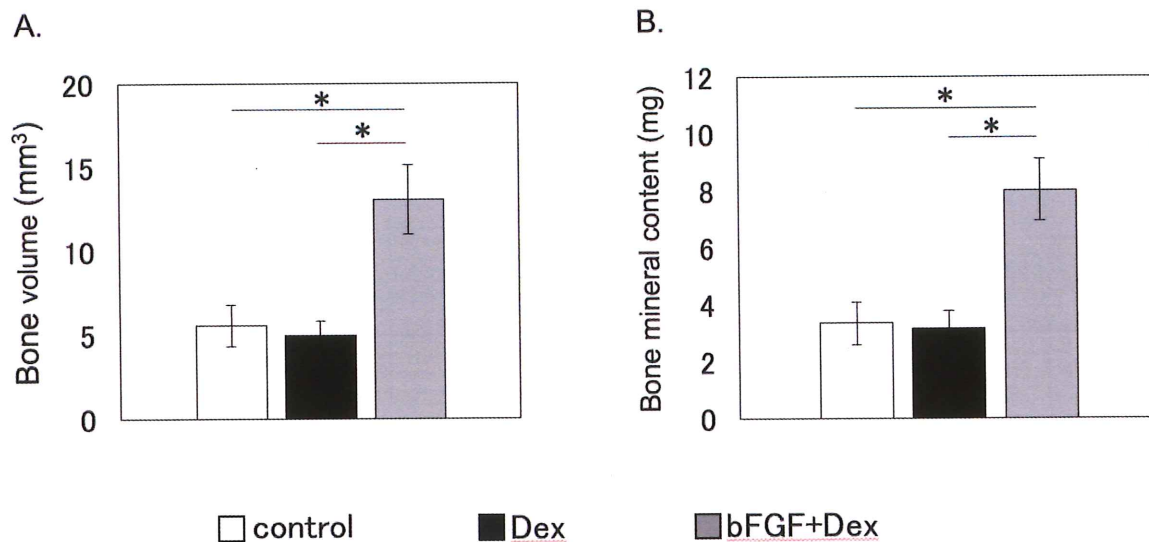


図 4：マウス単純骨折モデルにおける BV および BMC

A：骨量（Bone volume：BV）

B：骨塩量（Bone mineral content：BMC）

すべてのデータは平均値±標準誤差で示した（n=8）。*は有意差を示す（p<0.05）

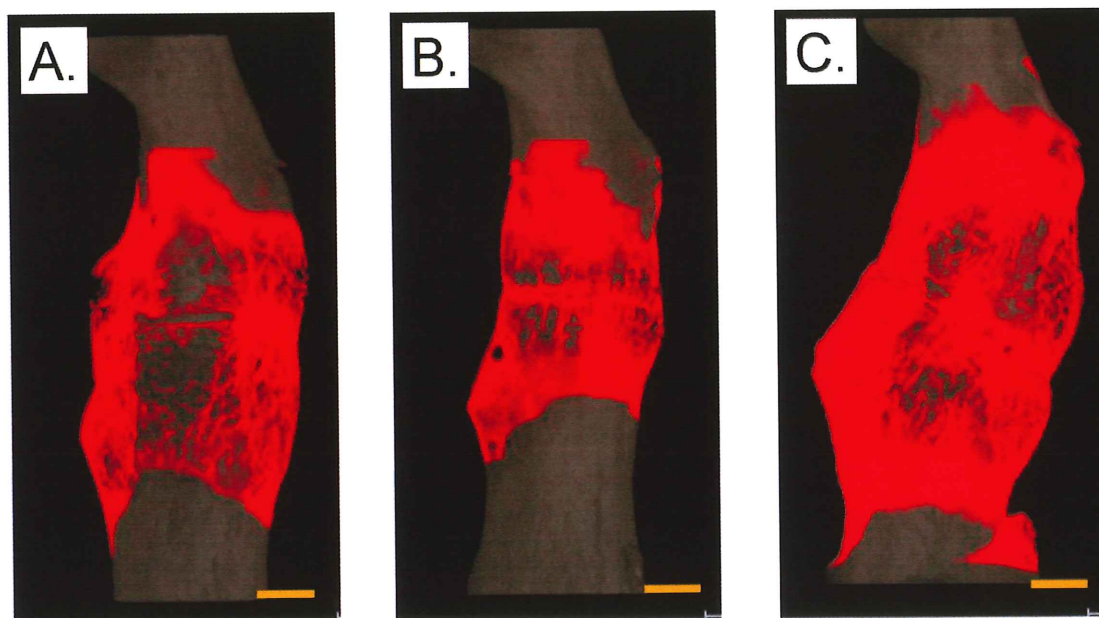


図 5：マウス単純骨折モデルにおける大腿骨の 3D-CT 像

