

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10453

研究課題名(和文)骨折修復と体内時計の包括的研究

研究課題名(英文)comprehensive study for circadian clock and fracture

研究代表者

藤原 浩芳 (Fujiwara, Hiroyashi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90381962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：体内時計は全ての細胞に存在し時刻情報を伝達し生理機能を適切に調節することに貢献している。我々は器官培養系を用いて正常な軟骨に体内時計が存在することを示した。この結果から骨折などの疾病にも体内時計が存在し病態に密接に関与すると考え、その修復過程で病態にどのように体内時計が関与するかについての検討を組織学的手法および器官培養を用いて明らかにした。組織学的検討では骨折部が正常な治癒過程を経過していること、器官培養系では治癒過程の骨折部に体内時計が存在することが明らかにされた。更に副甲状腺ホルモンが体内時計を構成する時計遺伝子を誘導することから骨折修復における副甲状腺ホルモンの役割についても検討した。

研究成果の概要(英文)：Circadian clock exists all animal cells, contributes to regulate many physiological functions. We have already unveiled the existence of circadian clock in locomotorium system. But it was not clear how circadian clock function. Thus, we established fracture model and observed what was happened at healing site. Our experimental system prove that circadian clock have also work at fracture site.

研究分野：骨折修復

キーワード：体内時計 骨折修復

1. 研究開始当初の背景

地球上で生活する生物には約 24 時間の周期に同調する様々な生体反応が観察される。この約 24 時間周期の内在性リズムと呼ばれており、*Per*, *Cry*, *Bmal1*, *Clock* などの一連の時計遺伝子群によって構成される体内時計によって実現されている。このような体内時計は身体の全ての細胞に存在し、さまざまな生理学的な反応を体内時計が作り出す時刻情報をもとに調整していることが知られている。体内時計の破綻が睡眠障害や情動障害、高血圧、糖尿病、がんなどのさまざまな疾患の原因となることが報告されている (Hansen AB, et al., *Occup Environ Med*.2016)。また疾患の中にはその症状の強弱が時間に依存することがあり、例えば関節リウマチでは朝方に関節の疼痛の症状が強くなる。このような時間依存的な症状を時間に合わせた治療でより効果的な治療を行う時間治療が様々な領域で積極的に試みられるようになってきている。

2. 研究の目的

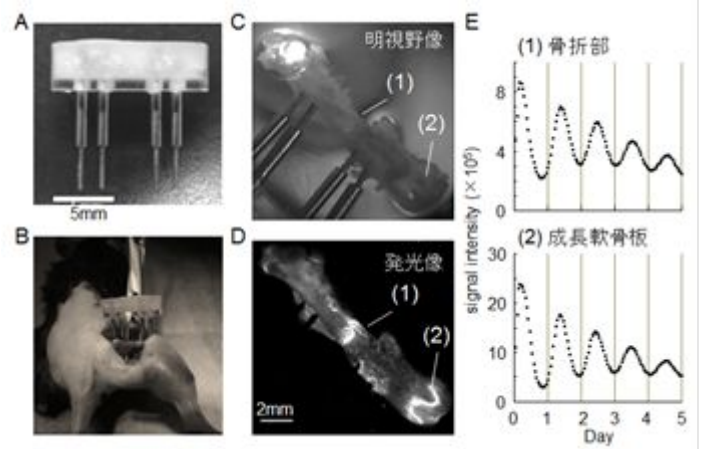
これらの背景から 疾患の病態生理を体内時計という観点から分子生物学的に明らかにし、病態生理に基づいた 時間治療を構築することを本研究の目的とした。具体的にはこれまで筋肉や骨などの運動器では体内時計の存在は知られていなかったため、本研究では運動器と体内時計の関係を明らかにすることを目標とした。まずは 正常の運動器で体内時計の存在を明らかにし、その生理的な機能の意義を分子生物学的な観点から解明すると同時に 運動器疾患における時間治療の可能性についても検討することを目的とした。

