

令和元年5月27日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10901

研究課題名(和文) ウルトラファインバブルによる新規骨粗鬆症予防・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel osteoporosis treatment using ultra-fine bubble

研究代表者

蛭名 耕介 (Ebina, Kouske)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70612076

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)：元来骨組織は低酸素状態にあり、酸素濃度の上昇は骨代謝を改善することが報告されている。ステロイド性骨粗鬆症(GIO)は続発性骨粗鬆症の中で最も頻度が高く、より安価で利便性に優れた新規治療が待望されている。我々は骨組織への酸素運搬手段としてウルトラファインバブル(以下UFB; 直径200nm以下のウイルス大の気泡)という新規技術に着目した。本研究結果より酸素UFB水の腹腔内投与がステロイド性骨粗鬆症モデルマウスの骨量減少を予防すると共に、骨を減少させる破骨細胞の分化や機能を抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

UFBは医療分野で注目されている新規技術であるが、涉猟し得る限り骨代謝の改善効果を検討したものは本報告が初めてである。UFBは大量生成かつ長期間保存可能であり、より安価で利便性の高い新規治療につながる可能性が示された。また骨代謝以外にも低酸素が病態に関与する様々な疾患に有効となる可能性があり、今後更なる発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Bone tissue is relatively hypoxic, and oxygen administration improves bone metabolism. Glucocorticoid-induced osteoporosis (GIO) is one of the most frequent secondary osteoporosis, and thereby novel, low-cost, convenient treatment is desired. Ultra-fine bubble (UFB; <200 nm in diameter) has several unique properties, and tested in various medical fields such as drug delivery. We investigated that oxygen ultra-fine bubbles (OUB) saline peritoneal injection prevents bone loss of GIO in mice. Moreover, OUB inhibits osteoclast differentiation and function in a dose-dependent manner in vitro. The efficacy and adaptation of OUB to other hypoxia-related diseases is also expected to be investigated in the future study.

研究分野：骨粗鬆症、低酸素、破骨細胞

キーワード：ウルトラファインバブル ステロイド性骨粗鬆症 低酸素 破骨細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会の到来と共に、骨粗鬆症による骨折に伴う健康寿命の低下は大きな社会問題となっている。近年様々な骨粗鬆症治療薬が開発されているが、本邦では約 1280 万人の骨粗鬆症患者のうち約 8 割が未治療とされ、治療普及率の低さが大きな問題となっている。ステロイドは自己免疫疾患などに対して頻用される薬剤であるが、破骨細胞（骨を吸収し減少させる）を活性化させ骨芽細胞（骨を形成する）を抑制することでステロイド性骨粗鬆症（glucocorticoid induced osteoporosis ; GIO）を惹起する。GIO は続発性骨粗鬆症の中で最も頻度が高く、より安価で利便性に優れた新規治療が待望されている。元来骨組織は低酸素状態にあり、酸素濃度の上昇は骨代謝を改善することが報告されている。そこで我々は骨組織の低酸素状態を改善するための酸素運搬手段として Ultra-fine bubble (UFB; 直径 200nm 以下のウイルス大の気泡) という医療分野でも高い注目を集めている新規技術に着目した。UFB は従来の微小気泡を高速遠心することにより生成され、(1)高い気泡内圧力により液体中に 3 か月以上安定して高濃度で溶解できる(2)血管内皮間隙を通過して標的細胞に到達できる(3)安価で大量に生成することができる(4)血液に酸素 UFB (Oxygen UFB; OUB) を混入すると血中酸素濃度を上昇させることのできるなどの利点が挙げられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、GIO モデルマウスと骨代謝関連細胞（骨芽細胞・破骨細胞）への OUB の投与効果を検討し、OUB の骨代謝への詳細な作用機序を解明してヒトへの臨床応用の基盤を確立することである。

