

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16488

研究課題名(和文) 外傷性骨化性筋炎の病態の解明と、予防法・治療法の探索

研究課題名(英文) Traumatic myositis ossificans - pathomechanism and treatment.

研究代表者

武 靖浩 (TAKE, YASUHIRO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10745772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：外傷性骨化性筋炎の病態を解明すべく、新たな動物モデルを開発しその解析を行った。臨床上検査することが困難である組織学的な時間空間的变化を検討した結果、骨化性筋炎は筋繊維が骨に変化するのではなく、筋損傷後の筋再生よりも筋内膜・周膜の線維化が優位になった結果生じると考えられた。骨化が生じた場合、病変の成熟度がスポーツ活動の復帰や外科的切除を考慮する時期の判断材料となるが、その基準に明確な指針はなかった。本研究では、micro-CTで境界明瞭で表面平滑な腫瘤となっただけからは病変に大きな変化はなく、そのような画像所見が今後成熟度の判断の一助になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathomechanism of traumatic myositis ossificans, I developed a new animal model for analyses. Temporal and spatial transition of the histology of this model, which is difficult to examine in the clinical setting, suggested that myositis ossificans developed as a result of extensive fibrosis of the endomyosium and the perimyosium over myofiber regeneration after muscle damage, and not through direct differentiation of myofibers into the bone. Once myositis ossificans is developed, its maturation matters to consider the timing of return to sport and surgical excision, although there's no clear criterion. Micro-CT findings in this study showed no remarkable change after the mass became well-circumscribed and smoothly surfaced. Thus, such findings on CT may help determine the maturity of myositis ossificans in the clinical setting.

研究分野：スポーツ医学

キーワード：スポーツ外傷 骨化性筋炎 筋損傷 筋再生 異所性骨化

1. 研究開始当初の背景

骨化性筋炎は骨格筋に生じる異所性骨化であり、大腿部の打撲後の9-17%に起こるとされ、強い炎症症状を伴いながら筋の一部に骨化を生じる。疼痛や可動域制限が長期に続くこともあり、早期のスポーツ復帰や外科的摘出は骨化巣の再燃・再発を来すため、長期のスポーツ活動の禁止は避けられない。このように有効な治療手段がないのは、病態や自然経過が未だ不明であることに起因していた。

2. 研究の目的

そこで本研究の目的は外傷性骨化性筋炎の動物モデルを新たに開発し、その解析を通じて、外傷性骨化性筋炎の病態を解明し、予防法・治療法を探索することである。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルの開発

10週齢のC57BL6/J雄マウスの大腿四頭筋に、Cardiotoxin (CTX)による筋薬理損傷と、少量の recombinant human Bone Morphogenic Protein-2 (BMP) による異所性骨化誘導を同時に起こすモデルを新たに開発した。CTX 1nmol と、BMP 1.5ng を含んだ 0.1mL の PBS を注入するものをExperimental群(E群)とし、対照群として、BMP 1.5ng のみ(Negative control;N群)、BMP 6.0ng のみ(Positive control;P群)を設定し、各群4脚について、注入後2週間後に安楽死の上、採取した大腿四頭筋の横断面組織像を検討した。

(2) 骨化巣の時間空間的变化

次に、本研究で新たに開発した動物モデル(上記E群)の時間空間的变化を、組織学的および画像的に検討した。薬液注入後、1, 1.5, 2, 4, 6週に、各時期4脚、横断面組織像を同様に検討した。さらに、薬液注入後、2, 4, 6週に6匹の同一個体を繰り返しmicro-CT撮影し、骨化巣の体積(total mass volume, tMV)と骨化巣中の全石灰化体積(total Bone volume, tBV)を定量評価するとともに、骨化巣の二次元横断像と三次元サーフェスレンダリング像の外観を定性評価した。うち2匹は6週以降、8, 12, 16週まで長期観察し、micro-CT評価と、16週で回収した筋標本の組織所見を同様に評価した。

(3) 骨化巣の治療介入の試み

最後に、一度生じた骨化巣の早期退縮を目的とした介入実験を行った。骨化巣の周囲筋組織の肥大化を促すため、Follistatin発現AAVベクターを大腿四頭筋に局所感染させ、3, 6, 8週に同様にmicro-CTを撮影し、tMVをnullベクター感染例と比較した。

本研究は大阪大学医学部附属動物実験施設

の倫理審査、および遺伝子組換え実験安全委員会の承認を受け行った。

4. 研究成果

全動物において、重篤な合併症を認めなかった。

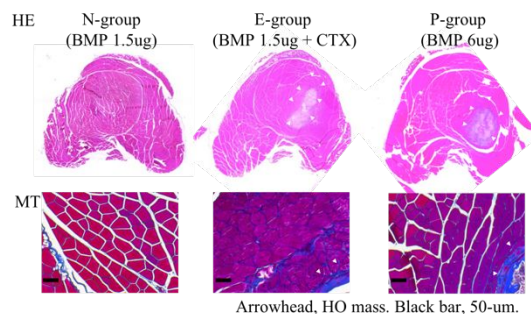
(1) 動物モデルの妥当性

BMP少量単独注入のN群では異所性骨化の形成は認めず、筋線維や筋内膜・周膜に明らかな異常を認めなかった。P群では筋内に異所性骨化を生じており、骨化巣に近接した筋線維は、その間に膠原線維の沈着を認めるものの、骨化巣から離れた部分は正常様の外観であった。

