

令和元年5月30日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16677

研究課題名(和文)成熟骨芽細胞移植による骨折治癒促進機序の解明と新規治療法開発への応用

研究課題名(英文) Develop new therapeutic methodology for fragility fracture by transplanting human mature osteoblast

研究代表者

藤田 浩二 (Fujita, Koji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：80451970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト骨検体から採取したヒト成熟骨芽細胞を用いて、成熟骨芽細胞移植による骨折治癒促進機序の解明と新規治療法開発への応用の検討を行った。

ヒト成熟骨芽細胞をラット脛骨骨折モデルに移植することで、従来より早い骨癒合を得ることができた。さらに骨折部の解析により、骨形成促進機序の解析を行っている。同時に、ドナーの基礎疾患が成熟骨芽細胞の遺伝子発現と骨形成に影響を与えるかを検討した。その結果、糖尿病を基礎疾患として保つ場合、骨形成が低下するとともに、骨芽細胞内でガン関連遺伝子の発現が亢進することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化に伴い脆弱性骨折患者は増加の一途である。脆弱性骨折では骨癒合までの安静が必要であるが、高齢者ではこの間に筋力、移動能力が低下し寝たきりにつながる。このため、早期骨癒合を得られる治療法の開発が急務である。

本研究では、ヒト成熟骨芽細胞を骨折部に移植することで従来より早く骨癒合が得られる治療法につながる基礎研究を行った。ラットでの結果を踏まえて、今後ヒトでの展開を目指す。同時に、高齢者に多い糖尿病が骨形成にどのような影響を及ぼすかも検討し、骨形成遅延の機序の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To develop the novel treatment method of fracture by transplanting human mature osteoblast into fracture site, we performed two experiments.

First, we isolated human mature osteoblast from bone samples during surgery, then transplanted into the fracture model of rat tibia. We confirmed quicker bone union compared to the traditional treatment methods. Also we are examining the mechanism of bone union by analyzing the cell profile at the fracture site.

Second, to examine the effect of diabetes to bone union, we performed comparative study of gene expression in mature osteoblast between normal and diabetes patients. We confirmed the lower gene expression of bone formation in diabetes patients.

研究分野：骨代謝

キーワード：成熟骨芽細胞 脆弱性骨折 骨折予防

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

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国では、骨粗鬆症患者数は急増している。骨粗鬆症により骨代謝バランスの崩れた高齢者では、骨折部の癒合に時間がかかることが知られている。既存の骨折治療法では、骨癒合まで長期にわたる骨折部の安静を要し、この間に移動能力が低下し寝たきりを引き起こす。実際に、骨粗鬆症に伴う脆弱性骨折は寝たきりの原因の第2位となっており、できるだけ早く骨癒合を得られる新規骨折治療法の開発が求められている。これまでの骨折治療研究では、骨折部に骨髄細胞などの未分化細胞を移植し、骨癒合を促す方法がほとんどであったが、実際には骨への分化調整は困難で、骨癒合までに時間もかかり、実用には至っていない。また、iPS細胞を用いた研究では、腫瘍化の問題が解決されていない。私たちは、未分化細胞を分化させるのではなく、患者本人から採取したヒト成熟骨芽細胞自身を骨折部に移植し、従来より早く骨癒合が得られる骨折治療法の開発を目指している。

(1) ヒトおよびマウス成熟骨芽細胞抽出法の開発

私たちは、骨粗鬆症の病態解明と治療法開発 (*Nature* 2013、*Nature Med.* 2012) を目指している。成熟骨芽細胞は体内でまさに骨形成を行っているため、強い骨形成能を持つことは以前から知られていたが、骨表面に強く吸着し単離が困難であった。そこで、私たちは「ヒト骨検体から成熟骨芽細胞だけを抽出する方法」(*Osteoporosis Int.* 2014) を開発した。この方法では、約4時間で微小な骨検体から成熟骨芽細胞だけを、培養を経ずに抽出可能である(図)。さらに、マウス骨検体から成熟骨芽細胞を抽出する方法も同様に開発した。

