滅菌可能な骨誘導性微小人工骨の開発に成功

骨形成性薬剤を徐々に放出するテトラポッド型リン酸カルシウム微小人工骨による骨再生

１．発表者：

前田　祐二郎（東京大学大学院医学系研究科外科学専攻　大学院生）
大庭　伸介（東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻　特任准教授）
鄭　雄一（東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻　教授　医学系兼担）

２．発表のポイント：

◆テトラポッド型リン酸カルシウム微小人工骨に骨形成性薬剤を搭載することで、骨形成性薬剤を徐々に放出するテトラポッド型リン酸カルシウム微小人工骨を開発した。
◆本人工骨は、滅菌処理後もその薬効を維持し、動物実験において細胞を移植しなくとも骨修復を誘導したことから、滅菌処理可能な骨誘導性人工骨と位置付けられる。
◆本研究は、生体の自然治癒能力を効率的に引き出しながら、細胞移植を行わずに骨再生を誘導する方法を提案するものであり、新たな骨再生医療戦略となりうることが期待される。

３．発表概要：

高齢化社会を迎えた現代において、種々の疾患によって生じた骨欠損の治療は健康寿命の延伸につながる重要な課題の一つです。健常部位から採取した骨組織の移植による骨再建と比較して、人工骨を用いた再建は健常骨の採取に伴う侵襲を減らすことができるものの、人工骨自体は骨形成を誘導する能力に乏しいことが問題でした。そのため、骨欠損部周囲に存在する患者自身の細胞に働きかけることで積極的に骨形成を促進する人工骨、つまり骨誘導性人工骨の開発が期待されています。

東京大学大学院医学系研究科感覚・運動機能医学講座口腔外科学（主任：高戸毅教授）医学博士課程の前田祐二郎氏、東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻の大庭伸介特任准教授、鄭雄一教授らは、骨形成性薬剤をテトラポッド型リン酸カルシウム微小人工骨に搭載することで、滅菌可能な骨誘導性微小人工骨を開発しました。本人工骨を骨欠損部に充填すると、細胞を移植しなくとも、骨形成性薬剤が徐々に放出されることにより海綿骨・皮質骨両方の骨修復が誘導され、その薬効は滅菌処理によって失われません。本研究は、骨形成性薬剤の使用による作製・滅菌・保存の簡便さと骨誘導性を併せ持つ微小人工骨を用いることで、生体の自然治癒能力を効率的に引き出しながら、細胞移植を行わずに骨再生を誘導する方法を提案するものであり、新たな骨再生医療戦略の開発への寄与が期待されます。

４．発表内容：

①研究の背景

悪性腫瘍、先天異常、外傷、炎症等により生じた骨欠損は、患者の活動性のみならず審美性（見た目）にも影響を与えることから、生活の質（Quality of Life-QOL）と健康寿命を大きく脅かします。低侵襲であり、かつ機能的にも審美的にも罹患前と同等の状態を取り戻す骨再建法の開発は、高齢化社会における喫緊の課題の一つといえます。現在、日本では、患者自

身の健常部位から採取した骨組織の移植による骨再建（自家骨移植）が広く行われておりますが、骨組織採取部位への侵襲による術後疼痛や審美障害がしばしば問題となっております。一方、人工骨等の生体材料を用いた骨再建は骨採取に伴う侵襲を回避できますが、自家骨移植に比較して骨形成を誘導する能力（骨誘導能）では劣ることが問題点として挙げられます。従って、自家骨に代わって、骨欠損部周囲に存在する患者自身の細胞に働きかけることで安全かつ積極的に骨形成を促進する人工骨、つまり骨誘導性人工骨の開発が期待されています。

人工骨への骨誘導性の付与については、骨形成を誘導する組換えタンパク質や遺伝子の搭載が国内外の研究者によって検討され、その有効性が示されております。しかしながら、生体内に埋入される全ての材料は滅菌（注 1）される必要があり、通常の滅菌処理では搭載されたタンパク質の活性は大きく失われます。さらに遺伝子を使用した場合は、患者の細胞のゲノム DNA への挿入による変異のリスクが存在します。このように、人工骨への骨誘導性の付与についても、従来とは異なるアプローチが求められています。

②研究内容・結果

前田祐二郎（東京大学大学院医学系研究科医学博士課程在籍）、大庭伸介特任准教授（東京大学大学院工学系研究科）、鄭雄一教授（東京大学大学院工学系・医学系研究科）らの研究グループは、骨形成性薬剤をテトラポッド型リン酸カルシウム微小人工骨（テトラボーン）（注 2）に搭載させることで、滅菌処理が可能な骨誘導性微小人工骨を新たに開発しました。