E群でもP群と同様に異所性骨化が認められたが、周囲筋線維は損傷後再生筋を示す中心核のものが広範に認められた。また、筋線維の間隙には膠原線維の沈着を認め、それらは骨化巣に連続していた。

これらよりE群は、本来異所性骨化を誘導できない少量BMPが、CTXにより惹起された筋損傷部位に骨化巣を形成する、外傷性骨化性筋炎をよく模倣したモデルと考えられ、さらに筋内膜や周膜部分の線維化が関与していることが示唆された。

Fig 1. Histology.



(2) 本モデルの時間空間的变化

組織学的には、1週時点では、損傷され再生過程にあると考えられる中心核の筋線維が広範に認められ、その間に広範囲に膠原線維が増生しており、その一部はSafranin-O染色で淡陽性であった。1.5週で、Safranin-O強陽性で、円形で空胞を持った細胞による軟骨様腫瘍の形成が認められた。2週では類骨組織と軟骨様組織が混在した腫瘍となり、4週で腫瘍の中心部分は髓腔様の脂肪組織に置換され、外殻の骨組織は平滑で成熟した層板骨様となった。筋線維間隙の膠原線維沈着はいずれの時期でも認められ、16週時点でも筋の横断面積は正常に比べ小さかった。Micro-CTでは、2週時点で腫瘍は境界不明瞭で中心部まで広範に石灰化した像を呈した。4週で、境界明瞭で表面平滑な石灰化外殻をもち、中心部の石灰化が減少した腫瘍となり、6週でさらに表面平滑化と中心非石灰化が進んでいた。6週以降で外観に大きな変化は認めなかった。定量すると、tMVは2, 4, 6週

で 6.5 ± 3.3 , 3.3 ± 1.6 , 2.5 ± 1.3 (mm^3)と、組織学的成熟に伴い腫瘍体積も著明に減少した。一方 tBV は 2.9 ± 1.4 , 1.0 ± 0.5 , 1.1 ± 0.5 (mm^3)と、2 週から 4 週では著明な減少であったが、4 週から 6 週では差がなかった。16 週まで長期観察した 2 匹では、tMV は非常に緩徐な減少傾向を示したが、tBV はほとんど変化がなく、自然治癒しないモデルであることが明らかとなった。

Fig 2. Histological time course (Safranin-O).

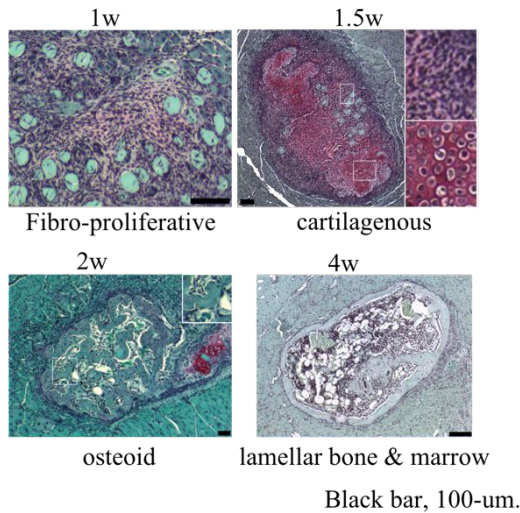
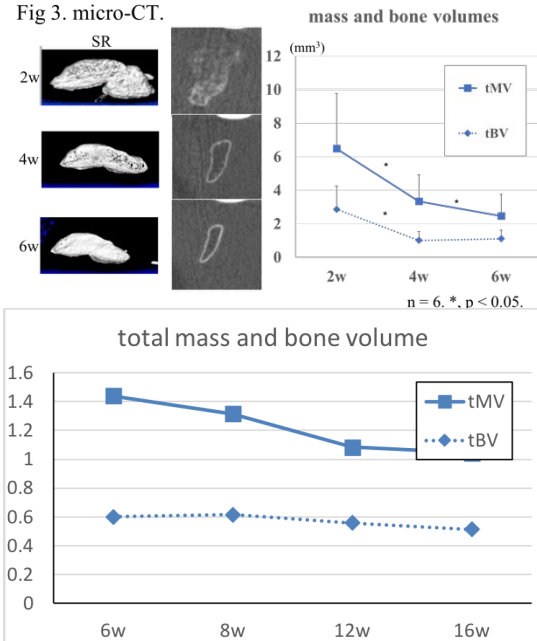


