

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09587

研究課題名(和文) Wnt10aを標的とした骨折治療介入法

研究課題名(英文) Fracture treatment intervention targeting Wnt10a

研究代表者

王 克ヨン (wang, keyong)

産業医科大学・教育研究支援施設・准教授

研究者番号：30369053

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)：広範な皮膚欠損を伴う難治性骨折の治療は整形外科領域にとって非常に困難な問題である。本研究では、研究者が独自に開発したWnt10a遺伝子欠損マウスを用いた骨折治癒過程における Wnt10a の役割を明らかにし、皮膚組織の創傷と骨折の治癒の両方の問題を同時に解決する方法を検討する。研究結果：Wnt10aは創傷の皮膚再生、骨膜の修復や仮骨の形成に対して重要な役割があることが示唆された。特に骨折治癒過程の初期段階では、皮膚欠損部位及び骨膜周囲の線維芽細胞の増殖が促進され、更にBMP-2(骨形成タンパク質)の添加によりWnt10aの発現が有意に増強された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究から、Wnt10a は線維芽細胞の増殖因子であり、主に骨膜の修復や骨膜性仮骨の形成において重要な役割を担っていることが証明された。Wnt10aの研究において、我々は全世界をリードして研究を進めており、Wnt10aを標的とした新しい創傷・骨折治療薬の開発も将来的に考えている。難治性骨折患者の機能予後改善・早期社会復帰を目指さず上で、Wnt10aを標的とした本研究結果は重大な一歩となり得る。

研究成果の概要(英文)：Purpose of the study: The treatment of intractable fractures with extensive skin defects is a very difficult problem in the orthopedic field. In this study, we try to clarify the role of Wnt10a in the fracture healing process using the Wnt10a gene-deficient mouse developed by the researcher, and also to examine a way to solve both of the skin tissue wound and the fracture healing problem at the same time.

Research Results: Wnt10a has been suggested to play an important role in wound skin regeneration, periosteal repair and callus formation. Especially in the early stage of the fracture healing process, the proliferation of fibroblasts at the skin defect site and around the periosteum were promoted, and the expression of Wnt10a was significantly enhanced by the addition of BMP-2 (bone morphogenetic protein).

研究分野：実験病理学

キーワード：骨折 骨再生 線維芽細胞 Wnt10a 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

整形外科領域の疾患の中で外傷の占める割合は大きい。皮膚移植や皮弁形成術を要するような広範な皮膚欠損症、遷延癒合や偽関節となり再手術を余儀無くされる難治性骨折は臨床上特に問題となる。申請者らは、まず創傷治癒促進に必要な決定的因子の探索を目指し、過剰な創傷治癒の病態で観察されるケロイド組織において分泌性タンパク質の一種である Wnt10a が過剰発現していることを発見した (Yasuniwa Y, Wang KY, et al. *PLoS One*. 2010)。その後、我々は Wnt10a 遺伝子に注目し、Wnt10a 遺伝子を全身性にノックアウト (KO) したマウスを作成することに成功した (平成 25-26 年度 産業医科大学高度研究)。Wnt10a KO マウスの創傷部位では、線維芽細胞の増殖及び Ⅰ型/Ⅲ型コラーゲンの産生が乏しく、Wnt10a が創傷治癒において非常に重要な役割を果たしていることを報告した (Wang KY, et al. *PLoS One*. 2018)。更に、Wnt10a KO マウスでは、野生型マウスと比較して、内軟骨骨化の抑制に伴う長幹骨の成長障害、骨を形成する骨芽細胞の機能低下、特に類骨形成後の骨石灰化能の低下を示す (Tsukamoto M, Wang KY, et al. *Bone*. 2018)。

骨折治癒のプロセスは、炎症期を経て、仮骨形成期、リモデリング期へと移行する。様々なサイトカインや細胞増殖因子が骨折治癒に関与しており、各段階における種々の因子により一連の生物学的反応が生じているが、その詳細なメカニズムは未だ明らかではない。一般に、整形外科医が骨接合術を行う際には、骨膜の温存を重視しており、骨膜は仮骨を形成する因子の一つと言われている。過剰な骨膜剥離や骨膜の血行を遮断するようなプレート (骨接合器具) の設置は、遷延癒合や偽関節、再手術の原因となることから、骨膜が骨折治癒において重要な組織であることが理解できる。Wnt10a は前述のように線維芽細胞の増殖因子であるため (Wang KY, et al. *PLoS One*. 2018) 骨膜の修復や骨膜性仮骨形成に深く関与している可能性があり、骨折治癒過程において重要な役割を担っているであろうと考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨折治癒過程において Wnt10a 遺伝子がどのような役割を担っているのか明らかにすることであり、我々が独自に開発した Wnt10a KO マウスを用いて調査を行う。

