

博士論文

骨形成性低分子化合物徐放型人工骨による  
骨再生法に関する基礎的研究

前田 祐二郎

## 目次

序文	p5~
第1章 SAG と TH による骨分化誘導効果の検討	p12~
背景と目的	
1-1 材料と方法	
1-1-1 細胞培養	
1-1-2 Real-time RT-PCR	
1-1-3 器官培養	
1-1-4 組織切片の作製	
1-1-5 染色	
1-2 結果	
1-2-1 SAG の曝露による骨芽細胞分化誘導効果の検討	
1-2-2 SAG と TH の同時曝露による骨芽細胞分化誘導効果の <i>in vitro</i> での検討	
1-2-3 SAG と TH の同時曝露による骨芽細胞分化誘導効果の <i>ex vivo</i> での検討	
1-3 小括	
第2章 SAG と TH を搭載した微小テトラポッド型人工骨の薬剤徐放性に関する検討	p22~
背景と目的	
2-1 材料と方法	
2-1-1 テトラボーンへの SAG と TH の搭載	
2-1-2 徐放性の検討法	
2-1-3 Real-time RT-PCR	
2-2 結果	
2-2-1 SAG 搭載テトラボーンからの薬剤徐放効果	
2-2-2 TH 搭載テトラボーンからの薬剤徐放効果	
2-3 小括	
第3章 SAG と TH を搭載した微小テトラポッド型人工骨の滅菌後活性に関する検討	p27~
背景と目的	
3-1 材料と方法	
3-1-1 テトラボーンへのソニックヘッジホッグ (Shh) の搭載	
3-1-2 エチレンオキサイドガス (EOG) 滅菌	

3-1-2 Real-time RT-PCR	
3-2 結果	
3-2-1 SAG 搭載テトラボーンの滅菌後の薬理活性	
3-2-2 TH 搭載型テトラボーンの滅菌後の薬理活性	
3-3 小括	
第4章 ラット大腿骨骨欠損モデルにおける骨形成性薬剤徐放型微小テトラポッド型人工骨の骨再生効果の検討	p31~
背景と目的	
4-1 材料と方法	
4-1-1 実験動物	
4-1-2 ラット大腿骨骨欠損モデル	
4-1-3 放射線学的評価	
4-1-3 組織学的検討	
4-2 結果	
4-2-1 骨再生の放射線学的評価	
4-2-2 骨再生の組織学的検討	
4-3 小括	
第5章 ビーグル犬大腿骨骨欠損モデルにおける骨形成性薬剤徐放型微小テトラポッド型人工骨の骨再生効果の検討	p40~
背景と目的	
5-1 材料と方法	
5-1-1 実験動物	
5-1-2 骨欠損作成方法と移植方法	
5-1-3 放射線学的検討	
5-2 結果	
5-2-1 全血球計算結果、血液生化学的検査結果	
5-2-2 放射線学的検討	
5-3 小括	
第6章 考察	p47~
謝辞	p55~
参考文献	p56~

## 要旨

人工骨による骨再建は自家骨移植に比較して骨誘導能では劣るが、骨採取に伴う侵襲を避ける長所があるため、骨誘導能に優れた人工骨の開発が期待されている。本研究では、2つの骨形成性低分子化合物、未分化細胞から骨芽細胞への初期分化を促進するSAG (Hh シグナル活性化剤)と骨芽細胞の成熟を促進するTH (ヘリオキサンチン誘導体)に注目し、これら異なる作用をもつ低分子化合物をリン酸カルシウム人工骨に搭載させ、作製・滅菌・保存の簡便さと骨誘導性を併せ持つ骨形成性低分子化合物徐放型人工骨の基礎的研究を行った。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る。

## 序文

骨は生体内で骨格を形成する組織であり、物理的支持としての形態の維持機能、筋収縮を運動に変換させる挺子としての機能、脳神経や内部臓器の保護機能を有する。カルシウム代謝においては血中のカルシウム濃度を一定に保つ機能を有し、さらに骨髄は造血の場としても機能している[1]。このため、種々の疾病・先天異常・外傷により骨組織の異常や喪失が起こると、著しい機能障害を来す。

自然治癒しない不可逆的な骨欠損には、患者自身の骨である自家骨を採取して補填する自家骨移植法、凍結保存した死体骨による他家骨移植法、人工骨による再建が行われて来た[2-4]。自家骨移植は生存している細胞と成長因子を含むため、機能と生着率において有利である、血管柄付きの筋皮弁とともに移植を行うことによって広範囲な骨欠損にも適応がある[5]。しかしながら、健常な骨採取部への外科的侵襲はしばしば神経麻痺・疼痛・感染症をもたらす、骨の採取可能量や形状にも制限がある[6]。他科骨移植は侵襲を避けることが出来、骨採取可能量の制限もないため、欧米では好んで用いられている。しかし、細胞や成長因子は含まないため骨再生効果は限局され、ドナー由来の病原体の混入による感染リスクを伴う。日本国内では倫理的問題もあるためボーンバンクが発達しておらず、あまり普及していない[4, 7]。このように各種骨移植も各々問題を抱えているため、特に日本においては骨再建法として人工骨への期待が高く、開発が進められてきた。人工材料である人工骨による再建は使用量の制限

や骨採取部への侵襲が無く、移植に伴う感染等の安全性の問題をある程度まで解決する長所があるものの、骨誘導能では骨移植に劣る欠点がある。

この人工骨の低い骨誘導能を解決する一つの可能性は、骨形成促進剤を骨伝導能がある人工材料に搭載することにより、移植部周囲の細胞に働きかけて素早い骨再生を促進する人工骨を開発する事である。それゆえ、これまでも骨形成性遺伝子や成長因子をコントロールドデリバリーする研究が幅広く行われてきた[8]。従来から、骨形成性タンパク質 (bone morphogenetic protein- BMP)、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor- FGF)、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor- VEGF) といった骨形成・血管新生を誘導する成長因子の組み換えタンパク質や遺伝子を外来性に加えることで、より短期間で効率的に骨再生を誘導する試みが行われ、有効性が示されている。しかし一方でこれらの方法では十分な骨再生効果が得られていない報告も認められる[9]。これらの技術には2つの問題点が挙げられる。1つ目の問題点は、組み換えタンパク質には、分解あるいは翻訳後修飾による生理活性の低下の問題が付きまとう。また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する。さらに生体内に埋入される全ての材料は滅菌される必要があり、臨床応用を考慮すると、タンパクや遺伝子を搭載した人工骨は、滅菌によって生理学的活性を失う事が予期される。したがって、製造過程、取り扱いや保存法に注意を要し、大量生産が困難であり、高コストである。2つ目の問題点は、単独シグナル

の活性の限界があげられる。生体内の骨形成には複数の骨形成シグナルが時間的空間的に連携しながら関与する必要がある。これらの問題を解決するため、新たな骨分化誘導因子として、安定性が高く副作用も少ない低分子化合物に注目した。加えて、十分な骨再生能を得るために、各シグナルを活性化する複数の低分子化合物を組み合わせ、時間的・空間的に作用させる事が必要ではないかと考えた。

これまでに、複数の研究グループが、軟骨内骨化での骨芽細胞分化運命決定にヘッジホッグ (Hh) シグナルが不可欠であることを報告してきた[10-13]。Hh シグナル伝達経路の初期段階では Hh タンパクが膜貫通型受容体 Patched と結合することによって、膜貫通型蛋白 Smoothened (SMO) が活性化する[14]。低分子化合物である Smoothened Agonist (SAG) は強力な SMO 作動薬であり、細胞内の Hh シグナルを活性化することで知られている[15, 16]。最近、Hojo らは Hh の刺激は、Hh シグナル伝達経路の下流で働く転写因子である Gli の活性を通して、初期の骨芽細胞分化を促進することを報告した[13]。SAG による刺激は間葉系細胞において、初期の骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP)、骨シアロタンパク (Bsp) の mRNA の発現を促進したが、後期の骨分化マーカーであるオステオカルシン (Oc) の発現は促進しなかった。この発見は SAG が強力な骨形成因子であることを示唆しているが、同時に、SAG のみでは未熟な骨芽細胞の成熟した骨芽細胞への分化は促進できないことを示している。一方で、Ohba らは以前、化合物ライブラリーのスクリ

ーニングの結果、骨芽細胞分化の中期から後期段階にかけて作用する低分子化合物としてヘリオキサンチン誘導体 4-(4-methoxyphenyl)pyrido[4,3:4,5]thieno[2,3-b]pyridine-2-carboxamide (TH)を発見した[17]。TH は骨芽細胞前駆細胞において分化促進作用を示し、骨髄間葉細胞 (BMSCs) や C3H10T1/2 細胞等の未分化間葉細胞では効果を示さなかった。TH は *in vivo* においても、骨再生を促進した[18]。これらの報告より、骨芽細胞分化の異なる段階で作用する低分子化合物である SAG と TH を組み合わせたシステムが、素早く効果的な骨芽細胞分化を促進し、骨再生に有効であると仮説を立てた (図 1)。

一方で、低分子化合物の局所応用には、時間的・空間的に効果的に送達するのに適した担体が必要とされる[8]。海岸で消波ブロックとしてとして用いられているテトラポッドの形状からくる利点にヒントを得て、テトラポッド形状の人工骨 (テトラポーン<sup>®</sup>)が最近開発された[19]。テトラポッド形状は消波性に優れ、海洋生態系において珊瑚や海藻が生えやすいという性質がある。また、突起が絡み合うことにより形態保持性が良く、機械的強度にも優れている。テトラポーンは、 $\alpha$  型リン酸三カルシウム顆粒 ( $\alpha$ -TCP) を主剤としており、実際のテトラポッドの体積の 270 億分の 1 サイズの高さ 1mm で設計されている。骨伝導能を有し、独特の 4 本の突起がお互いに組み合って緊密に骨欠損を充填し、集積化することで連通路が形成される。この連通路径が、細胞や血管の侵入に最も適した 100 $\mu$ m~300 $\mu$ m となるように設計されており、一

定の空隙を持つ理想的な連通孔ネットワークを安定して構築する。本人工骨の周囲からだけでなく内部からも骨吸収置換が起こるため、新生骨との置換速度が早く機械的強度も高い。この人工骨に低分子化合物を搭載することで、低分子化合物を徐放する人工骨を作製できるのではないかという仮説を立てた。

以上の仮説より、本研究では人工骨への骨誘導性の付与について従来とは異なるアプローチ、骨形成性低分子化合物である SAG と TH を組み合わせた骨芽細胞分化誘導システムを、生体適合性と骨置換性を持つ優れた人工骨テトラボーンに搭載するアプローチで骨形成性低分子化合物徐放型人工骨の開発の基礎的検討を行った (図 2)。

