

学位論文要旨

氏名 庄司 真太郎



論文題目

「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」

指導教授承認印



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

氏 名 庄司 真太郎

【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 (bFGF) や骨形成タンパク-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 (BV)、骨塩量 (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。