

論文の内容の要旨

論文題目 遺伝子組換えヒト型骨形成因子-2／生分解性担体複合体の骨誘導作用及び骨欠損修復作用に関する臨床的研究

氏 名 小久保 諭

骨折に代表される骨組織損傷，骨の形態異常，骨形成不全などの骨関連疾患の治療は，整形外科，口腔外科，歯科等の人を対象とした診療領域のみでなく，獣医診療においても重要な位置を占める領域の一つである。中でも，重度の外傷，骨腫瘍摘除，遷延治癒あるいは偽関節治療のための骨切除等に起因する骨欠損は自然治癒が期待できず，患者の **quality of life** を著しく低下させる要因となることから，骨欠損部の補填が必要となる。

現在，骨欠損の補填には自家骨，同種骨，及びセラミクスなどの移植材料が用いられている。いずれの移植材料も良好な臨床成績が示される反面，自家骨では採骨部位の疼痛，感染及び骨折等の合併症，同種骨では移植片への免疫反応，感染症伝搬の危険性，人工材料では生体内での残存，骨組織との力学強度特性の差異等の問題点もそれぞれ指摘されており，これら移植材料と同等以上の臨床効果を示し，かつ問題点を補完し得る新たな移植材料が求められている。

骨形成因子-2 (BMP-2) は 1988 年，Wozney らにより遺伝子配列が同定された蛋白であり，以降，遺伝子組換え型 BMP-2 (rhBMP-2) の臨床応用に関する検討が進められている。rhBMP-2 は *in vitro* において未分化間葉系細胞，筋芽細胞等を骨及び軟骨系細胞に強力に分化誘導することから，上記移植材料に代わる新たな骨欠損補填材料としての応用が期待される。しかし，生体内に移植された rhBMP-2 は速やかに分解及び拡散されることから，*in vivo* における薬効発現には本蛋白を保持し，かつ持続的に放出し得る適切な **delivery system**，すなわち担体が必

須である。これまでに脱灰骨基質，コラーゲンなどの生物由来材料，ハイドロキシアパタイト，リン酸三カルシウム等の人工材料，ポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体（PLGA）より作製した多孔性顆粒と自家血液との混合物等が担体候補として報告されているが，いずれも担体強度，分解吸収性，整形性などの問題で満足度が高いとは言えず，rhBMP-2 の薬効発現に最適な担体は未だ見出されていない。

著者らはこれら担体の欠点を補完する新規担体候補として，ゼラチンスポンジを PLGA でコートした PLGA-coated gelatin sponge（PGS）を創製した。本担体はラット異所性骨誘導モデルにおいて，誘導カルシウム量，担体内への骨侵入の程度，誘導された骨組織の形状，移植時の操作性等に優れた性能を有することが確認され，rhBMP-2 新規担体としての有用性が期待される。しかし，実際に臨床応用される適応部位を想定した検討は十分に行われていない。

そこで本研究では，長管骨骨欠損部補填を主たる適応症と想定し，これに即した動物モデル，すなわちウサギ尺骨及びイヌ脛骨分節性骨欠損モデルを用い，PGS を担体とした場合の rhBMP-2 用量反応性，安全性，及び rhBMP-2 含浸 PGS（rhBMP-2/PGS）により誘導される骨組織の長期安定性等について，X 線所見，組織学的所見及び力学強度を指標に検討した。

第一に，PGS の rhBMP-2 担体性能の探索的検討を目的とし，ウサギ尺骨分節性骨欠損モデルにおいて rhBMP-2/PGS の骨修復作用，rhBMP-2 用量反応性，及び安全性を，X 線所見，組織学的所見及び力学強度を指標に検討した。日本白色種ウサギの右尺骨骨幹部に 1.5cm 長の分節性骨欠損を作製し，rhBMP-2 を濃度 0.1, 0.4 もしくは 1 mg/cm³ にて含浸させた PGS（BMP 群），もしくは PGS のみ（PGS 群）を移植し，移植後 8 もしくは 16 週まで観察した。PGS 群では骨欠損修復が見られなかったのに対し，BMP 群は X 線学的癒合率を rhBMP-2 濃度依存的に増加させた。BMP 群の組織所見において，移植後 8 週では骨髓腔内の線維性骨，再生皮質骨の骨内膜側の表層不整，活性化骨芽細胞が観察され，本時点ではリモデリング過程にあることが示唆されたが，これらの所見は移植後 16 週には消失しており，再生された骨組織は層板構造を有する成熟骨組織にリモデリングされることが確認された。また両時点において，移植された PGS の免疫原性を示す組織所見は観察されなかった。一方，rhBMP-2 濃度依存的な再生骨組織の力学強度の回復が，移植後 16 週において認められたが，正常尺骨の強度までの完全な回復は確認できなかった。以上の成績より，rhBMP-2/PGS は rhBMP-2 濃度依存的に骨欠損修復作用を発現し，かつ，PGS 担体を使用した場合の rhBMP-2 至適濃度は 0.4 mg/cm³ 前後であると推察された。