A：control 群、B：Dex 群、C：bFGF+Dex 群。新生仮骨は赤色、既存骨は灰色で示している。

scale bar = 1000 μ m。

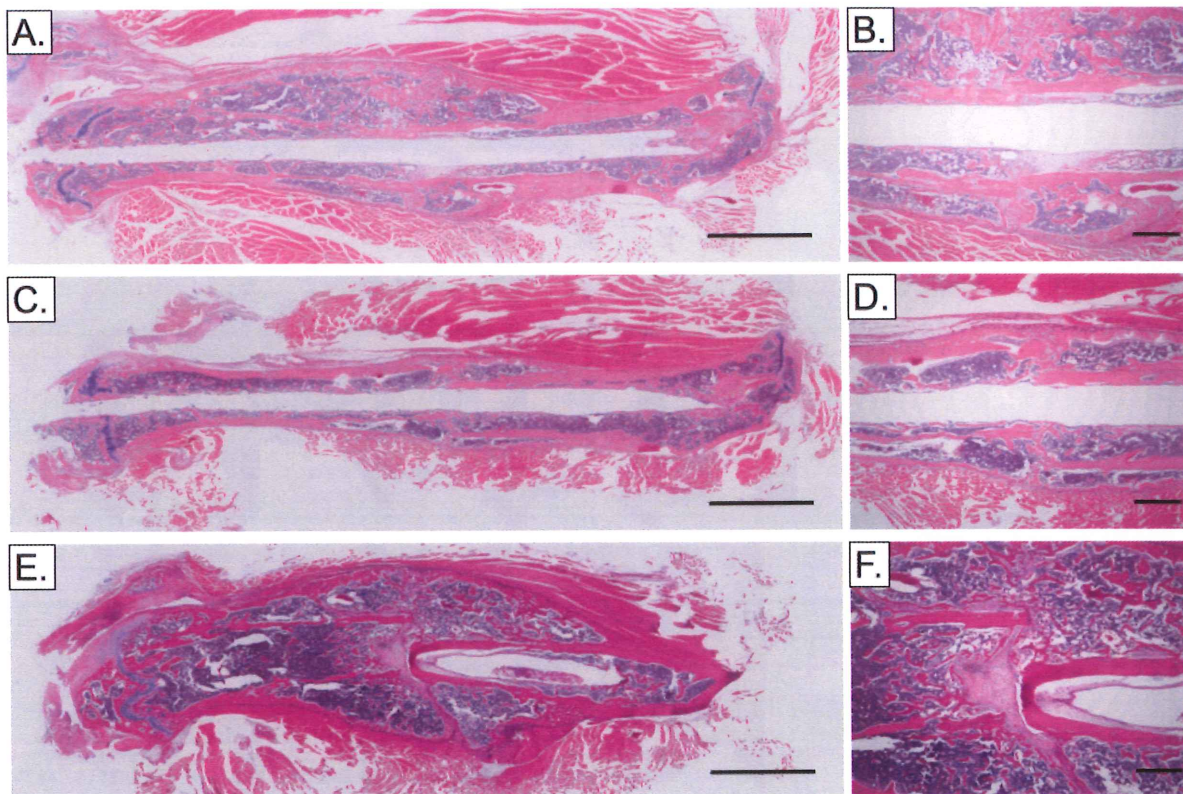


図 6 : マウス単純骨折モデルにおける組織像 (HE 染色)

A, B : control 群、C, D : Dex 群、E, F : bFGF+Dex 群。scale bar = 2000 μm (A, C, E)、500 μm (B, D, F)。