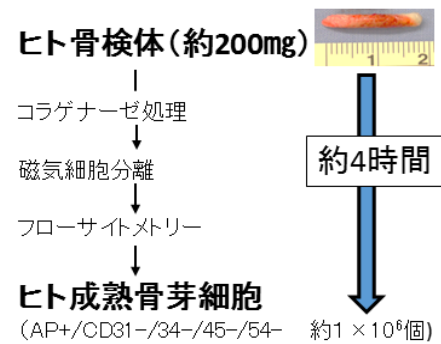


図 骨検体からヒト成熟骨芽細胞を採取 (AP: アルカリフォスファターゼ)

(2) ヒト成熟骨芽細胞を用いた骨折治療法の着想

私たちは、このヒト成熟骨芽細胞を骨折部に移植することで、より早く骨癒合の得られる新規骨折治療法が開発できると考えた。本人の骨から採取した細胞を、培養を経ずにその日のうちに本人の骨折部に移植する治療法の開発であり、免疫反応や腫瘍化、培養操作に伴う細胞の変性を避けることができ、時間的、経済的にも優れる方法であると考えている。

(3) ヒト成熟骨芽細胞の骨形成能の検討

「平成27年 研究スタート支援」により、ヒト成熟骨芽細胞を人工骨に吸着する手技を確立した。さらに、ヒト成熟骨芽細胞を人工骨とともにラット皮下に移植し、骨形成能を検証した。レントゲンおよびマイクロCTの検討により、ヒト成熟骨芽細胞移植群はコントロール群(PBS)より良好、かつ迅速な骨形成を認めた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト成熟骨芽細胞が骨折治療に十分な骨形成能を持ち、従来の骨折治療法より早期の骨癒合を得られることを明らかにすることを目的とした。同時に、骨検体のドナーの基礎疾患が骨形成能に影響するかを検討し、将来の治療法への応用の可能性を検討することを目指した。詳細は下記の2点である。

(1) ヒト成熟骨芽細胞をラット骨折モデルに移植し、骨折癒合促進効果を検討する

ヌードラット大腿骨骨折モデルに、人工骨に吸着させたヒト成熟骨芽細胞を移植し、経時的にレントゲン、マイクロCTで骨癒合速度を検討する。骨折部の組織評価、遺伝子発現解析を行う。

(2) ヒト成熟骨芽細胞の骨形成能をドナー間比較する

採取したヒト成熟骨芽細胞の骨形成能が、ドナーの基礎疾患によりどの程度異なるかを *in vitro* で検証する。

3. 研究の方法

「ヒト骨検体から成熟骨芽細胞だけを抽出する方法」(*Osteoporosis Int.* 2014) により、人工関節置換術時の骨検体からヒト成熟骨芽細胞を抽出する。本法では、培養を行わず骨検体からヒト成熟骨芽細胞を *in vivo* に限りなく近い状態で抽出する。

(1) 抽出したヒト成熟骨芽細胞を、ヌードラット脛骨骨折モデルの骨折部に人工骨(リフィット)とともに移植する。

(2) 抽出したヒト成熟骨芽細胞のRNAを抽出し遺伝子発現解析を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト成熟骨芽細胞をラット骨折モデルに移植し、骨折癒合促進効果を検討する
 又ドラット 6 匹に人工骨に吸着させたヒト成熟骨芽細胞を移植し、骨癒合を検証した。レントゲン評価により 6 匹すべてにおいて術後 6 週時点で骨癒合を得たことを確認した。経時的なマイクロ CT 撮影により、術後 2 週時点から人工骨の吸収と人工骨周囲での骨形成を認めた。術後 8 週時点で骨折部を摘出し、病理評価と強度評価を行った。現在解析、評価を行っている。