図 1

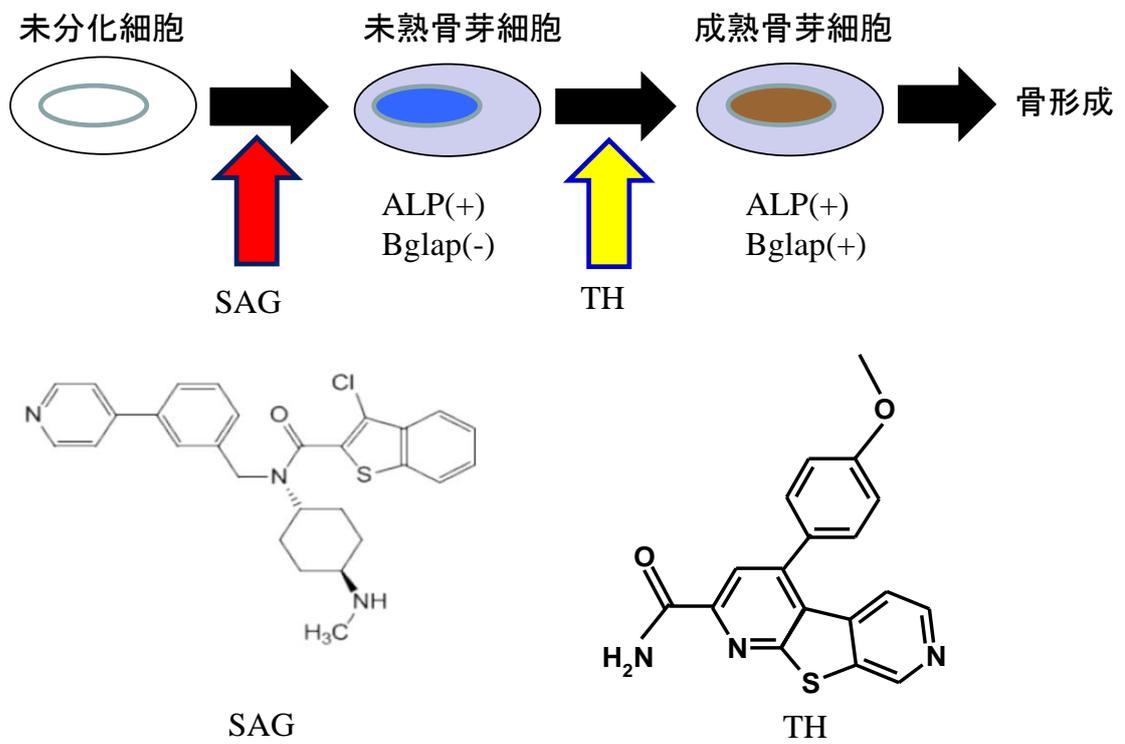


図 1 低分子化合物を組み合わせた骨芽細胞分化誘導システムの仮説

図 2

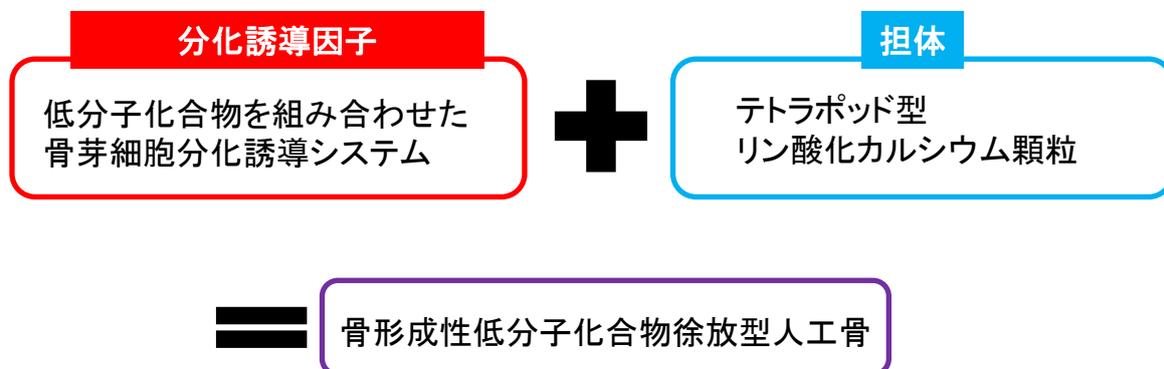


図 2 骨形成性低分子化合物徐放型人工骨の開発アプローチ

## 第1章 SAG と TH による骨分化誘導効果の検討

### 背景と目的

骨芽細胞分化の異なる段階で作用する低分子化合物である SAG と TH を組み合わせて利用することが、素早く効果的な骨芽細胞分化を促進するという仮説を、*in vitro* 実験およびマウス中足骨器官培養系を用いた *ex vivo* 実験で検証した。

### 1-1 材料と方法

#### 1-1-1 細胞培養

マウス未分化間葉細胞株 (C3H10T1/2 細胞) およびマウス骨芽細胞様株 (MC3T3E-1 細胞) は理研細胞バンクより購入した。ラット初代骨髄間質系細胞 (rat MSC) については、生後7週齢 Wistar rat の大腿骨を回収後、PBS にて骨髄腔より抽出してセルストレーナーを用いて得た細胞群から単離した。10% ウシ胎仔血清 (FBS、Sigma-Aldrich) と抗生剤 (50 unit/mL ペニシリン+50 mg/mL ストレプトマイシン、Sigma-Aldrich) を含む Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM、Sigma-Aldrich) 培地を用いて 37 °C 5%CO<sub>2</sub> で継代培養した。骨芽細胞分化誘導においては、上記基本培地に 50 µg/mL のアスコルビン酸 2 リン酸、10 mM の β グリセロリン酸、0.1 µM のデキサメタゾンを加えた骨芽細胞分化培地を使用した。

### 1-1-2 Real-time RT-PCR

ISOGEN (Wako) 及び RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて培養細胞より全 RNA を回収し、DnaseI (QIAGEN) 処理を行った。Takara RNA PCR Kit (Takara) を用いて、回収 RNA の 1  $\mu$ g を逆転写反応させ一本鎖 cDNA を合成した。反応条件は 55  $^{\circ}$ C 30 分、99  $^{\circ}$ C 5 分とした。Real time PCR は ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて行った。反応液は 1x QuantiTect SYBR Green Master Mix (Roche)、0.3  $\mu$ M プライマー及び 1  $\mu$ L cDNA 溶液からなり、反応条件は 94  $^{\circ}$ C 15 秒、60  $^{\circ}$ C 60 秒で 40 サイクルとした。mRNA のコピー数は PCR 増幅産物を含むプラスミドの段階希釈系列より得られた標準曲線から算出した[20]。内在性コントロールとして actin 遺伝子を用い、mRNA 発現量を補正した。スタンダードとして用いた PCR 増幅産物を含むプラスミドは TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) を用いて、PCR 増幅産物を pCR4-TOPO ベクターに組み込んで作製した。各 PCR 反応は 3 回試行し、平均 $\pm$ 標準偏差として表記した。解析に使用したプライマーの配列を表 1 に示す。

### 1-1-3 器官培養

胎生 15.5 日目の ICR 系マウス胎児後肢から、第 2-4 指の中足骨を取り出した後、Osteogenic medium (0.25% ウシ胎仔血清 (FBS、Sigma-Aldrich)、50  $\mu$ g/mL アスコルビン酸 2 リン酸、10 mM  $\beta$  グリセロリン酸、0.1  $\mu$ M デキサメタゾンおよび抗生剤 (50

unit/mL ペニシリン+50 mg/mL ストレプトマイシン、Sigma-Aldrich) を含む High glucose Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM、Sigma-Aldrich) で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した[18]。中足骨を取り出し培養を開始した日から SAG および TH の曝露を開始し、培地交換は行わず、7 日目まで培養した。

#### 1-1-4 組織切片の作製

培養中足骨は 10% 中性緩衝ホルマリンで 1-2 日間固定した。20% EDTA (pH 7.4) 中に 4 °C で一晩浸漬して脱灰後、蒸留水で洗浄した。その後、培養中足骨サンプルは 70%、80%、90%、100% のエタノール系列で順次置換、キシレン系列で透徹した後、通例に従いパラフィンブロックを作製した。組織切片の作製にはマイクロトーム SM 2000R (Leica) を用いて 5 μm の厚さで薄切し、MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業) に貼付した。キシレン槽で 5 分間浸漬を 2 回繰り返し、十分に脱パラフィンを行った後、アルコール下降系列を経て蒸留水中で親水化した後に染色を行った。

#### 1-1-5 染色

##### ALP 染色

サンプルを PBS で洗浄し、70% エタノール水溶液にて 15 分間固定後、30 分間乾燥させた。染色液は 5 mg のナフトール AS-MX リン酸二ナトリウム塩 (Sigma-Aldrich)

を 0.5 ml の N,N-ジメチルホルムアミド (Wako) に溶解させたものを、30 mg のファーストブルーBB 塩 ヘミ(亜鉛クロリド)塩 (Sigma-Aldrich) を含む 50 ml の 0.1 M Tris-HCl(pH 8.5)に加えて 30 分混合したのち、ポリテトラフルオロエチレン製メンブレンフィルター (マイレクス (Millex) -GV フィルター, 0.22  $\mu$ m, PVDF, 33 mm) でろ過して作製した。作製した染色液で 10 分間染色し、水道水で流水洗浄した。

#### von Kossa 染色

サンプルを 5%硝酸銀 (Wako) 水溶液で 1 時間、間接光を反応させた。その後、流水で 5 分間洗浄後、5%チオ硫酸ナトリウム (Wako) を 3 分間反応させ発色反応を停止させた。器官培養系の観察では、その後ケルンエヒトロート (武藤化学) で対比染色を行い、マリノール (武藤化学) で封入し、顕微鏡下での観察を行った。組織像は Axio Vision 4.6 (ZEISS) を用いて撮影した。

表 1 本研究で使用したプライマーの配列(Real-time RT-PCR 用)

種	遺伝子名	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
mouse	alkaline phosphatase (Alp)	GCTGATCATTCCCACGT TTT	CTGGGCCTGGTAGTTG TTGT
	bone gla protein (Bglap)	AAGCAGGAGGGCAATA AGGT	TTTGTAGGCGGTCTTC AAGC
	Gli1	GCACCACATCAACAGT GAGC	GCGTCTTGAGGTTTTC AAGG
	$\beta$ -actin	AGATGTGGATCAGCAA GCAG	GCGCAAGTTAGGTTTT GTCA
rat	Alp	CCTTGAAAAATGCCCTG AAA	CTTGGAGAGAGCCAC AAAGG
	Bglap	AGCTCAACCCCAATTGT GAC	AGCTGTGCCGTCCATA CTTT
	$\beta$ -actin	AGCCATGTACGTAGCCA TCC	CTCTCAGCTGTGGTGG TGAA

## 1-2 結果

### 1-2-1 SAG の曝露による骨芽細胞分化誘導効果の検討

マウス未分化細胞株 (C3H10T1/2 細胞) を  $10^{-8}$  M から  $10^{-6}$  M の濃度で SAG を含んだ DMEM 培地で 7 日間培養した。骨芽細胞初期分化マーカー (Alp) と Hh シグナルの活性化指標 (Gli1) の発現について Real-time RT-PCR による定量的な解析を行うと、SAG の濃度依存的に Alp および Gli1 の発現が上昇した (図 3)。ALP 染色においても SAG 濃度依存的に ALP の活性が増えていることが確認された。SAG は  $10^{-6}$  M の濃度の時に最大の効果を示した。この SAG による Alp と Gli1 の発現上昇の相関により、SAG の濃度依存的に Hh シグナル伝達経路の活性化を伴って、骨芽細胞分化の初期段階が促進される事が示唆された。

### 1-2-2 SAG と TH の同時曝露による骨芽細胞分化誘導効果の *in vitro* での検討

前項で SAG の骨芽細胞分化初期段階を促進する効果が示唆されたため、骨芽細胞分化の後期段階を促進する事が過去に示されている低分子化合物 TH との同時曝露による効果を検討した[17]。マウス未分化細胞株 (C3H10T1/2 細胞) を SAG ( $10^{-6}$  M) と TH ( $10^{-6}$  M) の同時曝露下で 14 日間培養した。骨芽細胞分化の指標として、骨芽細胞初期分化マーカー (Alp) と後期分化マーカー (Bglap) の mRNA 発現の Real-time RT-PCR による定量的な測定と、ALP 染色および von Kossa 染色を行った (図 4 A)。

その結果、SAG と TH の単独曝露ではそれぞれ Alp、Bglap の発現が上昇した。これは SAG と TH が骨芽細胞分化において異なる段階で効果を発揮する事を示している。そして、SAG と TH 同時曝露では各薬剤単独曝露と比較して Alp、Bglap の発現が顕著に促進された。染色では ALP 活性の上昇のみならず、von Kossa 染色により石灰化の顕著な亢進を認めた。SAG と TH の組み合わせによる強い骨芽細胞分化の促進を認めた。ラット大腿骨より採取した骨髄間質系細胞でもこの結果の再現を得た (図 4 B)。

### 1-2-3 SAG と TH の同時曝露による骨芽細胞分化誘導効果の *ex vivo* での検討

SAG と TH の同時曝露による骨芽細胞分化促進効果をマウス中足骨器官培養でも検討した。これまでに、中足骨器官培養の SAG 単独曝露では軟骨膜における異所性骨化の発生が促進される事がわかっている。今回、TH 単独曝露では骨殻の厚みの増加を認めた。SAG と TH の同時曝露ではさらに厚い骨殻と異所性骨化を認め、骨形成が促進された (図 5)。

## 1-3 小括

骨芽細胞分化における異なる段階で効果を持つ低分子化合物である SAG と TH を組み合わせて同時曝露する事により、未分化細胞から成熟骨芽細胞への分化を効率的に誘導出来た。