研究グループは、人工骨へ骨誘導性を付与する方法として、骨の初期分化を促進するヘッジホッグシグナル(注 3)の活性化剤 Smoothened agonist(SAG)と、骨の成熟を誘導する薬剤であるヘリオキサンチン誘導体 TH に着目しました。ヘッジホッグシグナルの骨分化促進作用と TH の骨成熟活性のどちらも、研究グループがこれまでに報告してきたものです（注 4－8）。そこで、「骨分化において作用点が異なるこの二つの薬剤を組み合わせる事で未分化細胞から効果的に骨芽細胞分化を誘導できる」そして「二つの薬剤を搭載したテトラボーンは骨誘導性微小人工骨として効率的に骨再生を誘導する」という仮説に基づき、以下の実験に取り組みました。

まず、未分化細胞株（C3H10T1/2）における SAG と TH の同時曝露による骨分化誘導効果の検証を行いました。SAG と TH の同時曝露では、各薬剤単独曝露と比較して、骨分化マーカーの発現と石灰化が顕著に促進される事が確認され、ラット大腿骨より採取した骨髄間質系細胞（注 9）でもこの結果が再現されました。マウス中足骨器官培養でも SAG と TH の同時曝露により、骨形成の促進が認められました。以上の結果は、SAG と TH の組み合わせが、未分化細胞の骨分化を効率的に誘導できることを示唆しております。

次に、SAG 溶液と TH 溶液のそれぞれにテトラボーンを浸漬することにより各薬剤をテトラボーンに搭載しました。SAG 搭載テトラボーンは 12 日間、TH 搭載テトラボーンは 35 日間にわたって薬剤を徐々に放出し、医療現場において広く使用されているエチレンオキサイドガス（EOG）滅菌処理後も薬剤の活性は維持されることが確認されました。最後に、薬剤を搭載後 EOG 滅菌を施したテトラボーンを 11 週齢のラット大腿骨骨幹部に作製した直径 2.2 mm の円柱状骨欠損に移植し、骨再生効果を検証しました。その結果、SAG 搭載テトラボーンと TH 搭載テトラボーンの組み合わせ移植群のみで、海綿骨と皮質骨両方の骨修復が認められました（添付資料参照）。

③社会的意義と今後の展望

本研究は、作製・滅菌・保存の簡便さと骨誘導性を併せ持つ微小人工骨を用いることで、生体の自然治癒能力を効率的に引き出しながら、細胞移植を行わずに骨再生を誘導する一つの方法を提案するものであります。また、異なる骨形成性薬剤を搭載した微小人工骨を、骨欠損の大きさや形態に合わせて異なる比率で使用したり、欠損内部の各所において調合を変えたりすることで、骨形成を任意に制御しながら骨修復を図れる可能性も示唆しております。本研究が新たな骨再生医療戦略の開発に貢献することを期待します。

５．発表雑誌：

雑誌名：

Biomaterials（2013 年 4 月 23 日オンライン版）

論文タイトル：

Bone healing by sterilizable calcium phosphate tetrapods eluting osteogenic molecules

著者：

Yujiro Maeda, Hironori Hojo, Nobuyuki Shimohata, Sungin Choi, Kenichi Yamamoto, Tsuyoshi Takato, Ung-il Chung, and Shinsuke Ohba

DOI 番号：

10.1016/j.biomaterials.2013.03.089

アブストラクト URL：

http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961213004237

６．注意事項：

特になし

７．問い合わせ先：

東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻
特任准教授　大庭　伸介

８．用語解説：

（注 1）滅菌：

全ての微生物を除去すること。人工材料・医療材料から手術器具・術者の手袋に至るまで、体内（皮膚や粘膜の内側）に埋植・接触する全てのものはこのプロセスを経る必要がある。未滅菌物の体内への埋植は、重篤な感染を引き起こす。

（注 2）テトラポッド型リン酸カルシウム微小人工骨(テトラボーン)：

リン酸カルシウムを基材とし、外形 1 mm のテトラポッド形状に成型された微小人工骨。骨欠損部に充填されると、テトラポッド形状により人工骨間に細胞や血管の侵入に適したサイズの連通孔が形成される。東京大学工学系研究科・医学系研究科・動物医療センターの共同研究により開発された（下記論文参照）。