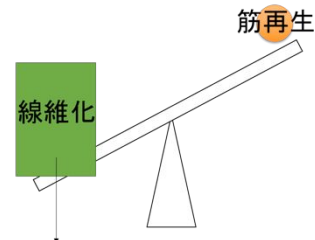
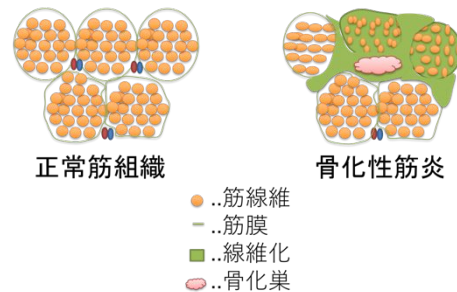
Fig 3. micro-CT.



(3) Follistatin 過剰発現による介入
Follistatin 過剰発現群では tMV は 4.5 ± 3.2 , 3.1 ± 2.3 , 2.8 ± 2.2 (mm^3), null ベクター群では 4.7 ± 4.0 , 3.9 ± 3.3 , 3.6 ± 3.1 (mm^3)と、Follistatin 群の方が小さい腫瘍体積の傾向を示したが、有意な差ではなかった。

(4) 考察 bench to clinical practice
临床上、骨化性筋炎の病理の時間空間的变化は、未知な部分も多い。横断的に様々な病期

の病理を検討した研究から、初期には結節性筋膜炎様の線維増生に始まり、軟骨様組織や類骨組織の出現を経て、成熟した骨組織になるとされている。本モデルはその変化をよく再現していると考えられ、さらにその初期の変化より、筋線維そのものが骨化するのではなく、筋線維の間隙を成す内膜や周膜が線維増生を起こし、そこから軟骨化生、内軟骨性骨化を経て異所性骨化につながると推察された。すなわち、筋損傷後に筋線維再生より筋内膜・周膜の線維化が優位となり、その中でも重症例が骨化性筋炎を呈すると考えられ、临床上の筋損傷後の管理において、圧迫、アイシングなどの古典的手法のほか、可及的に筋運動を促し線維化生を最小限とし筋の再生・肥大を刺激することが有用と思われる。実際、骨化性筋炎の予防や、生じた後のリハビリでは、他動的可動域訓練は忌避され、自動運動が推奨される。自動運動では求心性筋収縮による筋断面積増大が自然に起こるため、本モデルから推察された骨化性筋炎の病態の対処として非常に合目的であるとも言える。



凝集した細胞が内軟骨性骨化を起こす

ひとたび骨化性筋炎を起こせば、長期にわたって異所性骨化が続くことも本モデルでよく再現されていた。临床上、未熟な段階でのスポーツ活動や外科的切除は、再燃や再発につながるとされている一方、腫瘍の成熟度について明確な指針はなかった。本研究では micro-CT 画像で表面平滑で境界明瞭な腫瘍像となってからは、病変に大きな変化がなかったことから、このような CT 画像所見が成熟度判定の一助となる可能性が示唆された。この所見を元に、可動域制限や疼痛がなければ、スポーツ活動を許可しても病変の再燃や悪化の可能性は低いのかもしれない。ただし、本モデルの組織像からは、筋線維断面積は長期にわたって小さいことが示唆されている。すなわち、病変が残存している以上、筋出力

や筋機能の低下は避けられないのかもしれない。患者にこのような情報を与えた上でスポーツ復帰が望ましいものと思われる。

本研究では最後に化学的な筋肥大刺激による介入実験を試みたが、著明な差には至らなかった。本来は自動運動によって得られる筋肥大と病変の消退との関連を検討したいところであるが、動物実験では困難である。介入については臨床で、骨化性筋炎の前段階である筋内線維化まで含め検討していくことが望ましいのかもしれない。

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)

[学会発表](計3件)

(1) 武 靖浩、河野 史倫、馬込 卓弥、花井 達広、横井 裕之、前 達雄、吉川 秀樹、中田 研. 外傷性骨化性筋炎モデルの病理組織学的検討. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2016.10.13-14, 福岡.

(2) 武 靖浩、河野 史倫、花井 達広、横井 裕之、馬込 卓弥、吉川 秀樹、中田 研. 外傷性骨化性筋炎モデルにおける、骨化巢 microCT 像の時間空間的変遷. 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2017.10.26-27, 沖縄.

(3) Yasuhiro Take, Fuminori Kawano, Tatsuhiko Hanai, Hiroyuki Yokoi, Takuya Magome, Ken Nakata, Hideki Yoshikawa. A Simple Mouse Model of Traumatic Myositis Ossificans: Temporal and Spatial Transition, and Clinical Suggestion. Orthopaedic Research Society 2018 Annual Meeting. 10-13 Mar 2018, New Orleans, USA.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

武 靖浩 (TAKE YASUHIRO)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10745772