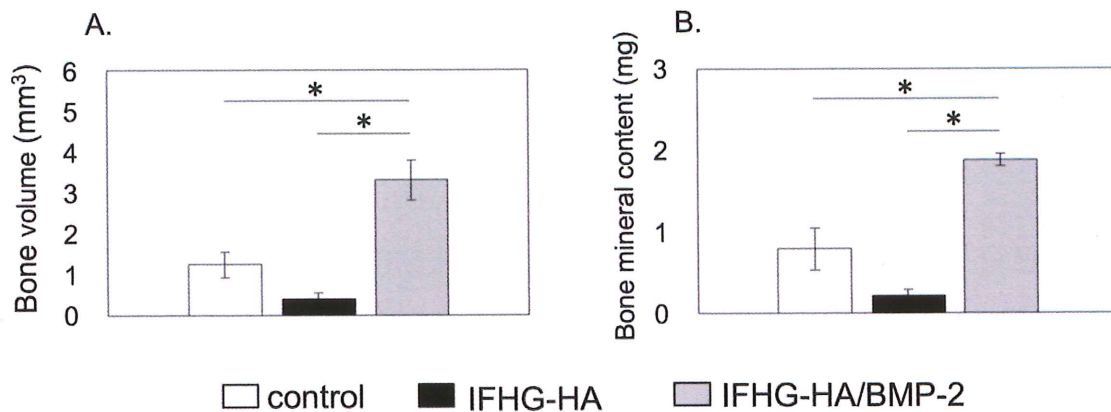


図 7：マウス難治性骨折モデルにおける BV および BMC

A：骨量（Bone volume：BV）

B：骨塩量（Bone mineral content：BMC）

すべてのデータは平均値±標準誤差で示した（n = 10）。*は有意差を示す（p < 0.05）

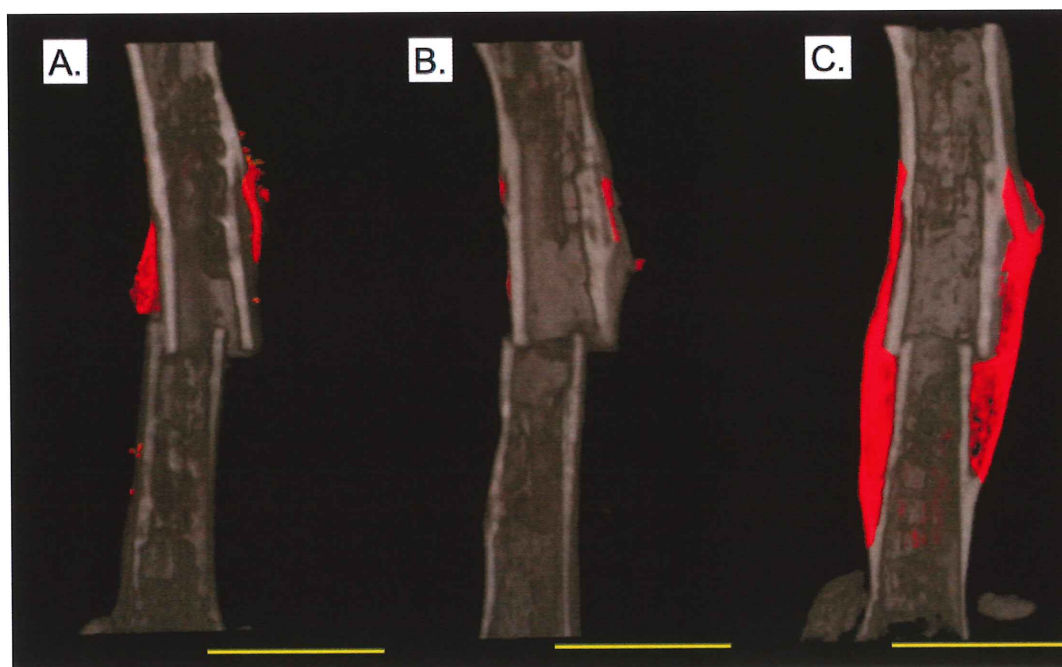


図 8：マウス難治性骨折モデルにおける大腿骨の 3D-CT 像

A：control 群、B：IFHG-HA 群、C：IFHG-HA/BMP 群。大腿骨矢状面における断面で、新生仮骨は赤色、既存骨は灰色で示している。scale bar = 3000 μ m。