図 3

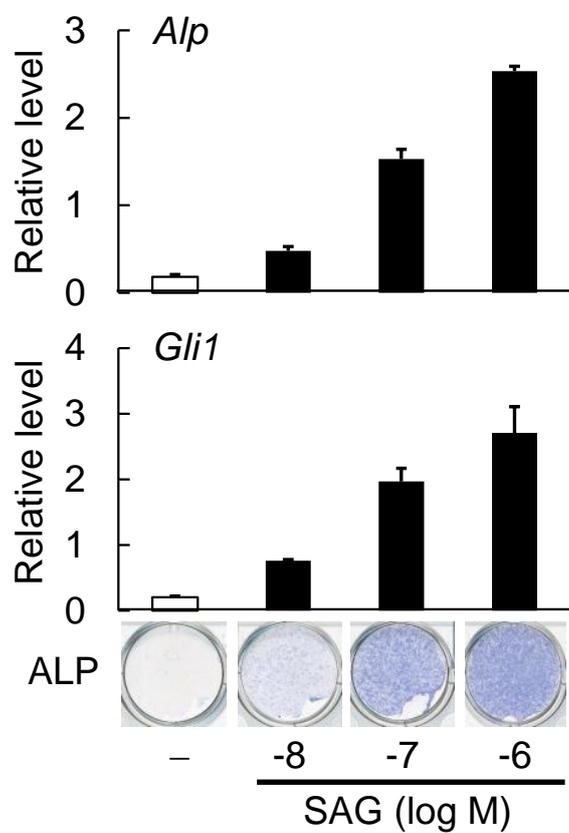


図 3 SAGの曝露による骨芽細胞分化誘導効果の検討

C3H10T1/2細胞をDMEM培地で $10^{-8}$ Mから $10^{-6}$ Mの濃度のSAGを持続的に曝露して7日間培養した。Real-time RT-PCRにより、*Alp*と*Gli1*のmRNA発現の定量的な測定を行った。ALP染色によってALPの活性を比較した。n=6

図 4

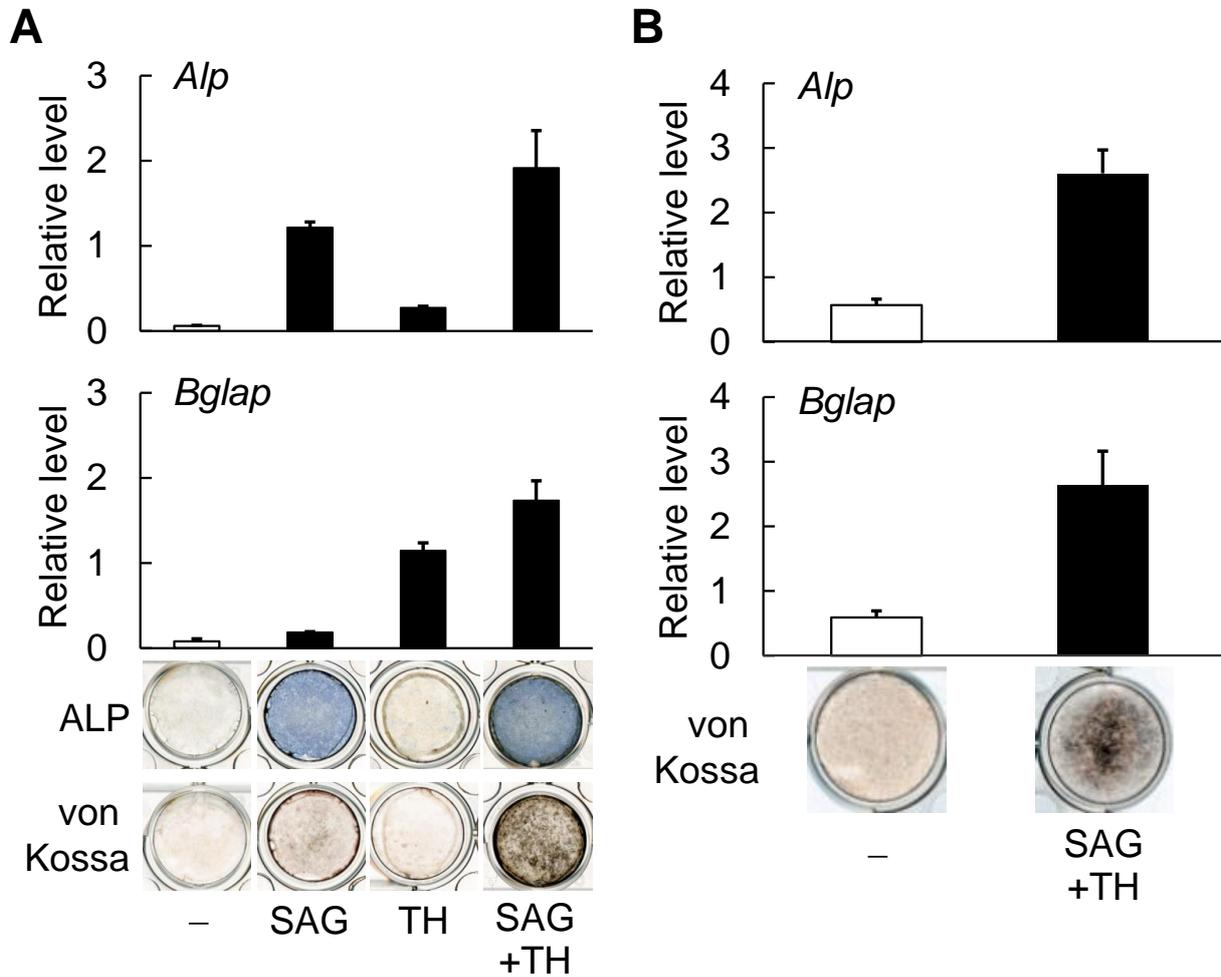


図 4 SAGとTHの同時曝露による骨芽細胞分化誘導効果の*in vitro*での検討

(A)C3H10T1/2細胞を用いた検討：SAG ( $10^{-6}$  M) とTH ( $10^{-6}$  M) を持続的に同時曝露して14日間培養した。Real-time RT-PCRにより、AlpとBglapのmRNA発現の定量的な測定を行った。ALP染色によるALP活性の測定と von Kossa染色による石灰化の検出を行った。n=6

(B)ラット骨髄間質系細胞を用いた検討：上記と同様の検討を行った。

図 5

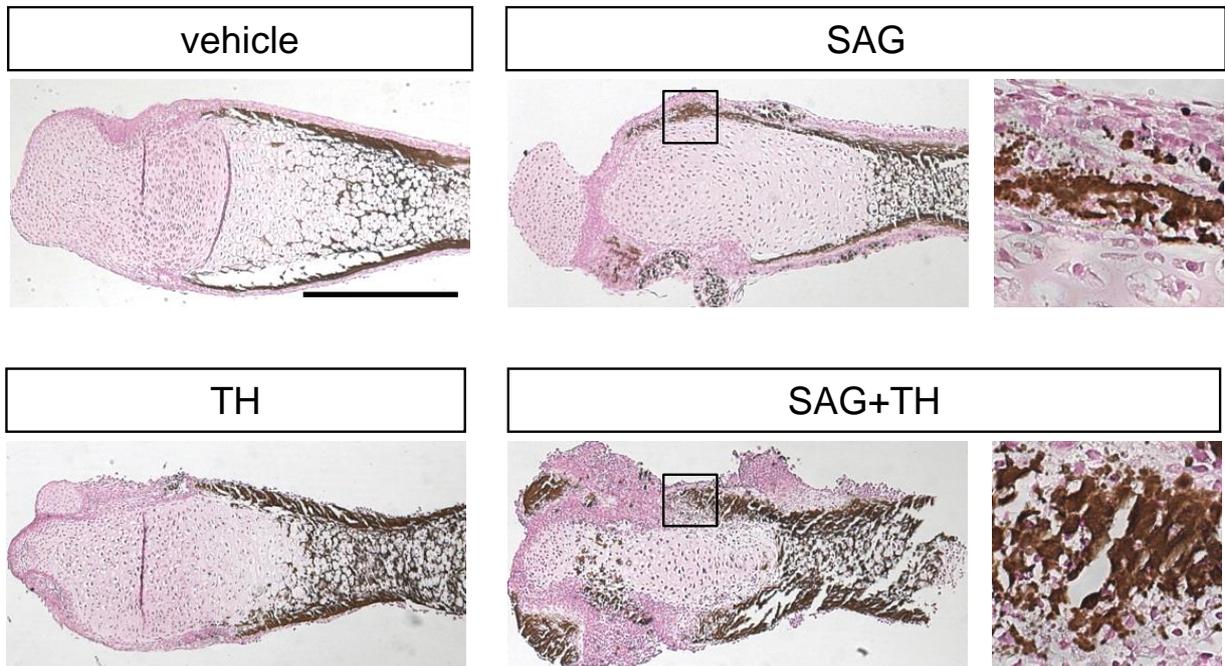


図 5 SAGとTHの同時曝露による骨芽細胞分化誘導効果のex vivoでの検討

胎生15.5日目のマウス中足骨をOsteogenic medium中でSAG ( $10^{-6}$  M) とTH ( $10^{-6}$  M) に持続的に同時曝露して、14日間器官培養した後、von Kossa染色で石灰化を観察した。  
Bar 1 mm

## 第2章 SAG と TH を搭載した微小テトラポッド型人工骨の

### 薬剤徐放性に関する検討

#### 背景と目的

骨形成において異なる段階で作用する骨形成性低分子化合物である SAG と TH をテトラポーンに搭載し、テトラポーンからの薬剤徐放性を評価した。

#### 2-1 材料と方法

##### 2-1-1 テトラポーンへの SAG と TH の搭載

DMSO を溶媒とする SAG 溶液 ( $10^{-3}$  M)、TH 溶液 ( $10^{-3}$  M) それぞれにテトラポーンを 24 時間浸漬した後、室温にて 24 時間乾燥させることにより、SAG 搭載テトラポーン、TH 搭載テトラポーンを作製した

##### 2-1-2 徐放性の検討

作製した薬剤搭載テトラポーン 10 個を入れたセルインサート (Becton, Dickinson and Company) を、各種細胞 (C3H10T1/2、MC3T3-E1) を播種した培養皿に設置した。セルインサート下で培養した細胞において、Real-time RT-PCR により骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現および ALP 染色による ALP 活性を解析した。さらに、各種薬剤搭載型テトラポーンを一定期間毎に別に播種した細胞に移して同様の評価を行う事に

よって薬剤の徐放性が維持される期間を検討した (図 6)。

### 2-1-3 Real-time RT-PCR

1-1-2 と同様に行った

## 2-2 結果

### 2-2-1 SAG 搭載テトラボーンからの薬剤徐放効果

SAG 搭載テトラボーンを加えて培養したマウス未分化間葉細胞 (C3H10T1/2 細胞) は 4 日目には ALP の活性化および *Alp*、*Gli1* の発現上昇を認めたが、薬剤非搭載テトラボーンと培養した群では認めなかった。4 日毎に新たに準備した C3H10T1/2 細胞に SAG 搭載テトラボーンを移して培養したところ、SAG 徐放による ALP 活性の持続が染色では 12 日目まで確認された。*Alp*、*Gli1* の mRNA 発現上昇効果は 16 日目まで認められた (図 7 A)。

### 2-2-2 TH 搭載テトラボーンからの薬剤徐放効果

TH 搭載テトラボーンを加えて培養したマウス骨芽細胞様細胞株 (MC3T3E-1 細胞) は 10 日目には ALP の活性化および *Alp*、*Bglap* の発現上昇を認めたが、薬剤非搭載テトラボーンと培養した群では発現上昇は認めなかった。10 日毎に新たに準備した

MC3T3E-1 細胞に TH 搭載テトラボーンを移して培養した所、TH 徐放による ALP 活性の持続、及び Alp、Bglap の発現上昇効果は 30 日間以上認められた (図 7 B)。

### 2-3 小括

$\alpha$ -TCPを主成分とした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) にSAGとTHを搭載したところ、一定の期間SAGとTHを徐放した。