(2) ヒト成熟骨芽細胞の骨形成能をドナー間比較する
 基礎疾患として糖尿病をもつ患者から採取したヒト成熟骨芽細胞と、糖尿病のない患者から採取したヒト成熟骨芽細胞から、培養を経ずに RNA を抽出してリアルタイム PCR、マイクロアレイにより遺伝子発現の解析を行った。その結果、糖尿病患者の成熟骨芽細胞ではガン発症に関連する遺伝子群の発現が亢進していた。さらに遺伝子パスウェイ解析を行うと、ガン関連遺伝子経路と MAPK 関連遺伝子経路の有意な亢進を認めた。糖尿病患者が癌を罹患しやすいことが報告されているが、その機序の一端に骨芽細胞が関与している可能性を示唆する結果である。

Pathways and associated genes with significant changes in the DM group.

Pathway	DEGs between the DM and control groups	p-Value*
Pathways in cancer	Up <i>AKT1, BAD, BCR, DVLL1, FGF2, FGF18, PDGFB, PIK3R3, PTK2, RASSF1, STAT3, TP53</i>	< 0.001
	Down <i>MMP1</i>	
MAPK signaling	Up <i>AKT1, CACNB2, DUSP8, FGF2, FGF18, MAP3K5, MAPK11P1L, NTF3, PDGFB, RASGRF2, RASGRP2, RASSF1, RPS6KA5, RRAS, TP53</i>	0.004
	Down <i>PPP3R1, PPP5D1</i>	

DEG, differentially expressed gene; MAPK, mitogen-activated protein kinase.

* Statistical significance was determined by Student's *t*-test.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

T Kuroiwa, M Matsumoto, R Kato, A Nimura, T Yoshii, A Okawa, K Fujita
 Activation of cancer-related and mitogen-activated protein kinase signaling pathways in human mature osteoblasts isolated from patients with type 2 diabetes
 Bone reports 査読あり 10、2019、100199
<https://doi.org/10.1016/j.bonr.2019.100199>

K Fujita, K Kimori, A Nimura, A Okawa, Y Ikuta
 MRI analysis of carpal tunnel syndrome in hemodialysis patients versus non-hemodialysis patients: a multicenter case-control study
 Journal of Orthopaedic Surgery and Research 査読あり 14 (1)、2019、91
<https://doi.org/10.1186/s13018-019-1114-0>

T Kuroiwa, A Nimura, S Suzuki, T Sasaki, A Okawa, K Fujita
 Measurement of thumb pronation and palmar abduction angles with a small motion sensor: a comparison with Kapandji scores
 Journal of Hand Surgery (European Volume) 査読あり on line first 2019
<https://doi.org/10.1177/1753193419843837>

K Fujita, H Kaburagi, A Nimura, T Miyamoto, Y Wakabayashi, Y Seki, H Aoyama, H Shimura, R Kato, A Okawa
 Lower grip strength and dynamic body balance in women with distal radial fractures
 Osteoporosis International, 査読あり on line first 2019
<https://doi.org/10.1007/s00198-019-04860-8>.

[学会発表](計 7 件)

Kuroiwa T, Matsumoto M, Kato R, Nimura A, Yoshii T, Okawa A, Fujita K.
 Activation of cancer-related and MAPK signaling pathways in human mature osteoblasts isolated from patients with type 2 diabetes
 ORS 2018

Kuroiwa T, Fujita K, Nimura A, Miyamoto T, Okawa A.
 Novel evaluation of thumb pronation impairment due to median nerve palsy via gyroscope-based dynamic measurements
 ORS 2018

黒岩 智之, 藤田 浩二, 加藤 竜司, 松本 恵, 大川 淳
 糖尿病はヒト骨芽細胞内の MAPK シグナル経路および癌シグナル経路を活性化する

〔図書〕(計 1 件)

Koji Fujita Science Impact Ltd. Elucidation of the mechanism of the promotion of bone fracture healing by mature osteoblast transplantation and its application to development of novel therapeutic methods 2019,3

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://tmdu-orth.jp/clinical/hand/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者(該当なし)

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：黒岩智之

ローマ字氏名：Tomoyuki Kuroiwa

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。