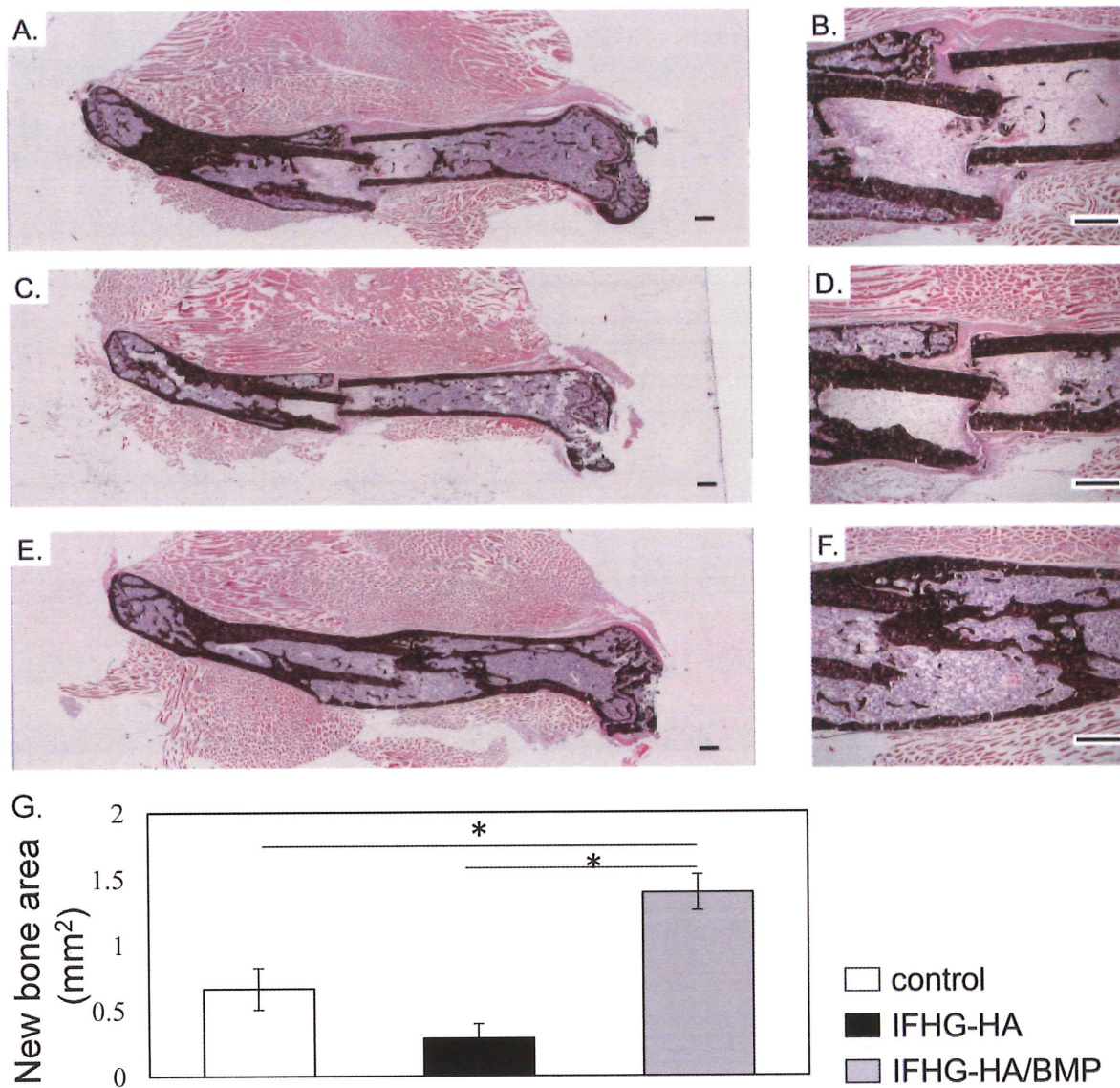


図 9：マウス難治性骨折モデルにおける組織像（Von Kossa 染色）と新生骨断面積
 A, B：control 群、C, D：IFHG-HA 群、E, F：IFHG-HA/BMP 群。scale bar = 500 μ m。
 G：新生骨断面積。すべてのデータは平均値 \pm 標準誤差で示した（n = 10）。*は有意差を示す
 (p < 0.05)