図 6

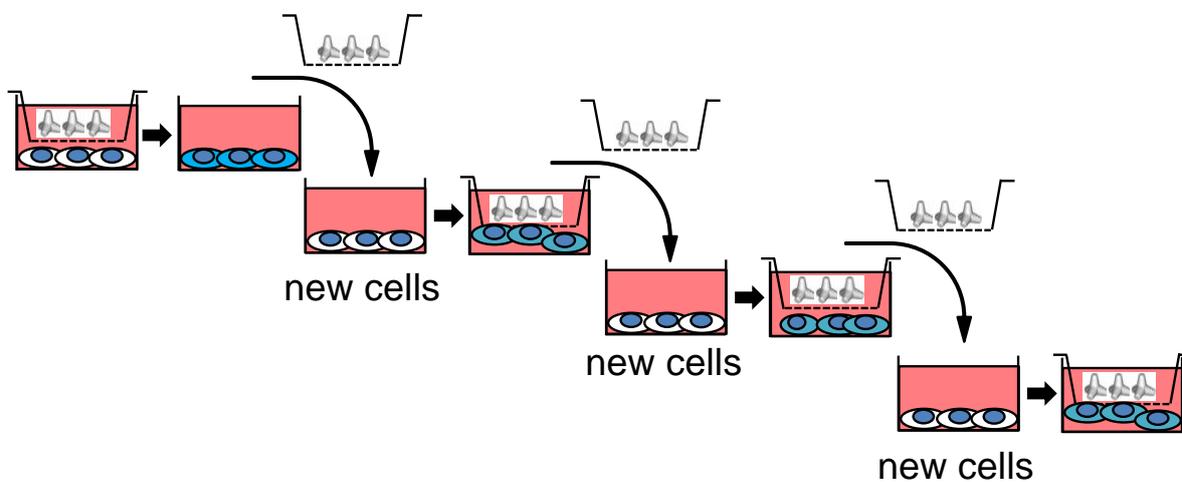


図 6 薬剤を搭載したテトラポーンからの薬剤徐放性の検討法

薬剤搭載型テトラポーン10個を入れたセルインサートを細胞播種した培養皿に設置した。セルインサート下で培養した細胞における骨芽細胞分化をReal-time RT-PCRによる骨芽細胞分化マーカーのmRNA発現の計測およびALP染色によって評価した。さらに、同じ薬剤搭載型テトラポーンを一定期間毎に別のプレートに播種した細胞に移して同じ評価を行った。このプロセスを繰り返す事によって、薬剤の徐放性の持続を観察した。

図 7

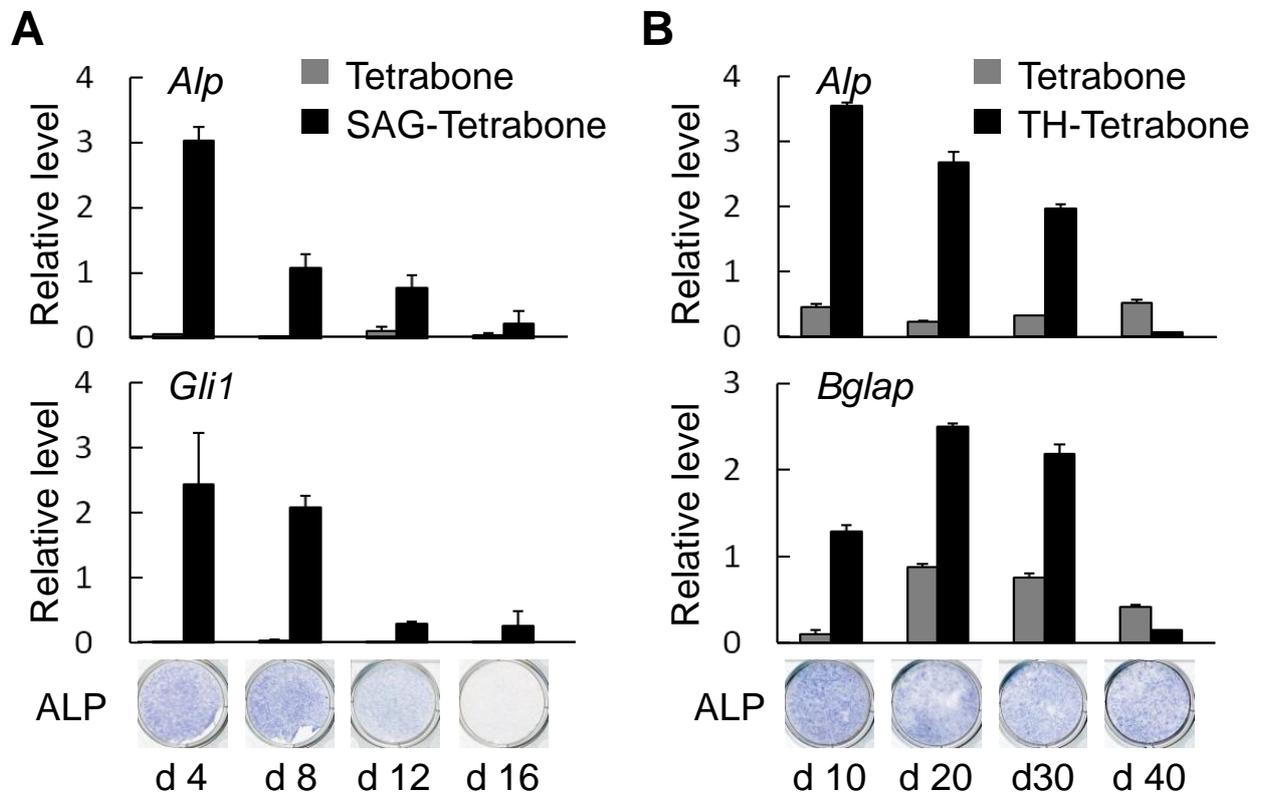


図 7 SAGとTHを搭載した微小テトラポッド型人工骨の薬剤徐放性に関する検討

(A) SAG搭載型テトラポーンからのSAG徐放性の検討：C3H10T1/2細胞を用いて、4日毎に新しく播種した細胞に交換し、Real-time RT-PCRによる*Alp*と*Gli1*のmRNA発現の定量的な測定を行い、ALP染色を行った。n=3

(B) TH搭載型テトラポーンからのTH徐放性の検討：MC3T3E-1細胞を用いて、10日毎に新しく播種した細胞に交換し、Real-time RT-PCRによる骨芽細胞初期分化マーカー（*Alp*）骨分化マーカー（*Bglap*）のmRNA発現の定量的な測定を行い、ALP染色を行った。n=3

## 第3章 SAGとTHを搭載した微小テトラポッド型人工骨の

### 滅菌後活性に関する検討

#### 背景と目的

臨床における実用性を考慮すると、人工骨は滅菌可能である必要がある。この章では、SAG 搭載テトラポーンと TH 搭載テトラポーンが滅菌後も薬理活性を維持するか検討した。

#### 3-1 材料と方法

##### 3-1-1 テトラポーンへのソニックヘッジホッグ (Shh) の搭載

2-1-1 で SAG 搭載テトラポーン、TH 搭載テトラポーンを作製したのと同じ方法で、SAG と同じ働きをもつ Hh タンパクである Shh の濃度  $10^{-6}$  M の DMSO 溶液にテトラポーンを浸漬し、Shh 搭載テトラポーンを作製した。

##### 3-1-2 エチレンオキシドガス (EOG) 滅菌

滅菌バッグ (ホギメディカル) で包装し、全自動酸化エチレンガス滅菌器イオジェルク (エルクコーポレーション) を用いて EOG 滅菌を行った。EOG 濃度 900 mg/l、温度 40°C の条件下で 6 時間滅菌後 2 時間排気し、吸排気交互方式によるエアレーション (曝気) を 14 時間行った。

### 3-1-3 Real-time RT-PCR

1-1-2 と同様に行った。

## 3-2 結果

### 3-2-1 SAG 搭載テトラボーンの滅菌後の薬理活性

C3H10T1/2 細胞を滅菌後の SAG 搭載テトラボーン 10 個を入れたセルインサートを培地に浸漬した培地で 4 日間培養した。Real-time RT-PCR により mRNA 発現を定量的に計測した結果、Alp、Gli1 の mRNA 発現レベルは未滅菌の SAG 搭載テトラボーンと培養した発現レベルと同等であった。同時に、比較対象として組換えタンパク質である Shh を搭載させたテトラボーンを用いて同じ実験を行った所、Shh 搭載テトラボーンは滅菌後には薬理活性を失った (図 8 A)。

### 3-2-2 TH 搭載型テトラボーンの滅菌後の薬理活性

3-2-1 と同様の実験を TH 搭載テトラボーンと MC3T3E-1 細胞を用いて 10 日間の培養で行った。その結果、Alp、Bglap の mRNA 発現レベルは未滅菌の TH 搭載テトラボーンと培養した場合の発現レベルと同等であった (図 8 B)。

### 3-3 小括

EOG滅菌はSAG搭載テトラポーン、TH搭載テトラポーンの骨形成促進効果に影響を与えなかった。

図 8

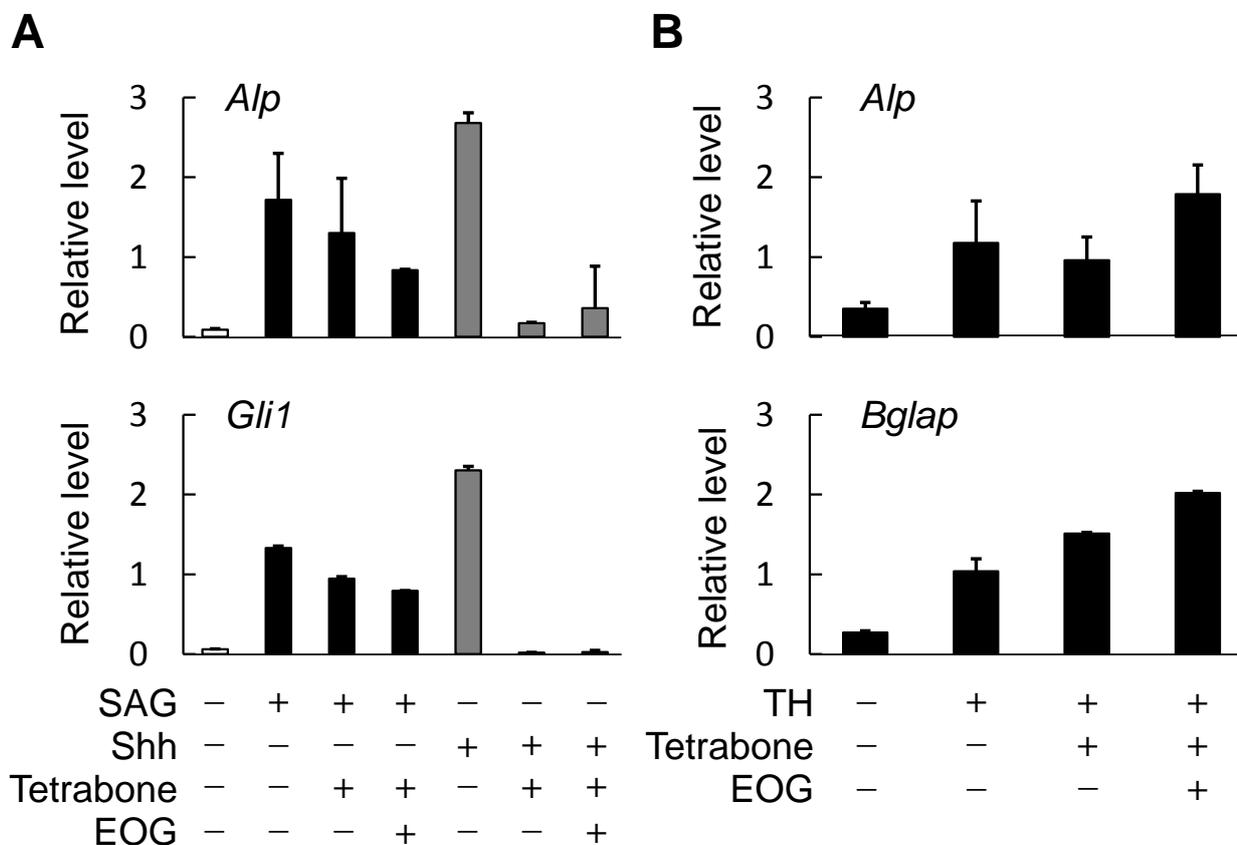


図 8 SAGとTHを搭載した微小テトラポッド型人工骨の滅菌後活性に関する検討

(A) SAG搭載テトラポーンの滅菌後の薬理活性

C3H10T1/2細胞をEOG滅菌後および未滅菌のSAG搭載テトラポーン10個を入れたセルインサートを培地に浸漬した培地で4日間培養した。また比較対象としてShh搭載テトラポーンを使用した。Real-time RT-PCRによるAlpとGli1のmRNA発現の定量的な測定を行った。n=3

(B) TH搭載型テトラポーンの滅菌後の薬理活性

MC3T3E-1細胞をEOG滅菌後または未滅菌のTH搭載テトラポーン10個を入れたセルインサートを培地に浸漬した培地で10日間培養した。Real-time RT-PCRによるAlpとBglapのmRNA発現の定量的な測定を行った。n=3