3. 研究の方法

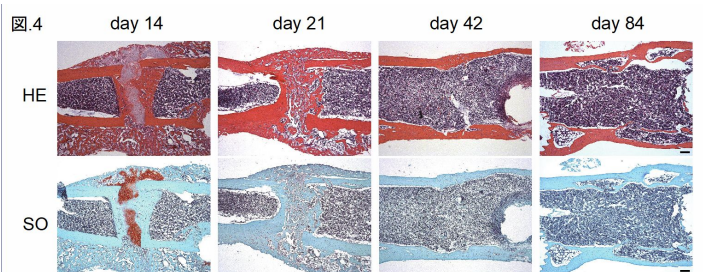
Per2 は概日リズムを実現する体内時計を構成する時計遺伝子の一つである。この *Per2* に発光レポーターを導入し、*PER2* タンパク質と蛍光素 (Luc) との融合タンパク質を合成し、概日リズムを発光強度として測定が可能な機能を持った遺伝子改変マウス (以下 *Per2::Luc* マウス) は体内時計の状態を評価するために広く用いられている。P 本研究ではこのマウスを用いて大腿骨の器官培養を行い、発光強度を測定し骨端軟骨に明瞭なリズムがあることを明らかにした。また長期間の培養を行ったところ骨端軟骨のリズムは堅持され、正常な大腿骨成長軟骨板には明瞭で強固なリズムがあることを明らかにした。次に運動器疾患の代表として骨折をとりあげ、骨折部には体内時計が存在するのか、存在するのであれば骨折の修復過程にどのように関与しているかを明らかにすべく実験計画を立てた。*Per2::Luc* マウスの大腿骨に骨切りを行ったマウス大腿骨骨折モデルを作成し、独自に設計した創外固定器を用いることで骨折部の治癒過程を経時的に観察が可能な実験系を構築した。術後の経時的な組織染色および単純 X 線像では骨癒合が

経時的に進行していたことから本実験系が骨折および骨折修復の治癒過程の評価系として適切であることが示された。また術後の大腿骨を採取し器官培養下で発光測定を行い、成長軟骨板とともに骨折部にも明瞭な概日リズムが存在することを明らかにした。これらの結果から、治癒過程の骨折部に体内時計が存在することが示された。また骨折部の体内時計の同調機構に関与していると考えられている副甲状腺ホルモン (PTH) の機能について解明するため、PTH 投与によるリズムの位相変化について検討した。PTH の投与によりリズムの位相は変化した。組織学的検討として PTH 受容体抗体を用いて免疫染色を行い、骨折部に PTH 受容体の発現を認めたことから骨折の治癒過程では PTH が時刻の制御因子の一つであることを明らかにした。また時刻情報の一つの鍵因子としての温度について分子生物学的な機序を検討するために軟骨前駆細胞株 ATDC5 や前骨芽細胞株 MC3T3 を用いた実験を行った。

これらの発光測定装置の使用や実験計画の策定および実施については京都府立医科大学統合生理学教室の全面的な指導・協力の下で実現している。



図：創外固定器と骨折部の器官培養の様子および発行リズム測定の結果



図：術後それぞれの日数でのヘマトキシリン・エオジン染色およびサフラニン O 染色による組織の評価

Figure 1

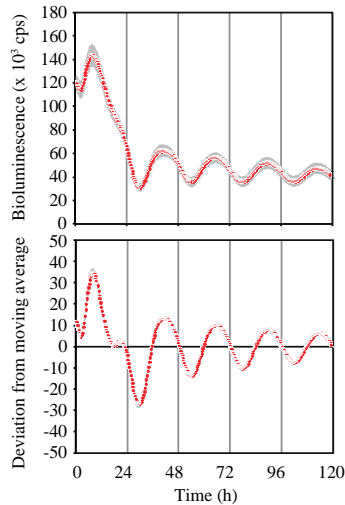


Figure1: Bioluminescence traces of MC3T3-E1 *Bmal1:Luc* cells. Data shown are means \pm SD (n = 3 per group).