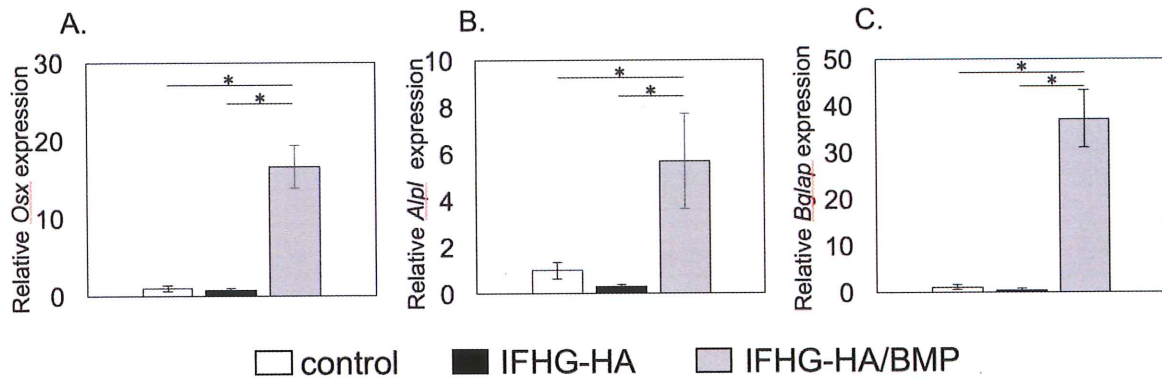


図 10 : マウス難治性骨折モデルにおける新生仮骨中の骨形成マーカー発現の比較
 A: オステリックス (Osx)、B: アルカリホスファターゼ (Alpl)、C: オステオカルシン (Bglap)。
 すべてのデータは平均値±標準誤差で示した (n=6)。*は有意差を示す (p < 0.05)