## 第4章 ラット大腿骨骨欠損モデルにおける

### 骨形成性薬剤徐放型微小テトラポッド型人工骨の骨再生効果の検討

#### 背景と目的

ここまでの検討で、低分子化合物である SAG と TH の組み合わせによる骨芽細胞分化誘導効果と、搭載した人工骨からの低分子化合物の徐放効果を確認した。この章では、SAG と TH を搭載した人工骨による骨再生効果をラット大腿骨に作製した骨欠損モデルを用いた *in vivo* 実験で検討した。

#### 4-1 材料と方法

##### 4-1-1 実験動物

11 週齢の雄 Wistar ラットを、日本クレアより購入し実験に供した。動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準（総理府告示）」、「東京大学医学部動物実験指針」に従って作成したプロトコールを、東京大学動物実験委員会の承認を得て行った。

##### 4-1-2 ラット大腿骨骨欠損モデル

イソフルレン吸入麻酔下の後、術野周囲を剃毛、皮膚、皮下組織、筋膜を切開して大腿二頭筋を明示した。これを分けて、骨膜を温存して大腿骨を露出させた。直径 2.2

mm の歯科用ラウンドバーを用いて、大腿骨骨体部に直径 2.2 mm の非貫通型の円柱状骨欠損を作製した。生理食塩水で骨欠損部周囲を洗浄した後、骨欠損を 20 個の薬剤搭載型テトラボーンを充填した (図 9 A)。4-0 ナイロン糸で筋肉縫合と皮膚縫合を行い、創を閉鎖した。術後 14 日目に、ペントバルビタールを腹腔内に過剰投与して安楽死させた。大腿骨を採取し、骨再生の評価に使用した。この骨欠損モデルは術後 14 日では自然治癒しない事を確認している (図 9 B)。

#### 4-1-3 放射線学的検討

卓上型マイクロフォーカス X 線 CT システム inspeXio SMX-90CT (島津製作所) を用いて、以下の条件で採取した大腿骨のマイクロ CT 撮影を行った。撮影条件は管電圧 90 kV、管電流 110  $\mu$  A、ビュー数 1800、アベレージ数 4、スキャン回数 1、画素サイズ 512x512 pixels、スケーリング係数 50、スライス厚 1  $\mu$  m。撮影したマイクロ CT データを基に 3 次元画像解析ソフト TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング) を用いて 3 次元画像を作成した。骨欠損部の直径 2.0 mm、高さ 0.5 mm の円柱状の領域からテトラボーンが占める領域 (CT value > 950) を除いた領域の新生骨体積 / (欠損体積 - テトラボーンの体積) bone volume/tissue volume (BV/TV), 骨塩量 bone mineral content (BMC) および骨密度数値 bone mineral density (BMD) を定量的に計測評価した。実験結果は平均  $\pm$  標準偏差として表記した。統計学的解析として、Factorial

analysis of variance (ANOVA) にて比較し、有意差の検定は、Tukey 法を用いた post-hoc テストにて行った。

#### 4-1-4 組織学的検討

採取した大腿骨を4% パラホルムアルデヒドPBS溶液中で一晩固定した。凍結切片(厚さ 10  $\mu\text{m}$ ) を川本法により作製[21]。各切片を H-E 染色と von Kossa 染色で評価した。Osterix の免疫染色には、一次抗体に抗 Osterix 抗体 (Abcam)を用い、ブロッキング溶液で 5000 倍希釈して使用し、二次抗体は Alexa Fluor 488 (Invitrogen)をブロッキング溶液で 500 倍希釈して実験に使用した[22]。組織像は蛍光バイオ顕微鏡 BZ-8100 (Keyence)を使用して撮影した。

## 4-2 結果

薬剤非搭載テトラボーン、SAG 搭載テトラボーン、TH 搭載テトラボーン、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を 11 週齢のラット大腿骨骨体部に作製した骨欠損に充填し、術後 14 日で骨再生を評価した。

### 4-2-1 骨再生の放射線学的評価

SAG 搭載テトラボーンと TH 搭載テトラボーンを組み合わせで移植した群では、他

の群と比較して骨欠損表面が平滑になる程度にまでの骨再生を認めた、この組み合わせが皮質骨領域に至る程の骨治癒を促進したことを示している。マイクロ CT 撮影データを用いた三次元画像および断面の BMD 画像では組み合わせ移植群においてテトラボーン移植群、SAG 搭載テトラボーン移植群、TH 搭載テトラボーン移植群よりも骨再生が進行している事が認められた (図 1 0)。

この傾向はマイクロ CT データを用いた定量的評価でも確認された (図 1 1)。組み合わせ移植群では欠損部の皮質骨領域において、新生骨体積の欠損領域体積に対する割合を示す BV/TV が他の群より有意に高い数値を示した。SAG 搭載テトラボーン移植群もテトラボーン移植群に比して有意な BV/TV を示したが、組み合わせ移植群はより有意に大きな数値を示した。加えて、新生骨の骨質を表す BMC と BMD でも組み合わせ移植群は最も高い数値を示した。

#### 4-2-2 骨再生の組織学的検討

凍結切片を用いて H-E 染色と von Kossa 染色を行ったところ、組み合わせ移植群では骨欠損部を覆うように骨架橋が形成されていた。骨架橋は SAG 搭載テトラボーン移植サンプルでも認めたものの、組み合わせ移植サンプルでより形成が明確であった (図 1 2 A)。テトラボーン移植サンプルや TH 搭載テトラボーン移植サンプルでは、骨架橋の形成もわずかに認めるものの、欠損部には結合組織が侵入して充満していた。

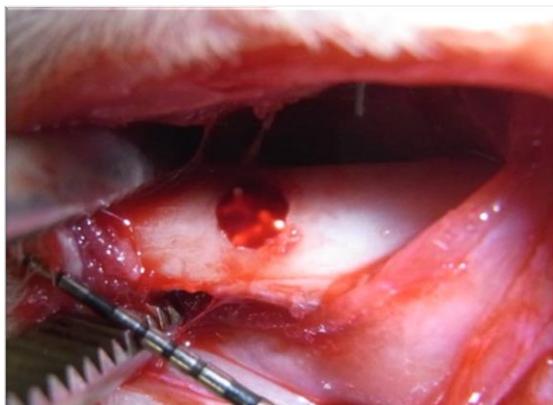
組み合わせ移植群のサンプルを用いた免疫組織学的染色の結果では骨芽細胞マーカーである Osterix 陽性の細胞が骨架橋部および移植したテトラポーン周囲に並んでおり、骨芽細胞がこの領域の骨形成に寄与している事が示唆された (図 1 2 B)。

#### 4-3 小活

SAG 搭載テトラポーンと TH 搭載テトラポーンを組み合わせで移植する事により、ラット大腿骨骨欠損モデルにおいて細胞移植を必要としない骨再生を達成した。

図9

A



B

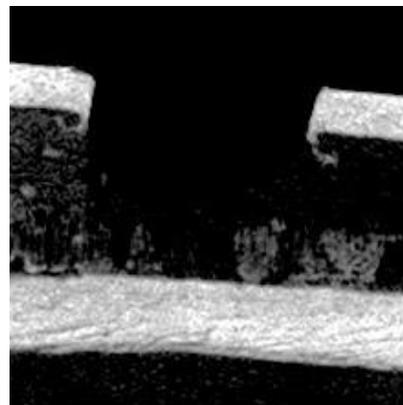


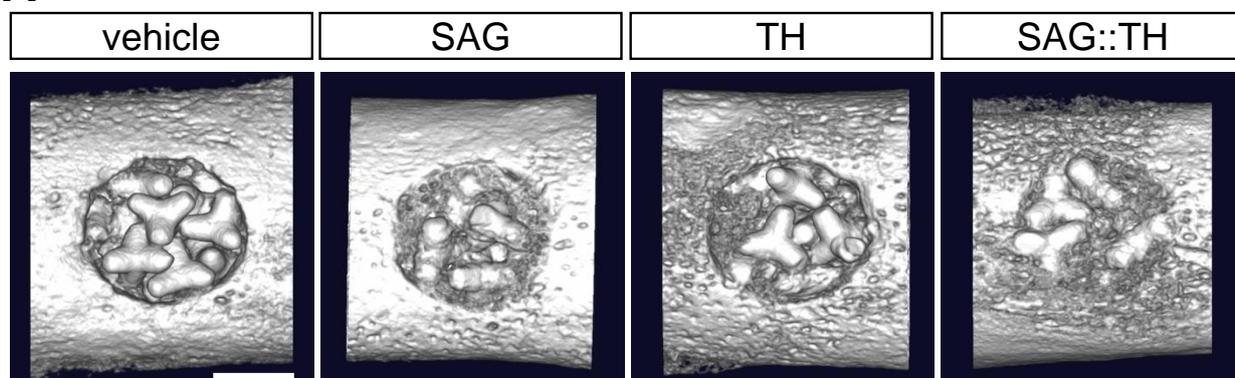
図9 ラット大腿骨骨欠損モデル

(A) 11週齢の雄Wistar ラットの大腿骨骨体部に直径2.2 mmの非貫通型の円柱状骨欠損を作製し、骨欠損に20個の薬剤搭載型テトラボーンを充填した。

(B)術後14日の骨欠損モデルのテトラボーンを補填していない自然治癒マイクロCT像。  
Bar 1 mm n=3

図 10

A



B

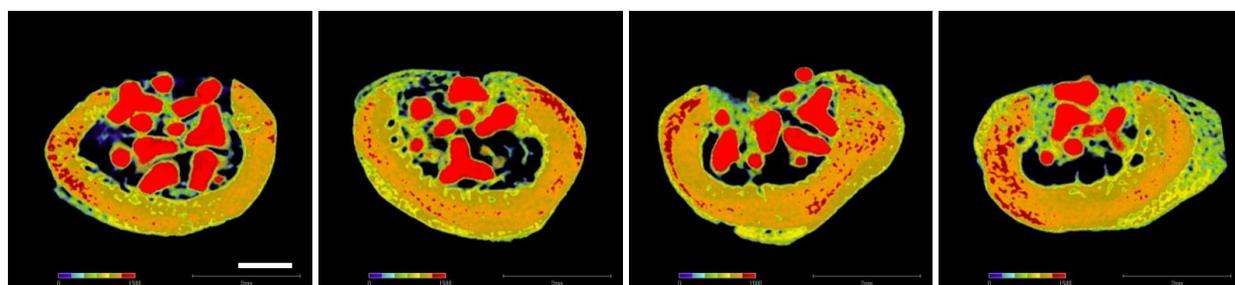


図 10 骨再生の放射線学的検討（術後14日）

薬剤非搭載テトラボーン移植群、SAG搭載テトラボーン移植群、TH搭載テトラボーン移植群、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マイクロCT像での骨再生の評価を行った。

(A) マイクロCTによる3次元構築画像：Bar 1.0 mm. n=8

(B) マイクロCTデータを使用した骨欠損モデル部断層の骨密度数値（BMD値）像：  
BMD値：Max1,500~min 0（レッド>オレンジ>イエロー>グリーン>シアン>ブルー）  
Bar 1.0 mm. n=8

