



Title	Nanoclay gels attenuate BMP2-associated inflammation and promote chondrogenesis to enhance BMP2-spinal fusion
Author(s)	古市, 拓也
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101828
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	古市 拓也
論文題名 Title	Nanoclay gels attenuate BMP2-associated inflammation and promote chondrogenesis to enhance BMP2-spinal fusion (ナノクレイゲルはBMP2に随伴する炎症反応を抑制し、軟骨形成を促進してBMP2による脊椎癒合を強化する)
論文内容の要旨	
〔目的(Objective)〕	
<p>BMP2 (Bone Morphogenetic Protein-2) は強力な骨誘導能を持つタンパク質で、欧米では臨床使用にて良好な成績が報告されている。しかし、炎症反応や異所性骨化、骨溶解などの重篤な合併症のため、日本では使用が承認されていない。現在、コラーゲンスポンジ (CS) にBMP2を含ませた製品が臨床で使用されるが、移植後早期にCSからBMP2が周囲に放出されることが合併症の主な要因であり、BMP2の有効性と安全性を高める新たな担体の開発が求められる。ナノクレイは、ケイ素、マグネシウム、リチウム、ナトリウムで構成された円盤状の粒子 (合成ヘクトライト) であり、水に溶解・攪拌するとゲルとなる。近年、ドラッグデリバリーシステムとして注目されているが、BMP2の担体として使用した場合の詳細な骨形成過程やBMP2に伴う炎症反応について検討した報告はない。本研究の目的は、医療用途向けに新たに開発された合成ヘクトライトであるRENOVITE® ナノクレイゲル (NC) をBMP2の担体として使用した際の有効性と安全性を、骨形成過程と合併症の観点から明らかにすることである。</p>	
〔方法 (Methods)〕	
<p>RENOVITE®粉末を蒸留水で30分間攪拌し、in vitro用に0.5%、in vivo用に3.5%の濃度のNCを作成した。最初に、NCが血清と接触した際の粘弾性の変化を評価した。レオメーター (HAAK™ MARS™, 25mm parallel plate, 2.5mm gap、歪振幅:0.1%, 角周波数:1rad/s) に1.5mlの3.5%NCをセットした後、血清でNCを浸し貯蔵弾性率を経時的に計測した。次に、NC自体の骨軟骨分化作用を検証した。0.5% NCを培養液に添加 (最終濃度0, 1, 10, 100 µg/ml) し、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) の骨芽細胞分化をアルカリフォスファターゼ染色(day7)とAlizarin red染色(day21)、軟骨細胞分化をAlcian blue染色(day21)で評価した。動物実験では、マウス筋膜下移植モデル (40µlの3.5%NCと直径5mm、高さ2mmの円柱状CSにBMP2を含ませたものを殿筋膜下に移植) を作成し、BMP2担体内保持作用、骨形成過程の評価、炎症反応抑制作用を検証した。BMP2担体内保持作用は、蛍光標識した1µgのBMP2の蛍光強度の経時的変化をIVISで評価した。骨形成過程の評価は1µgのBMP2を使用し、術後7, 10, 14, 21日目にSafranin-O染色で軟骨形成を評価、42日目にMicro-CTおよびH&E染色から骨形成量を評価した。炎症反応抑制作用の評価は、術後1週での担体周囲の炎症性細胞層のH&E染色から厚みと面積を定量化し、炎症細胞層のTRAP染色と免疫染色 (CD68, CD206, Neutrophil, TNF-α) を行い、陽性細胞数を定量化した。最後に、ラット腰椎固定モデルにおける骨形成作用を検証した。L4/5の横突起間にBMP2 (5µg, 10µg) を含ませたCS (5mm×10mm) と3.5%NC (50µl) を移植し、術後6週でCTおよび組織評価を行った。</p>	
〔成績(Results)〕	
<p>NCは血清と反応すると貯蔵弾性率が即座に増加し、生理的条件下でゲル化が亢進し硬さが増加した。また、NCはin vitroにおいて濃度依存性に骨芽細胞分化および軟骨細胞分化を促進し、NCはそれ自体で骨・軟骨分化作用を有していた。マウス筋膜下移植モデルでは、蛍光標識BMP2の蛍光強度の半減期はCSで2.3時間、NCで40.0時間であり、NCはCSよりも約20倍のBMP2保持能力を示した。また、CSでは移植後10日目に軟骨基質が担体辺縁部にのみ見られるのに対し、NCでは21日目に担体内部に多量の軟骨基質が形成された。42日目には、CSは担体辺縁部のみで新生骨が形成され、内部は脂肪髄となったが、NCは担体内部まで内軟骨性骨化を介した骨形成が促進された。炎症反応抑制作用の評価では、CSでは担体外部に炎症細胞層が形成され、厚さと面積はBMP2の容量依存性に増加したが、NCでは炎症細胞層はほとんど形成されず、高容量BMP2 (5µg, 10µg) でも炎症細胞層は増加しなかった。さらに、CSではBMP2の容量依存性により担体外部にCD68、TRAP、TNF-α陽性細胞が多く集積したが、NCではBMP2の容量を増加させてもほとんど集積せず、NCがBMP2の放出をコントロールし炎症反応を抑制することが示唆された。腰椎固定モデルにおいても、NCはCSよりも癒合椎内部への新生骨形成が促進し、良好な骨形成が得られた。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>NCは骨軟骨分化作用、強力なBMP2保持特性を有することで、内軟骨性骨化による骨形成を促進し、移植部位周囲に炎症反応をほとんど生じることなく、良質な骨再生を可能とした。NCはBMP2による骨形成の空間的制御、炎症反応の抑制、骨形成の最適化を可能とする次世代のBMP2担体となる可能性を示した。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 古市 拓也			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	署名
	副 査	大阪大学教授	署名
	副 査	大阪大学特任教授	署名

論文審査の結果の要旨

骨を強力に再生するタンパク質であるBMP2は、骨癒合を促進する効果を持つ一方、過剰な骨形成や炎症といった副作用が問題視されている。BMP2を安全に使用するには、副作用を抑えつつ、効率的な骨再生を可能にする新世代の骨再生材料の開発が必要である。本研究では、新たに開発されたナノクレイをBMP2と組み合わせることで、副作用を抑えつつ効率的に骨を再生する技術確立した。ナノクレイはBMP2を保持する能力が高く、軟骨形成を経て質の高い骨を形成する作用を示した。特に、高容量のBMP2を担持しても炎症反応がほとんど認められない点は、患者の負担軽減に大きく寄与する成果である。本研究により、実臨床でBMP2をより安全で効果的に使用できるようになる可能性が示された。高齢化に伴って骨再生治療の需要が増加する中で、既存の方法では骨癒合の獲得が困難で長期間の治療を要していた症例に対し、ナノクレイとBMP2の組み合わせは、安全に骨癒合を獲得できる次世代の骨再生治療として評価される。本研究の成果は学術的および社会的意義が大きく、学位の授与に値すると考えられる。