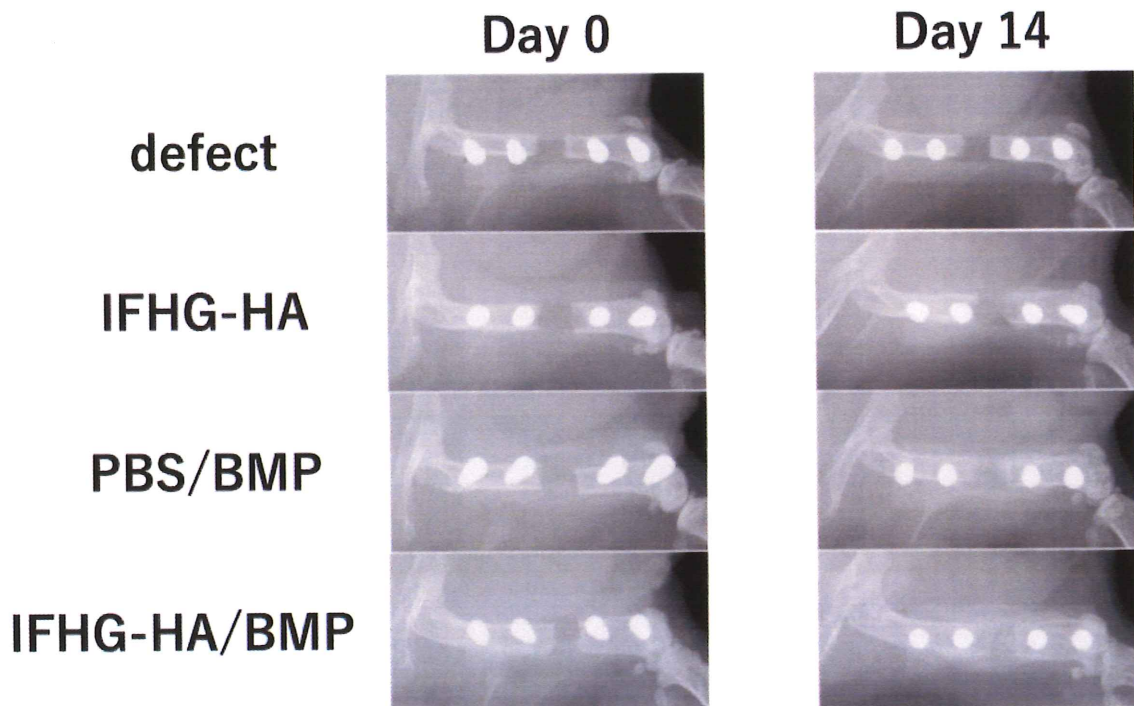


図 11 : マウス巨大骨欠損モデルにおける大腿骨の軟 X 線撮影写真
 各群における、処置直後と処置後 14 日の大腿骨のレントゲン写真。

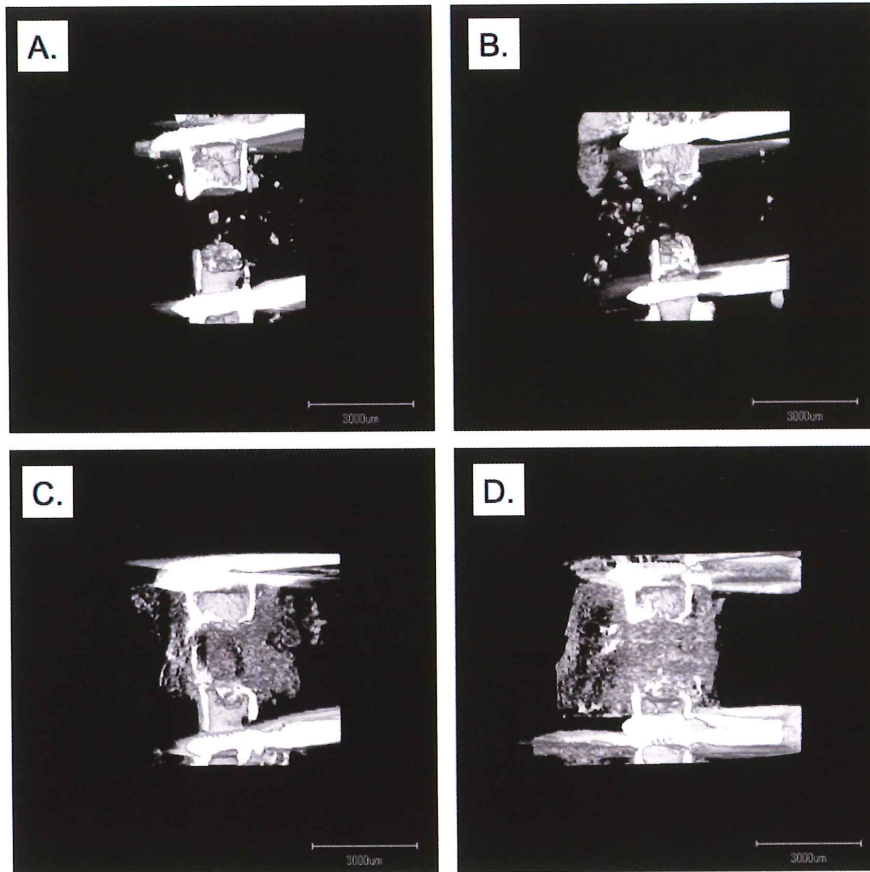


図 12 : マウス巨大骨欠損モデルにおける大腿骨骨欠損部の 3D-CT 像

A : defect 群、B : IFHG-HA 群、C : PBS/BMP 群、D : IFHG-HA/BMP 群。閾値 100 mg/cm^3 以上の領域を骨と定義した。scale bar = $3000 \mu\text{m}$ 。

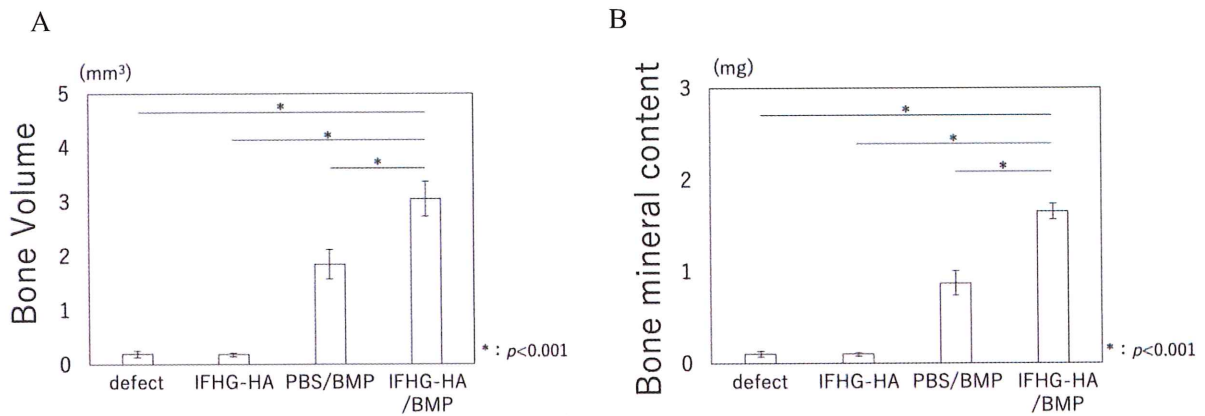


図 13 : マウス巨大骨欠損モデルにおける骨欠損部の BV および BMC

A : 骨量 (Bone volume : BV)