図 1 1

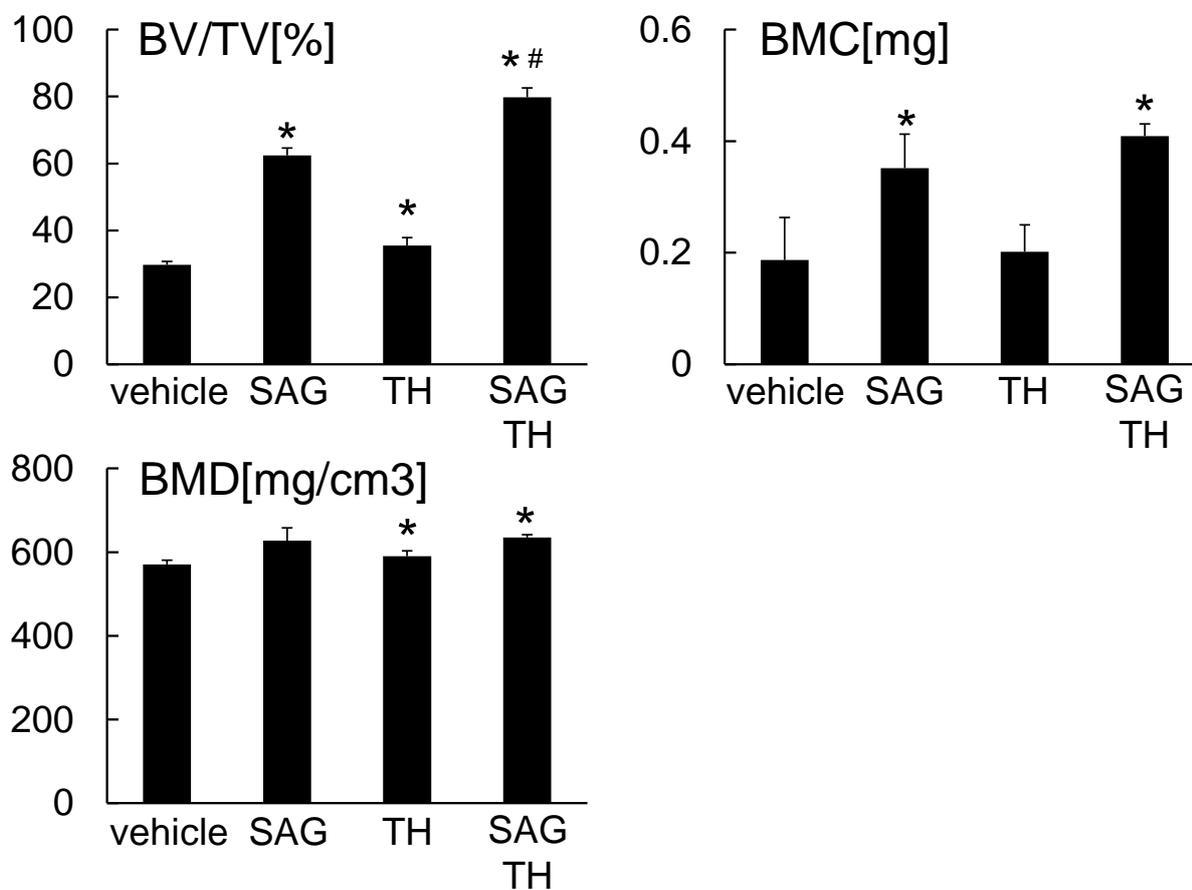


図 1 1 骨再生の定量的計測（術後14日）

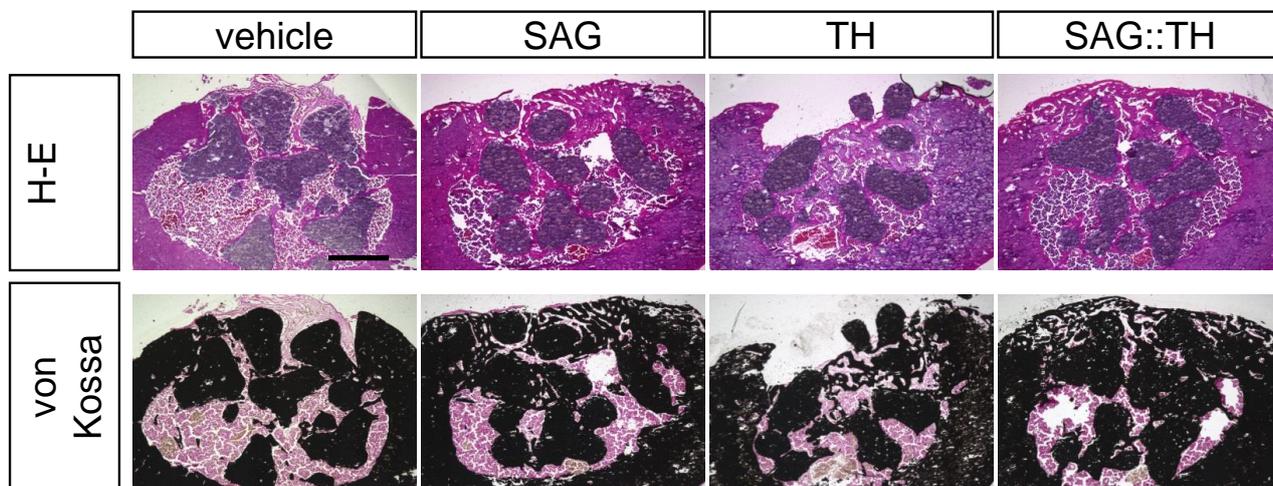
マイクロCT撮影データを基に、骨欠損モデルの皮質骨部分に相当する直径2.0 mm 高さ0.5 mmの円柱型領域での、新生骨体積/（欠損体積-テトラボーンの体積）

（BV/TV）、新生骨塩量（BMC）、新生骨密度数値（BMD）を定量的に測定した。

\* $p < 0.05$ でControlとの有意差，# $p < 0.05$ でSAG搭載テトラボーン移植群と有意差.  $n = 8$

図 1 2

**A**



**B**

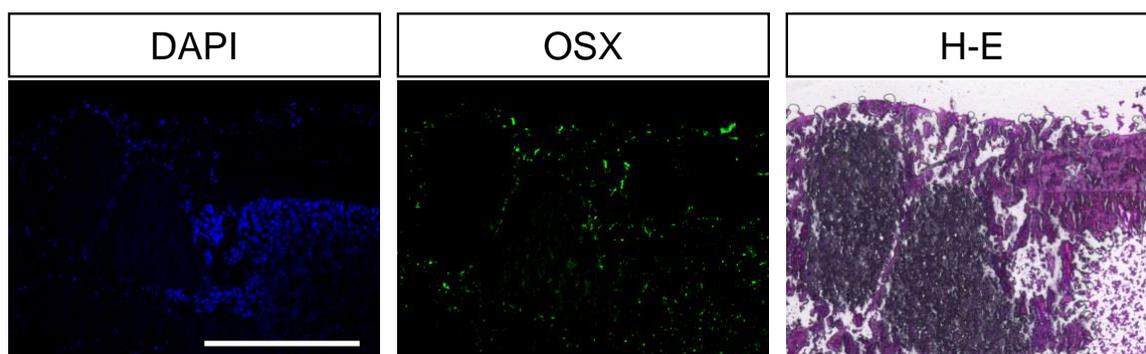


図 1 2 骨再生の組織学的検討（術後14日）

(A) H-E染色（上） von Kossa染色（下） Bar, 1.0 mm. n = 8

(B) SAG搭載テトラボンとTH搭載テトラボンの組み合わせ移植サンプル  
DAPIによる核染色(左)、抗O<sub>sx</sub>抗体を用いた免疫蛍光染色(中央)、H-E染色(右)  
Bar, 1.0 mm.

## 第5章 ビーグル犬大腿骨骨欠損モデルにおける

### 骨形成性薬剤徐放型微小テトラポッド型人工骨の骨再生効果の検討

#### 背景と目的

SAG 搭載テトラポーンと TH 搭載テトラポーンを組み合わせる事により、ラット大腿骨骨欠損モデルにおいて細胞移植を必要としない骨再生を達成した。この章では SAG と TH の両方を搭載した SAG+TH 搭載テトラポーンの骨再生効果を大動物（ビーグル犬）に作製した骨欠損モデルにおいてさらに検証した。

#### 5-1 材料及び方法

##### 5-1-1 実験動物

12 月齢の雄 3 頭、11 月齢の雌 2 頭の健常なビーグル犬 5 頭を日本医科学動物資材研究所より購入して実験に供した。体重は 9.6 kg から 11.0 kg（平均 10.4 kg）で、実験に先立って行った身体検査、全血球計算検査および血液生化学的検査では、全頭に異常は認められなかった。動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準（総理府告示）」、「東京大学医学部動物実験指針」に従って行った。

##### 5-1-2 骨欠損作成方法と移植方法

動物を背臥位に保定し膝関節外側皮膚、腸脛靭帯、関節包を切開し展開。大腿骨顆部を露出し直径 5 mm のドリルにて掘削し、大腿骨外顆に直径 5 mm、深さ 8 mm の円筒形骨欠損を作製し、生理食塩水で骨欠損部周囲を洗浄した後、SAG+TH 搭載テトラポーンもしくはコントロールとして薬剤を搭載していないテトラポーンを充填した (図 13A)。その後関節包、腸脛靭帯縫合し、皮下皮膚も縫合した。術後 4 週目に、血液学的検査のための採血を行った後に、塩化カリウムを静脈内に過剰投与して安楽死させ、大腿骨を採取し骨再生を評価した。この骨欠損モデルは術後 4 週間では自然治癒しない事を確認している (図 13B)。

### 5-1-3 放射線学的検討

4-1-3 と同様にマイクロ CT を撮影した。撮影条件は管電圧 90 kV、管電流 110  $\mu$ A、ビュー数 1200、アベレージ数 8、スキャン回数 1、画素サイズ 512 $\times$ 512 pixels、スケーリング係数 50、スライス厚 1  $\mu$ m とした。撮影したマイクロ CT データを基に、新生骨体積 / (欠損体積 - テトラポーンの体積) bone volume/tissue volume (BV/TV)、骨塩量 bone mineral content (BMC) および骨密度数値 bone mineral density (BMD) を定量的に計測評価した。2 群の計測結果の平均値は student t-test によって分析した。

## 5-2 結果

### 5-2-1 全血球計算結果、血液生化学的検査結果

全個体に対して、骨欠損モデル作製手術前、標本回収前に採血を行い、血液検査を施行した。参照範囲からはずれて異常値を示した個体は認めなかった（表 2）。

### 5-2-2 放射線学的検討

術後 4 週のマイクロ CT 撮影データを用いた断面の BMD 画像では薬剤非搭載テトラボーン移植群、SAG+TH 搭載テトラボーン移植群の双方で移植人工骨周囲は高い BMD 値を示しており、骨再生効果を認めた（図 14A）。

この傾向はマイクロ CT データを用いた定量的評価でも確認された（図 14B）。

BV/TV と BMC では SAG+TH 搭載テトラボーン移植群の方が n=3 の平均値では高い値を示したが、統計学的有意差は認めなかった。BMD では SAG+TH 搭載テトラボーン移植群が有意に高い平均値を示した。

## 5-3 小括

ビーグル犬大腿骨骨欠損モデルでの骨再生の定量的測定において、薬剤非搭載テトラボーン移植群と比べて、SAG+TH 搭載テトラボーン移植群の BV/TV、BMC は統計学的に有意な差を示さなかったが、BMD は有意に高値を示した。また、測定項目・観察期間共に限られているものの、SAG+TH 搭載テトラボーンの移植群の血液データ

に異常な変化がなかったことから、ある程度の安全性が確認された。

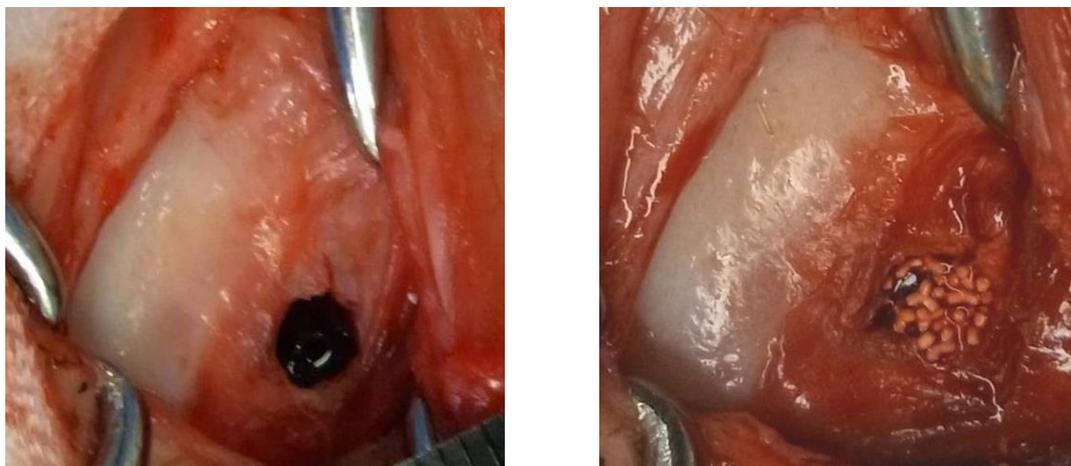
今後の課題としては、骨標識物質を使用した組織学的検討による骨再生速度の測定を行うことで、SAG+TH 搭載テトラボーンによる骨再生速度の亢進を検証する必要がある。