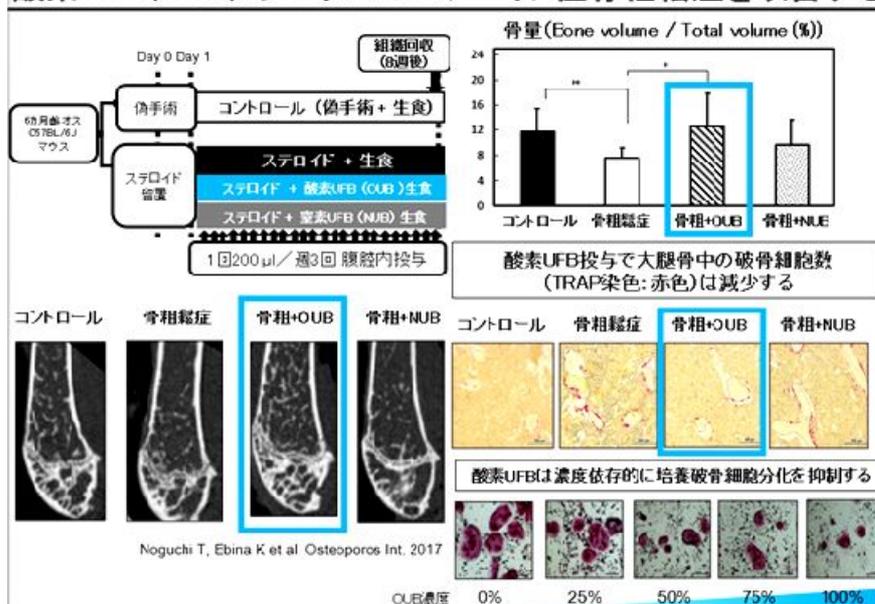
### 3. 研究の方法

ナノ粒子分析装置により OUB を希釈した生理食塩水（以下生食）と OUB を腹腔内投与したマウスの血清を解析した。次いでマウス頂部皮下にステロイド（5 mg のプレドニゾロンペレット）を留置し、GIO マウスを作製した。術翌日より週 3 回、各回 200ul の OUB 生食（治療群）・生食（対照群）・窒素 UFB（以下 NUB）生食（対照群）のいずれかを腹腔内投与した。8 週間後にマイクロ CT による大腿骨遠位部の骨微細構造や免疫染色等の組織学的評価、並びに骨代謝マーカーなどによる血清学的評価を行った。細胞培養実験では OUB を飽和後に段階希釈した培養液（0,25,50,75,100%）でマウス骨髄由来破骨細胞とマウス頭頂骨由来骨芽細胞を培養し、細胞増殖・細胞分化・細胞内シグナル伝達・遺伝子発現・細胞機能等の評価を行った。

### 4. 研究成果

ナノ粒子解析では OUB 生食中には通常の生食中には確認できない 200nm 以下の多数のナノ粒子が認められ、OUB 生食を投与したマウス血清中ではこのナノ粒子数が増加していることが確認された。次いで GIO マウスの海綿骨・皮質骨の骨微細構造や骨密度は、OUB 生食投与により生食・NUB 生食投与群と比較して有意に改善した。組織学的には GIO 誘導による大腿骨遠位部の骨組織における破骨細胞数の増加は、OUB 生食投与により有意に抑制された。血液検査では GIO 誘導による骨吸収マーカー（CTX1）の増加は OUB 生食投与により有意に抑制されたが、骨形成マーカー（オステオカルシン）には有意な影響は認められなかった。細胞培養実験では OUB は濃度依存性に破骨細胞の分化と機能を抑制することが明らかとなった一方、骨芽細胞に関しては有意な影響は認められなかったことより、OUB による GIO の改善は主に破骨細胞の抑制効果によるものと考えられた。

## 酸素UFB(OUB)はマウスのステロイド性骨粗鬆症を改善する



## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Ebina K, Hashimoto M, Yamamoto W, et al. Drug tolerability and reasons for discontinuation of seven biologics in 4466 treatment courses of rheumatoid arthritis -The ANSWER cohort study-. *Arthritis Research & Therapy* 2019. Apr 11;21(1):91. doi: 10.1186/s13075-019-1880-4. 査読有 ( 1 番目: corresponding author )

Ebina K, Hashimoto M, Yamamoto W, et al. Drug tolerability and reasons for discontinuation of seven biologics in elderly patients with rheumatoid arthritis -The ANSWER cohort study-. *PLoS One*. 2019 May 8;14(5):e0216624. doi: 10.1371/journal.pone.0216624. 査読有 ( 1 番目: corresponding author )

Matsuoka H, Ebina K, Tanaka H, et al. Administration of oxygen ultra-fine bubbles improves nerve dysfunction in a rat sciatic nerve crush injury model. *Int J Mol Sci*. 2018. May 7;19(5). doi: 10.3390/ijms19051395. 査読有 ( 2 番目: corresponding author )

Ebina K, Hirao M, Hashimoto J, et al. Impact of switching oral bisphosphonates to denosumab or daily teriparatide on the progression of radiographic joint destruction in patients with biologic-naïve rheumatoid arthritis. *Osteoporosis International*, 2018. Jul;29(7):1627-1636. doi: 10.1007/s00198-018-4492-y. 査読有( 1 番目: corresponding author )