B : 骨塩量 (Bone mineral content : BMC)

すべてのデータは平均値±標準誤差で示した (n = 6)。*は有意差を示す (p < 0.001)

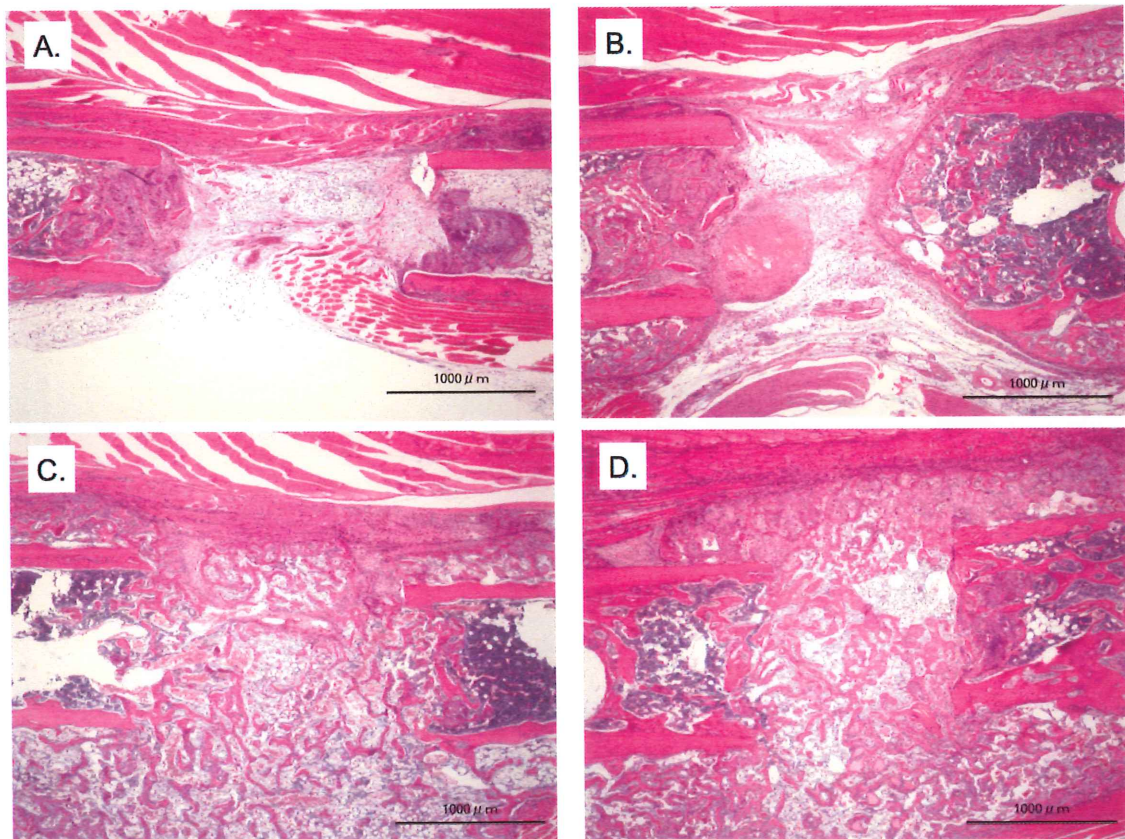


図 14 : マウス巨大骨欠損モデルにおける組織像 (HE 染色)

A : defect 群、B : IFHG-HA 群、C : PBS/BMP 群、D : IFHG-HA/BMP 群。scale bar = 1000 μm。

	4 w	6 w
control	1 / 8	1 / 8
IFHG-HA	0 / 8	1 / 8
IFHG-HA/BMP	5 / 8	8 / 8

表 1 : マウス難治性骨折モデルにおける骨癒合率

各群における処置後 4 週、および、6 週での骨癒合率。骨癒合数 / 作製数。