図：MC3T3-E1 細胞株での発光リズム測定

Figure 2

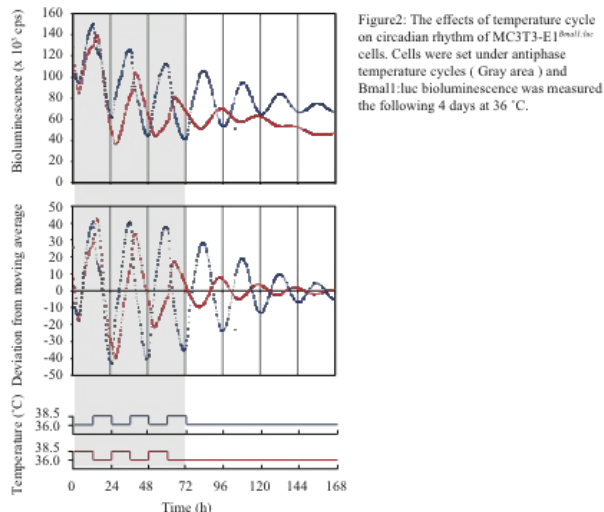


Figure2: The effects of temperature cycle on circadian rhythm of MC3T3-E1 *Bmal1:Luc* cells. Cells were set under antiphase temperature cycles (Gray area) and *Bmal1:Luc* bioluminescence was measured the following 4 days at 36 °C.

図：MC3T3-E1 細胞株での温度変化と位相変化の関係

Figure 3

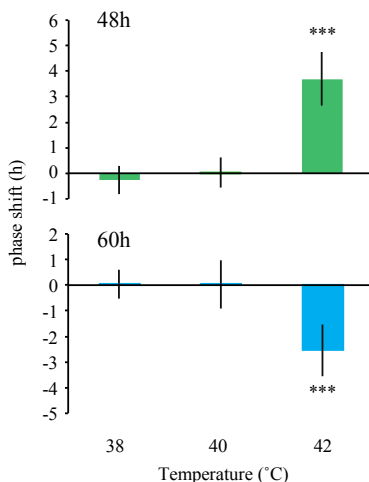


Figure3: The quantitative analysis of the heat shock-induced phase shift. MC3T3-E1 *Bmal1:Luc* cells were exposed to 2hours heat stimulations 48 h and 60 h after synchronization. (n = 3 per group; ***, p < 0.005 (vs. 36°C)).

図：同調開始後 48 時間後および 60 時間後の各温度における位相変化の変化量の比較

4. 研究成果

独自に開発した創外固定器を使用し骨折モデルとして最適な実験系の確立に成功した。

確立した実験系を用いて器官培養で骨折部の観察を行い骨折部に体内時計があることを明らかにした。

骨折部の免疫染色を用いて組織学的な検討を行った。

細胞株を用いて骨折部の体内時計の生理的な意義について分子生物学的な機構の検討を行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Tatsuya Kunimoto, Naoki Okubo, Yoichi Minami, Hiroyoshi Fujiwara, Toshihiro Hosokawa, Maki Asada, Ryo Oda, Toshikazu Kubo, Kazuhiro Yagita. A PTH-responsive circadian clock operates in ex vivo mouse femur fracture healing site. Scientific reports,6:22409(DOI:10.1038/srep22409), 2016 (査読有)

Toshihiro Hosokawa, Yoshiki Tsuchiya, Naoki Okubo, Tatsuya Kunimoto, Yoichi Minami, Hiroyoshi Fujiwara, Yasuhiro Umemura, Nobuya Koike, Toshikazu Kubo, Kazuhiro Yagita. Robust Circadian Rhythm and Parathyroid Hormone-Induced Resetting during Hypertrophic Differentiation in ATDC5 Chondroprogenitor Cells. Acta Histochemica Cytochemica, 48:165-171,2015(DOI:10.1267/ahc.15025) (査読有)

[学会発表](計 10 件)

Tatsuya Kunimoto, Naoki Okubo, Yoichi Minami, Hiroyoshi Fujiwara, Toshihiro Hosokawa, Ryo Oda, Toshikazu Kubo, Kazuhiro Yagita. Parathyroid hormone entrainable circadian clock functions in the mouse femur fracture healing site. 62th ORS Annual Meeting, 2015, Orland, the U.S.