表 2 各個体の全血球計算結果、血液生化学的検査結果

		個体 1		個体 2		個体 3		個体 4		個体 5	
参照 範囲		術前	術後 4 週	術前	術後 4 週	術前	術後 4 週	術前	術後 4 週	術前	術後 4 週
全血球検査											
WBC	6000- 17000	10100	10900	9300	9500	8800	9500	7000	14300	9300	11000
RBC	550- 850	687	758	875	639	836	703	797	672	847	621
Hgb	12.0- 18.0	15.3	18	19	14.8	19.3	17.4	16.9	15.1	18.5	13.7
Hct	37.0- 55.0	47	48.5	53.3	394	54	42.3	46.6	40.5	51.6	38.5
MCV	60.0- 75.0	62.6	64	60.9	61.7	64.6	60.2	58.5	60.3	60.9	62
MCH	19.5- 24.5	22.3	23.7	21.7	23.2	23.1	24.8	21.2	22.5	21.8	22.1
MCH C	32.0- 38.0	35.6	37.1	35.6	37.6	35.7	41.1	36.3	37.3	35.9	35.6
PLT	20-50	30.1	22.9	35.2	30.4	28.5	28	17.6	35.9	25.9	36.4
生化学検査											
ALT	21- 102	100	36	32	26	30	26	41	23	96	21
ALP	20- 156	169	230	132	153	286	232	205	161	237	208
BUN	10.0- 28.0	13.5	10.4	11.3	8.6	16.3	9	12.7	10.1	12.1	14
Cre	0.5-1.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.5	0.3	0.4	0.6	0.8
Na	141- 152	148	147	143	147	151	147	146	146	147	148
K	4.37- 5.35	4.2	4.4	4.5	4.9	4.1	4.3	4.8	4.1	3.8	3.9
Cl	105- 115	118	113	114	115	111	116	115	114	116	116

図 1 3

A



B

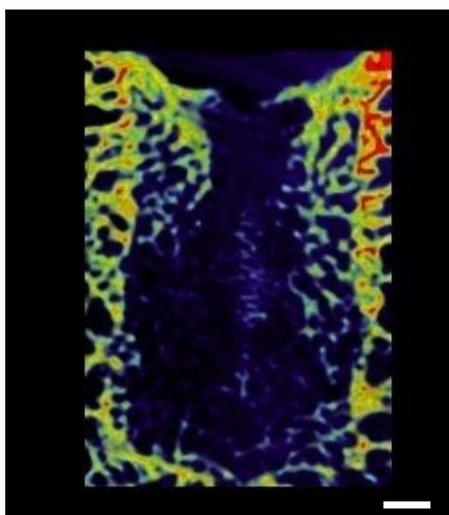


図 1 3 ビーグル犬大腿骨骨欠損モデル

(A)11月齢～12月齢のビーグル犬大腿骨外顆に直径5 mm、深さ8 mmの円筒形骨欠損を作製し、骨欠損をSAG+TH搭載テトラボーンもしくは薬剤非搭載テトラボーンを充填した。

(B)術後4週の骨欠損部断面のBMD画像。 Bar 1 mm

図 1 4

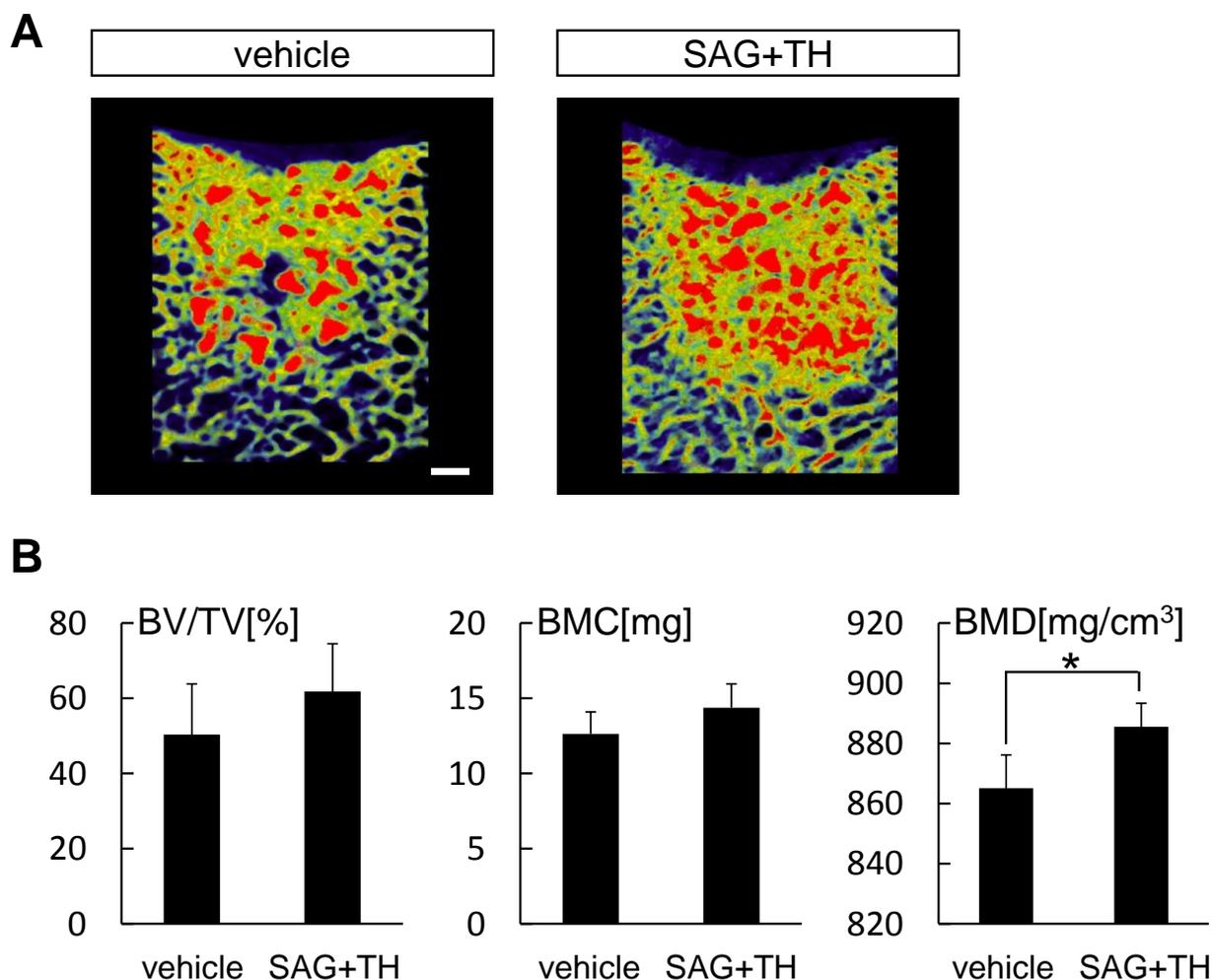


図 1 4 骨再生の放射線学的検討 (術後4週)

薬剤非搭載テトラボーン移植群、SAG+TH搭載テトラボーン移植群のマイクロCT像での骨再生の評価を行った。

(A) マイクロCTデータを使用した骨欠損モデル部断層の骨密度数値 (BMD値) 像 :  
BMD値 : Max1,500~min 0 (レッド>オレンジ>イエロー>グリーン>シアン>ブルー)  
Bar 1.0 mm . n=3

(B) マイクロCT撮影データを基に、骨欠損モデルの皮質骨部分に相当する直径2.0 mm  
高さ 0.5 mmの円柱型領域での、新生骨体積 / (欠損体積 - テトラボーンの体積)  
(BV/TV)、新生骨塩量 (BMC)、新生骨密度数値 (BMD) を定量的に測定した。

\*p < 0.05 n = 3

## 第6章 考察

本研究から得られた主な知見は以下の5点である。

1. 骨芽細胞分化における異なる段階で効果を持つ低分子化合物であるSAGとTHを組み合わせて同時曝露する事により、未分化細胞から成熟骨芽細胞への分化を効率的に誘導出来た。
2.  $\alpha$ -TCPを主成分とした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）にSAGとTHを搭載した所、一定の期間SAGとTHを徐放した。
3. EOG滅菌はSAG搭載テトラボーン、TH搭載テトラボーンの骨形成促進効果に影響を与えなかった。
4. SAG搭載テトラボーンとTH搭載テトラボーンを組み合わせて移植する事により、ラット大腿骨骨欠損モデルにおいて細胞移植を必要としない骨再生を達成した。
5. ビーグル犬大腿骨骨欠損モデルへの移植実験では、SAG+TH搭載テトラボーンの移植によって骨再生が促進する傾向を認め、血液検査によって一定の安全性が確認された。

本研究は滅菌可能な骨形成性薬剤徐放型微小テトラポッド型人工骨の開発の基礎的研究であり、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る。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、欠損内部の各所において調合を変えること等で、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された。一方で、このコンセプトが新たな骨再生医療戦略として実際の臨床に貢献するためにはさらに以下の4つのポイントの検討が必要であると考えている。

- ① 使用した二つの骨形成性低分子化合物のうち SAG の標的分子は解明されているが、もう一方の TH の標的分子は解明されておらず、これを解明する必要がある。

SAGについては、Hhシグナルの調節と生体での骨再生の関連性に関する複数の報告がこれまでに認められる。Shh遺伝子がウイルスによって形質導入された歯肉線維芽細胞、骨膜由来細胞、脂肪由来幹細胞、骨膜細胞は骨再生を促進する事がin vivo実験で報告されている[23, 24]。Wangらは、Hhシグナルの欠損マウスにおいて骨治癒不全を認める事を報告している[24]。またHojoらにより骨・軟骨前駆細胞から骨芽細胞への分化決定機構において、Hhシグナルによって分化の運命が規定される事が報告されている[13]。最近、骨芽細胞分化の誘導効果に加えて、血管新生の促進が、Hhを介した生体での骨再生に寄与している事が示唆されている[25]。Songらはラットの頭蓋骨に作製した直径8 mmの円形骨欠損モデルにおいて、Fgf2とShhの両方を形質導入された

BMSCsの細胞移植で各々単独を形質導入した細胞の移植より高い骨再生効果を認めたと報告している[26]。FGF2は血管新生の効果を持つ成長因子の一つであり[27]、Fgf2とShhの組み合わせによる効果はHhを介した骨再生における血管新生促進の寄与を示唆している。この事実はまた、本研究のように複数のシグナルを介した刺激を行うことが、生体における骨再生の促進には有効である可能性を示唆している。

一方で、THが骨再生にどのような分子生物学的メカニズムで有効であるのかを解明するにはさらなる検討が必要である。我々は、BMPやRunx2の濃度依存性に骨芽細胞前駆細胞の成熟を促進するTHの効果を発見しているが[17]、THの直接的な標的分子はいまだ不明である。そのため、THの直接の標的を同定するために、TH結合型ナノ磁性ビーズを作製し、細胞抽出液のアフィニティ精製を行い、液体クロマトグラフィ質量分析計(LC/MS/MS)を用いてTH結合タンパク質を同定する方法を検討している。この方法は標的分子を網羅的に検索する方法よりも効率的であり、ヒット率の高い方法であると考えている。このアプローチは、サリドマイドの標的分子の同定を通じ、新たな四肢形成関連分子としてセレブロンを同定した研究に支持されており、科学的に妥当な方法である[28]。次に、同定した分子の精製タンパク質を用いてTHとの結合を確認する。同定分子が、THの骨分化促進作用に寄与するか検証するため、遺伝子発現系を用いた機能獲得実験、siRNAを用いた機能喪失実験を行う。これによりTHの作用機序が明らかとなると考えられる。

② **SAG** 搭載テトラボーンと **TH** 搭載テトラボーンの混合移植によって効果的な骨再生効果を得たが、これら二種各々の人工骨が骨欠損部の骨再生において、どの時期にどこに分布している細胞に作用をしているのかを分子生物学的に解明する必要がある。

**SAG**と**TH**の異なる徐放の期間はリン酸化カルシウムとの親和性の違いによるものと推測できる。また、本研究のラット大腿骨骨欠損モデルおよびビーグル犬大腿骨骨欠損モデルへの移植実験においては、最初に**SAG**が欠損部周囲の骨髄間質系細胞あるいは骨膜に存在する前駆細胞の骨芽細胞への運命決定を行い、続いて**TH**が成熟骨芽細胞への分化を促進するという連携的な作用により、骨再生が誘導されたと考えられる。この仮説を検証するために、**SAG**に関しては**Cre-loxP**システムを利用し、**Gli1-CreERT**ノックインマウスと**Rosa26-LacZ**マウスの交配により作出される**Gli1-CreERT;Rosa26-LacZ**複合変異マウスを用いる実験を検討している。タモキシフェンの投与により、投与時期特異的、**Gli1**発現細胞特異的に**Cre-LoxP**による組換えが起こり、**LacZ**が発現するようになる。これにより、骨再生過程における**Gli1**発現細胞が時間的・空間的に明らかとなる。このマウスを用いて骨欠損モデルを作製し、**SAG**搭載した微小人工骨を移植するタイミングに対して、タモキシフェン投与時期を時系列