Noguchi T, Ebina K, Hirao M, et al. Apolipoprotein E plays crucial roles in maintaining bone mass by promoting osteoblast differentiation via ERK1/2 pathway and by suppressing osteoclast differentiation via c-Fos, NFATc1, and NF- $\kappa$ B pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018. Sep 5;503(2):644-650. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.055. 査読有 ( 2 番目: corresponding author )

Kitaguchi K, Masafumi K, Ebina K, et al. Effects of Single or Combination Therapy of Teriparatide and Anti-RANKL Monoclonal Antibody on Bone Defect Regeneration in Mice. *Bone*. 2018. Jan;106:1-10. doi: 10.1016/j.bone.2017.09.021. 査読有 ( 3 番目 )

Chijimatsu R, Kobayashi M, Ebina K, et al. Impact of dexamethasone concentration on cartilage tissue formation from human synovial derived stem cells in vitro. *Cytotechnology* 2018. Apr;70(2):819-829. doi: 10.1007/s10616-018-0191-y. 査読有 ( 3 番目: corresponding author )

Ebina K, Hirao M, Hashimoto J, et al. Assessment of the effects of switching oral bisphosphonates to denosumab or daily teriparatide in patients with rheumatoid arthritis. *J Bone Miner Metab*. 2018. Jul;36(4):478-487. doi: 10.1007/s00774-017-0861-4. 査読有 ( 1 番目: corresponding author )

Noguchi T, Ebina K, Hirao M, et al. Oxygen ultra-fine bubbles water administration prevents bone loss of glucocorticoid-induced osteoporosis in mice by suppressing osteoclasts differentiation. *Osteoporosis International*. 2017. Mar;28(3):1063-1075. doi: 10.1007/s00198-016-3830-1. 査読有 ( 2 番目: corresponding author )

Ebina K, Hashimoto J, Masafumi K, et al. The effects of switching daily teriparatide to oral bisphosphonates or denosumab in patients with primary osteoporosis. *J Bone Miner Metab*. 2017. Jan;35(1):91-98. doi: 10.1007/s00774-015-0731-x. 査読有 ( 1 番目: corresponding author )

Ebina K, Masafumi K, Hirao M, et al. Comparison of the effects of denosumab between a native vitamin D combination and an active vitamin D combination in patients with postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Metab*. 2017. Sep; 35(5):571-580. doi: 10.1007/s00774-016-0792-5. 査読有 ( 1 番目: corresponding author )

Chijimatsu R, Ikeya M, Yasui Y, Ikeda Y, Ebina K, et al. Characterization of mesenchymal stem cell-like cells derived from human iPSCs via neural crest development, and their application for osteochondral repair. *Stem Cells International*. 2017. 2017:1960965. doi: 10.1155/2017/1960965. 査読有 ( 5 番目 )

〔学会発表〕(計 4 件)

松岡峰造 蛭名耕介ら 酸素ウルトラファインバブル (OUB) は後根神経節細胞の軸索伸展

やシュワン細胞の増殖を促進させる 第 62 回日本手外科学会学術集会 2019 年

野口貴明 蛭名耕介ら 酸素ウルトラファインバブル水の投与はステロイド性骨粗鬆症モデルマウスの骨量を改善する 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 2017 年

野口貴明 蛭名耕介ら 酸素ウルトラファインバブルは破骨細胞分化抑制を介してマウスのステロイド性骨粗鬆症重症化を予防する 第 18 回日本骨粗鬆症学会 2016 年

野口貴明 蛭名耕介ら 酸素ウルトラファインバブルは破骨細胞分化抑制を介してマウスのステロイド性骨粗鬆症重症化を予防する 第 2 回日本骨免疫学会 2016 年

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：神経損傷治療又は予防用医薬  
発明者：吉川秀樹，蛭名耕介，矢嶋尚彦，角田直行  
権利者：同上  
種類：A61 医学・獣医学；衛生学  
番号：特願 2016-115544，特開 2017-002043  
出願年：2016 年  
国内外の別： 国内

取得状況（計 1 件）

名称：骨粗鬆症予防又は治療用医薬  
発明者：吉川秀樹，蛭名耕介，矢嶋尚彦，角田直行  
権利者：同上  
種類：A61 医学・獣医学；衛生学  
番号：特許 6441022  
取得年：2018 年  
国内外の別： 国内

## 6．研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。