Toshihiro Hosokawa, Yoshiki Tsuchiya, Naoki Okubo, Tatsuya Kunimoto, Yoichi Minami, Hiroyoshi Fujiwara, Ryo Oda, Toshikazu Kubo, Kazuhiro Yagita. Parathyroid hormone-induced resetting

of circadian clock in ATDC5. 62th ORS Annual Meeting, 2015, Orland, the U.S. Naoki Okubo, Yoichi Minami, Hiroyoshi Fujiwara, Tatsuya Kunimoto, Toshihiro Hosokawa, Ryo Oda, Toshihiro Kubo, Kazuhiro Yagita. Temperature is a time cue to cartilages 62th ORS Annual Meeting, 2015, Orland, the U.S. Tatsuya Kunimoto, Yoichi Minami, Naoki Okubo, Hiroyoshi Fujiwara, Toshihiro Hosokawa, Ryo Oda, Toshikazu Kubo, Kazuhiro Yagita. Visualization of the circadian clock in skeletal bones obtained from neonatal Per2::Luc mice using bioluminescence macro-imaging device. 63th ORS Annual Meeting, 2017, San Diego, the U.S. Toshihiro Hosokawa, Yoshiki Tsuchiya, Naoki Okubo, Tatsuya, Kunimoto, Yoichi Minami, Hiroyoshi Fujiwara, Ryo Oda, Toshikazu Kubo, Kazuhiro Yagita. Phase shift of the circadian clock by heat stimulation in MC3T3-E1. 63th ORS Annual Meeting, 2017, San Diego, the U.S.

大久保直輝, 藤原浩芳, 南陽一, 國本達哉, 細川俊浩, 小田良, 久保俊一, 八木田和弘, 軟骨部体内時計における温熱刺激の影響, 第30回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015, 富山

國本達哉, 大久保直輝, 南陽一, 藤原浩芳, 細川俊浩, 小田良, 久保俊一, 八木田和弘, PTH(1-34)による治癒過程の骨折部における体内時計の位相変位, 第30回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015, 富山

細川俊浩, 土谷佳樹, 大久保直輝, 國本達哉, 南陽一, 藤原浩芳, 小田良, 久保俊一, 八木田和弘, PTH(1-34)による軟骨前駆細胞株 ATDC5 の分化依存的な概日リズムの同調作用, 第30回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015, 富山

國本達哉, 大久保直輝, 南陽一, 藤原浩芳, 細川俊浩, 小田良, 久保俊一, 八木田和弘, マウス大腿骨器官培養系を用いた治癒過程の骨折部における体内時計の観察, 第31回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016, 福岡

細川俊浩, 土谷佳樹, 國本達哉, 大久保直輝, 南陽一, 藤原浩芳, 小田良, 久保俊一, 八木田和弘, 骨芽細胞における体内時計と温熱刺激の関係, 第31回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016, 福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 浩芳 ((FUJIWARA HIROYOSHI)
京都府立医科大学大学院医学研究科・
運動器機能再生外科学・准教授
研究者番号：90381962

(2) 研究分担者

小田 良 (ODA RYO)
京都府立医科大学大学院医学研究科・
運動器機能再生外科学・講師
研究者番号：80516469

(3) 連携研究者

八木田 和弘 (YAGITA KAZUHIRO)
京都府立医科大学大学院医学研究科・
統合生理学教室・教授
研究者番号：90324920