Choi S, Liu IL, Yamamoto K, Igawa K, Mochizuki M, Sakai T, Echigo R, Honnami M, Suzuki S, Chung UI, Sasaki N. Development and evaluation of tetrapod-shaped granular artificial bones. Acta Biomater 8(6):2340-2347, 2012

（注3）ヘッジホッグ：
細胞から分泌されるタンパク質ファミリーの一つで、細胞の運命決定や器官形成および個体発生において重要な役割を果たしている。胎生期の骨形成に必須のシグナル経路であり、骨分化の初期に重要であることが分かっている。

（注4）Ohba S, Kawaguchi H, Kugimiya F, Ogasawara T, Kawamura N, Saito T, Ikeda T, Fujii K, Miyajima T, Kuramochi A, Miyashita T, Oda H, Nakamura K, Takato T, Chung UI: Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity. Dev Cell 14(5):689-699, 2008

（注5）Hojo H, Ohba S, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI: Gli1 protein participates in the hedgehog-mediated specification of the osteoblast lineage during endochondral ossification. J Biol Chem 287(21):17860-69, 2012

（注6）Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Mishina Y, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung UI: Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. J Biol Chem 288:9924-9932, 2013
（東京大学大学院工学系研究科 2013/4/1 付プレスリリース参照）

（注7）Ohba S, Nakajima K, Komiyama Y, Kugimiya F, Igawa K, Itaka K, Moro T, Nakamura K, Kawaguchi H, Takato T, Chung UI: A novel osteogenic helioxanthin-derivative acts in a BMP-dependent manner. Biochem Biophys Res Commun 357(4):854-860, 2007

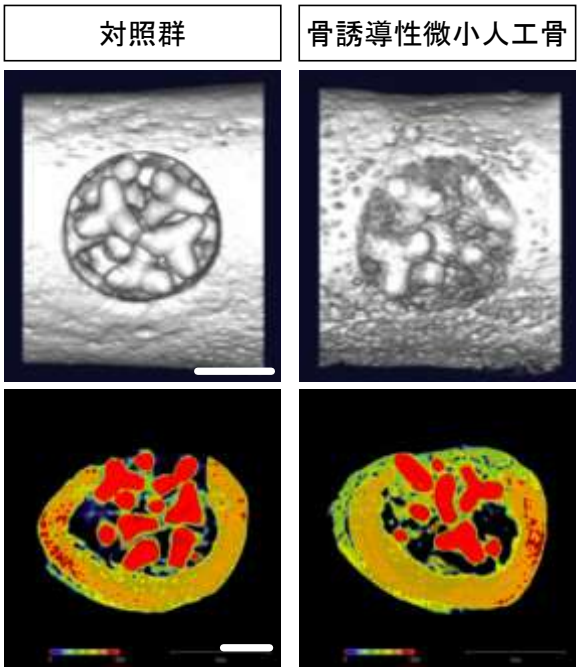
（注8）Nakajima K, Komiyama Y, Hojo H, Ohba S, Yano F, Nishikawa N, Ihara S, Aburatani H, Takato T, Chung UI: Enhancement of bone formation ex vivo and in vivo by a helioxanthin-derivative. Biochem Biophys Res Commun 395(4):502-508, 2010

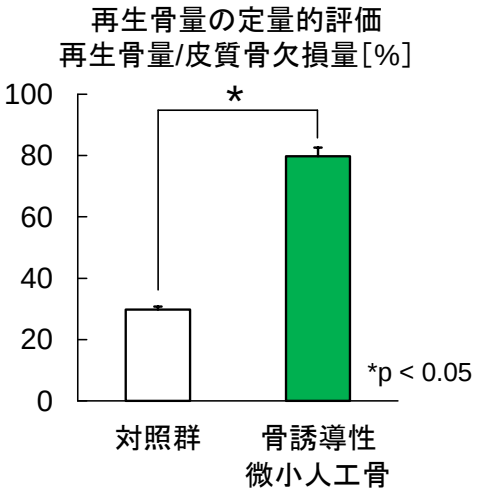
（注9）骨髄間質系細胞：
骨髄中に存在する細胞のうち、血液細胞以外の細胞集団を指す。間葉系に由来し、さまざまな細胞に分化する能力をもつ細胞（間葉系幹細胞）を含むとされている。

９．添付資料：

滅菌可能な骨誘導性微小人工骨による骨再生効果

ラット大腿骨骨欠損モデルへの埋入による骨再生効果をマイクロCT画像で検討





骨誘導性微小人工骨による
強力な骨再生効果を確認