

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 前田 祐二郎

種々の疾病・先天異常・外傷によって生じた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。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。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、これまでも組み換えタンパク質や骨形成性遺伝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。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。問題点としては、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。別の問題点は、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。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。低分子化合物である Smoothened Agonist（SAG）は細胞内の Hh シグナルを活性化することで知られている。SAG による刺激により、未分化細胞から骨芽細胞への初期分化が促進される事が報告されている。一方で化合物ライブラリーのスクリーニングの結果発見されたヘリオキサンチン誘導体（TH）は骨芽細胞分化の中期から後期段階にかけて作用し、骨芽細胞の成熟を促進する事が報告されている。

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。最近開発された、 α 型リン酸三カルシウム顆粒（ α -TCP）を主剤とするテトラポッド形状の人工骨（テトラボーン®）は、独特の 4 本の突起がお互いに組み合せて緊密に骨欠損を充填し、細胞や血管が侵入に適した均一な空隙を作り出す、骨誘導能に優れた人工骨である。

本研究では、2 つの骨形成性低分子化合物、SAG と TH、骨芽細胞分化において異なる作用をもつ低分子化合物を組み合わせる事で、効率的に未分化細胞から骨芽細胞への分化誘導が行われるという仮説を *in vitro* 実験で検討し、さらにこの低分子化合物の組み

合わせをテトラボーンに搭載して作製した人工骨からの低分子化合物の徐放性検討、滅菌後の薬理活性を検討した後、骨再生効果と安全性を *in vivo* 実験で検討することによって、骨形成性低分子化合物徐放型人工骨の開発の基礎的研究を行った。

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. α -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. エチレンオキサイドガス滅菌は 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、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、すなわち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

性と骨への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による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。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。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。

また、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。