第二に，rhBMP-2/PGS 移植後初期における骨形成過程及び安全性に関する詳細な検討を，ウサギ尺骨分節性骨欠損モデルにて実施した。PGS に含浸させる rhBMP-2 用量は 0 (PGS 群)，

0.4 もしくは 1 mg/cm^3 (BMP 群) とし、移植後 3, 7, 14, 21 もしくは 28 日に採材し組織検査に供した。移植後 3 日及び 7 日において、PGS 移植部位周囲の筋組織間隙には未分化間葉系細胞あるいは血管内皮細胞と推定される多数の紡錘系細胞が観察され、本所見は BMP 群でより顕著であった。BMP 群では移植後 14 日より血管再生を伴う骨再生像が認められ、移植後 28 日までは骨欠損部が再生骨組織により充填される像が観察された。また rhBMP-2 濃度間で有意差は見られなかったものの、骨欠損中央部における骨形成面積は rhBMP-2 濃度依存的に増加する傾向が認められた。更に、rhBMP-2/PGS 移植部及びその周辺部における vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現を免疫組織化学により検討した。移植後 3 日では、PGS 群を含む全ての群で VEGF の発現が移植部周囲の筋組織間隙に確認された。移植後 7 日以降、PGS 群及び BMP 群 (0.4 mg/cm^3) では VEGF の発現は確認されなかったが、BMP 群 (1 mg/cm^3) では移植後 14 日でも VEGF 陽性細胞が観察された。移植された PGS に対する異物反応は、その構成成分であるポリマー及びゼラチンを単独で移植した場合の反応と同程度であった。以上の成績は、rhBMP-2/PGS が濃度依存的に骨欠損修復を促進し、またその作用の一部は未分化間葉系細胞あるいは血管内皮細胞の動員、VEGF 誘導を介した血管新生に因ること、及び PGS の安全性を示唆するものと思われた。

前述の通り、ウサギ尺骨分節性骨欠損モデルにおいて、rhBMP-2/PGS は rhBMP-2 用量に依存した骨欠損修復作用を発現することが示されたが、rhBMP-2/PGS 移植後 16 週においては、再生された骨組織の力学強度は健全な骨組織のレベルにまで完全には回復していなかった。しかし、rhBMP-2/PGS がより強い荷重負荷の要求される部位へ適用される可能性のあること、かつ骨組織は長期に渡り支持組織として機能する必要があることから、再生された骨組織の長期機能的安定性の確認は非常に重要である。そこで第三に、これら課題の検証を目的として、イヌ脛骨分節性骨欠損モデルにおける rhBMP-2/PGS の骨欠損修復作用を X 線及び組織所見、ならびに力学強度を指標に検討した。また、観察期間を最大 104 週に設定し、再生骨組織の長期安定性についても検討を加えた。イヌ脛骨骨幹部に 2.5cm 長の分節性骨欠損を作製し、金属プレートで固定後、rhBMP-2 を濃度 0 (PGS 群) もしくは 0.4 mg/cm^3 にて含浸させた PGS (BMP 群) を移植し、移植後 32, 52, もしくは 104 週まで X 線学的に観察した。なお、プレートは移植後 16 週に抜去した。観察期間終了後、力学強度及び組織学的観察を実施した。PGS 群では移植後 16 週時で癒合不全の所見を呈したのに対し (本時点にて安楽死)、BMP 群では移植後 8 週にて全例で断端間骨癒合を認めた。プレートと接触する部位における X 線透過像が移植後 16 週にて観察されたが、この所見は 32 週までに消失した。また、移植後 32 週より 104 週にかけて、再生骨組織の明らかな減少を示唆する所見は認められなかった。rhBMP-2/PGS によ

る再生骨組織の力学強度は、全てのパラメータが移植後 32 週において正常脛骨と同程度に回復し、かつ移植後 104 週においても再生骨の力学強度は正常骨と同程度に維持されることが明らかとなった。また、強度試験後の試験片を組織学的に観察したところ、移植後 104 週における再生骨組織は緻密な層板構造を有することが観察された。以上の結果より、誘導された骨組織は長期にわたり機能的に安定であることが示された。

以上、本研究により rhBMP-2/PGS は自家骨移植等の既存の移植材料に代わる長管骨欠損部補填に有用な生体材料となり得ることが明らかとなった。この成績は臨床応用に向けた有効性、及び安全性の一部を示したものとして非常に重要と考えられる。また、本研究の成果はその他の骨再生／骨造成を必要とされる更なる適応への拡大に向けての基礎データとしても寄与するものと考えられる。