で変える事によって、移植したSAG搭載型人工骨によってHhシグナルが活性化した細胞が骨再生の過程においてどの時期にどの部位に存在しているかを検索する。THに関しては前記した検討により標的分子や作用機序が明らかになった後に実験系を検討する。この実験系により、*in vitro*で示した徐放効果が*in vivo*でも発揮されているか否か、そしてその標的細胞は何かという点が検証可能になる。

③ 臨床への実用を考えると、より大型の動物におけるサイズの大きい欠損での有効性・安全性の検討を行う必要がある。

SAG と TH の大型動物における bio-distribution と毒性の検討が必要である。特に、Hh シグナルについては多くの研究によって不適切なシグナルの活性化による腫瘍の発生が報告されているため[29]、SAG による Hh シグナルの活性化による腫瘍形成の可能性に注意しなければならない。しかしながら、我々は以下の2つの点で本システムでは腫瘍発生の可能性は低いと考えている。1つ目は、これまでに Hh シグナルの調節異常による悪性骨腫瘍の発生の報告は無い点である[29]。2つ目は、本システムでは SAG は局所的に送達されるようコントロールされており、*in vitro* 実験で示したようにテトラボーンからの徐放期間は一時的であるため、腫瘍発生を引き起こすほどの十分な高さの血中濃度は持続しないと考えられる。

本研究で行ったビーグル犬大腿骨骨欠損モデルを用いた実験では、薬剤搭載型人工骨の移植前後で血液検査の異常な結果は認められずある程度の安全性は示唆された。しかしながら、測定項目は限られており、観察期間も4週と短期のため、より長期の詳細な安全性の検討が必要と考えられる。

- ④ 開発した人工骨が、臨床においてどのような状態の骨欠損の治療に寄与し得るのか特定する必要がある。

臨床においてインプラント全体を滅菌することは、外科処置後の感染を防ぐための最も簡便で効果的である。しかしながら、細胞やタンパクが搭載された治療用インプラントでは、搭載された細胞やタンパクの生理活性を損失させずに滅菌を行う事はほぼ不可能である。実際、本研究でもタンパクであるShhを搭載したテトラボーンは、EOG滅菌後に活性を失った。それゆえ、低分子化合物を使用している本人工骨の滅菌可能な点が、細胞やタンパクを搭載した人工骨に比して、臨床における有利さにつながると考えられる。

本研究で使用したSAGとTH以外の骨形成性低分子化合物として、スタチン[30]、イソフラボン誘導体[31-33]、TAK-778[34]等が報告されている。その中で、スタチンとその誘導体は最も幅広く *in vivo* 実験での骨再生効果の検討が報告されている。高容量

のロバスタチンの経口投与により、BMP2の発現を介して骨形成が促進した事が報告されている[30]。またWangらは、卵巣切除マウスにおいてシンバスタチンの局所注射により骨折の治癒が促進したと報告している[35]。Rojbaniらはラット頭蓋骨骨欠損において、シンバスタチンを混和したTCP材料への骨組織の侵入を報告している[36]。一方で、Cottrellらは、ラットの大腿骨骨欠損にロバスタチン含有ハイドロゲルを移植したが、骨再生が促進されなかったと報告しており、その理由としてロバスタチンの材料からの徐放が持続されなかったためであると考察している[37]。これらの結果はスタチン製剤の骨形成促進の有効性を示すとともに、低分子化合物を用いた骨再生医療を実現するには、*in vivo*で欠損部に局所的かつ持続的に化合物を届ける適切な担体が不可欠であることを示している。本研究で使用したテトラボーンはハイドロゲルのように*in vivo*で速やかに吸収が起きる材質ではないが、長期的には徐々に吸収・置換される。つまり、*in vivo*においては、*in vitro*で示した徐放プロファイルとは異なり、テトラボーンそのものの吸収による化合物の放出が加わる可能性が考えられる。吸収の過程が開始後もなお徐放性を維持するには、テトラボーンの原料のリン酸カルシウム粉末に化合物を混和する事も考えられるが、製造の焼成過程では最高温度は700°Cに達し、低分子化合物であっても生理活性を失うことが予想される。そのため、本実験では化合物溶液への浸漬によって搭載を行った。したがって、本システムの有効性と作用メカニズムの検証においては、*in vivo*における化合物の放出挙動も調

査する必要がある。

本システムの臨床応用に向けては、このシステムの有効性を臨床的に意義のある骨欠損モデルで検討する必要がある。本人工骨は形状の分類では顆粒状、生体活性に基づいた分類では骨と置換される材料であり薬理物質を含有するハイブリッド型材料となる。そのため、この人工骨は、骨補填材だけの移植よりもより早く確実な骨再生が達成されることによって、治療成功率の上昇が望まれる難治性骨欠損部位での適用が期待される。これまでの研究でラット大腿骨に作製した円柱状骨欠損での有効性が確認されており、整形外科領域での長管骨の難治性の骨折での使用には有効であると考えられる。その他には、例えば口腔外科領域では上顎歯槽骨欠損に対する上顎洞底挙上術等への適応が期待されるが、こういった膜性骨欠損での有効性の検討には膜性骨の欠損モデルであるラットの頭蓋骨骨欠損モデルでの有効性の検討を行う必要がある[38]。

臨床応用に向けて、上記の①～④の様にさらなる基礎検討の余地はあるものの、本研究は、大量生産が可能で作製・滅菌・保存が簡便な低分子化合物と組織誘導活性を有する生体材料を用いることで、細胞を移植することなく組織再生を誘導する **proof of concept** とも位置付けられ、再生医療全般の新たな方向付けに貢献しうるものであると考えられる。

## 謝辞

基礎研究に従事する機会を与えてくださり、御指導・御鞭撻を賜った東京大学大学院医学系研究科 口腔外科学 高戸毅教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、研究の基礎から終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜わり、また本論文の作成に当たり有用な御助言のみならず、終始暖かい励ましのお言葉をかけて頂いた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 鄭雄一教授 大庭伸介特任准教授に心から感謝申し上げます。 器官培養系実験に関する御指導と有益な御助言を賜わった北條宏徳博士に深謝いたします。

ビーグル犬大腿骨骨欠損モデル実験におけるに関する御指導と有益な御助言を賜わった崔成真博士および実験の補助を頂いた柏木美樹氏に深謝いたします。

最後に実験の技術的指導と貴重な御助言を賜わりました矢野文子博士、下畑宣行博士をはじめ諸先生方に厚く感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Kronenberg HM: Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423:332, 2003
2. Hoexter DL: Bone regeneration graft materials. *J Oral Implantol* 28:290, 2002
3. Parikh SN: Bone graft substitutes in modern orthopedics. *Orthopedics* 25:1301, 2002
4. Lane JM: Bone graft substitutes. *West J Med* 163:565, 1995
5. Hislop WS, Finlay PM, Moos KF: A preliminary study into the uses of anorganic bone in oral and maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg* 31:149, 1993
6. Tessier P, Kawamoto H, Matthews D, Posnick J, Raulo Y, Tulasne JF, Wolfe SA: Autogenous bone grafts and bone substitutes--tools and techniques: I. A 20,000-case experience in maxillofacial and craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg* 116:6S, 2005
7. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW: Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J Craniofac Surg* 16:981, 2005
8. Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B: Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm* 58:197, 2004
9. Fang J, Zhu YY, Smiley E, Bonadio J, Rouleau JP, Goldstein SA, McCauley LK, Davidson BL, Roessler BJ: Stimulation of new bone formation by direct transfer of

osteogenic plasmid genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5753, 1996

10. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP: Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13:2072, 1999

11. Chung UI, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM: Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J Clin Invest* 107:295, 2001

12. 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* 14:689, 2008

13. 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 participates in the hedgehog-mediated specification of the osteoblast lineage during endochondral ossification. *J Biol Chem*, 2012

14. Wang Y, McMahon AP, Allen BL: Shifting paradigms in Hedgehog signaling. *Curr Opin Cell Biol* 19:159, 2007

15. Chen JK, Taipale J, Young KE, Maiti T, Beachy PA: Small molecule modulation of Smoothed activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14071, 2002

16. Frank-Kamenetsky M, Zhang XM, Bottega S, Guicherit O, Wichterle H, Dudek H, Bumcrot D, Wang FY, Jones S, Shulok J, Rubin LL, Porter JA: Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothened agonists and antagonists. *J Biol* 1:10, 2002
17. 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* 357:854, 2007
18. 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* 395:502, 2010
19. 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* 8:2340, 2012
20. Kugimiya F, Kawaguchi H, Kamekura S, Chikuda H, Ohba S, Yano F, Ogata N, Katagiri T, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Chung UI: Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP) 2 and BMP6 in bone formation. *J Biol Chem* 280:35704, 2005
21. Kawamoto T: Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. *Arch Histol Cytol*

66:123, 2003

22. Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, Nishida N, Akune T, Yoshimura N, Nakagawa T, Nakamura K, Tokunaga K, Chung UI, Kawaguchi H: Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med* 16:678, 2010
23. Edwards PC, Ruggiero S, Fantasia J, Burakoff R, Moorji SM, Paric E, Razzano P, Grande DA, Mason JM: Sonic hedgehog gene-enhanced tissue engineering for bone regeneration. *Gene Ther* 12:75, 2005
24. Wang Q, Huang C, Zeng F, Xue M, Zhang X: Activation of the Hh pathway in periosteum-derived mesenchymal stem cells induces bone formation in vivo: implication for postnatal bone repair. *Am J Pathol* 177:3100, 2010
25. Rivron NC, Raiss CC, Liu J, Nandakumar A, Sticht C, Gretz N, Truckenmüller R, Rouwkema J, van Blitterswijk CA: Sonic Hedgehog-activated engineered blood vessels enhance bone tissue formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:4413, 2012
26. Song K, Rao NJ, Chen ML, Huang ZJ, Cao YG: Enhanced bone regeneration with sequential delivery of basic fibroblast growth factor and sonic hedgehog. *Injury* 42:796, 2011
27. Cohen MM: The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A* 140:2646, 2006

28. Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H: Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* 327:1345, 2010
29. Kar S, Deb M, Sengupta D, Shilpi A, Bhutia SK, Patra SK: Intricacies of hedgehog signaling pathways: a perspective in tumorigenesis. *Exp Cell Res* 318:1959, 2012
30. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G: Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 286:1946, 1999
31. Notoya K, Yoshida K, Tsukuda R, Taketomi S: Effect of ipriflavone on expression of markers characteristic of the osteoblast phenotype in rat bone marrow stromal cell culture. *J Bone Miner Res* 9:395, 1994
32. Civitelli R: In vitro and in vivo effects of ipriflavone on bone formation and bone biomechanics. *Calcif Tissue Int* 61 Suppl 1:S12, 1997
33. Hojo H, Igawa K, Ohba S, Yano F, Nakajima K, Komiyama Y, Ikeda T, Lichtler AC, Woo JT, Yonezawa T, Takato T, Chung UI: Development of high-throughput screening system for osteogenic drugs using a cell-based sensor. *Biochem Biophys Res Commun* 376:375, 2008
34. Notoya K, Nagai H, Oda T, Gotoh M, Hoshino T, Muranishi H, Taketomi S, Sohda T, Makino H: Enhancement of osteogenesis in vitro and in vivo by a novel osteoblast differentiation promoting compound, TAK-778. *J Pharmacol Exp Ther* 290:1054, 1999

35. Wang JW, Xu SW, Yang DS, Lv RK: Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat. *Osteoporos Int* 18:1641, 2007
36. Rojbani H, Nyan M, Ohya K, Kasugai S: Evaluation of the osteoconductivity of  $\alpha$ -tricalcium phosphate,  $\beta$ -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. *J Biomed Mater Res A* 98:488, 2011
37. Cottrell JA, Vales FM, Schachter D, Wadsworth S, Gundlapalli R, Kapadia R, O'Connor JP: Osteogenic activity of locally applied small molecule drugs in a rat femur defect model. *J Biomed Biotechnol* 2010:597641, 2010
38. Gomes PS, Fernandes MH: Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim* 45:14, 2011