難治性骨折の治癒の際には創傷治癒の問題も伴ってくる。広範な皮膚欠損を伴う開放骨折に関しては、軟部組織の治癒状況が機能予後を左右する。本研究の学術的独自性と創造性は、創傷と骨折における双方の問題を同時に一つの分子で解決しようと試みているところにある。Wnt10a の研究に関しては、我々は全世界をリードして研究を進めており、Wnt10a を標的とした新しい創傷・骨折治療薬の開発も将来的には考えている。難治性骨折患者の機能予後改善・早期社会復帰を目指さず上で、Wnt10a を標的とした本研究成果は重大な一歩となり得る。

3. 研究の方法

検証1) 骨折治癒過程における Wnt10a の役割 (形態学・組織学的な評価)

詳細を図1に示す。骨折モデルを用いて骨折治癒過程における Wnt10a KO マウスの表現型を形態学的・組織学的に評価する。通常、骨折時に認められる線維芽細胞の増殖が、Wnt10a KO マウスでは抑制されていることが予想されるため、骨膜修復遅延や仮骨形成不全を示す可能性がある (図1左)。

検証1: 骨折治癒過程における Wnt10a の役割 (形態学・組織学的な評価)

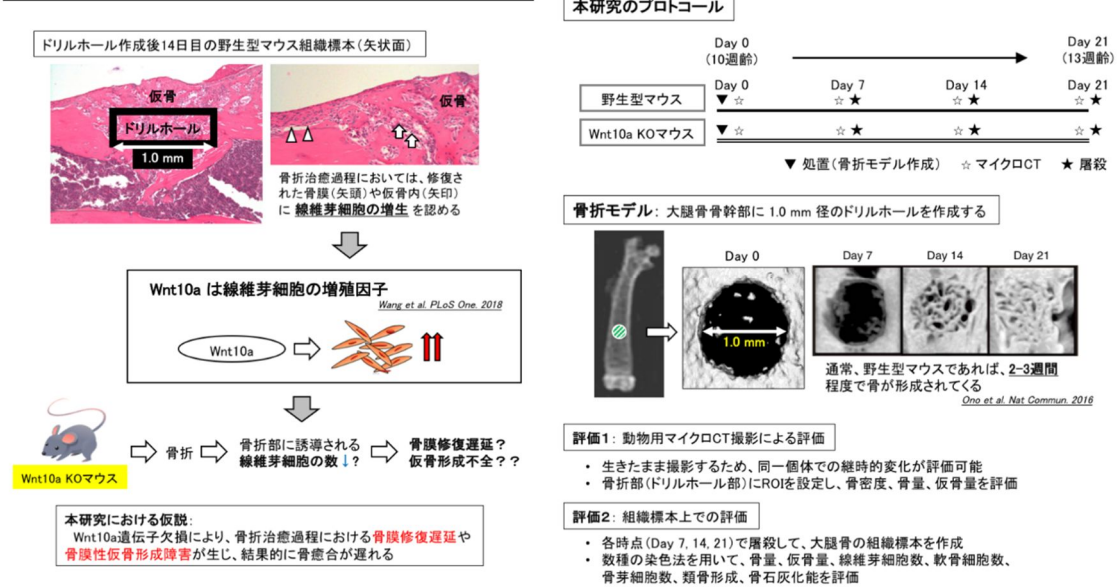


図1:(左)本研究の仮説、および(右)検証1の研究プロトコール

● 実験動物の準備

C57BL/6J (野生型) マウス 10 週齢 雄

Wnt10a KO マウス 10 週齢 雄

ドリルホールによる骨折モデルの作製

三種混合麻酔を腹腔内に投与し全身麻酔を行う。大腿骨遠位前方の皮膚を切開して大腿骨を露出し、骨幹部にドリルで径 1.0 mm の穴をあける。生理食塩水で洗浄後に皮膚を縫合して飼育ケージに戻す。

動物用 μ CT による評価

同様に全身麻酔下に撮影する。術後 1、2、3 週目に骨折部位を動物用 μ CT で撮影して骨修復過程の経時的变化を 3 次元的に定量化して形態学的に観察する。終了後に麻酔の拮抗薬を腹腔内へ投与する。

● ドリルホールを作成した大腿骨の組織標本作製

術後 1、2、3 週目に屠殺したマウス大腿骨の組織標本を作成する。数種の染色手法を用いて組織学的に骨折部の評価を行う。

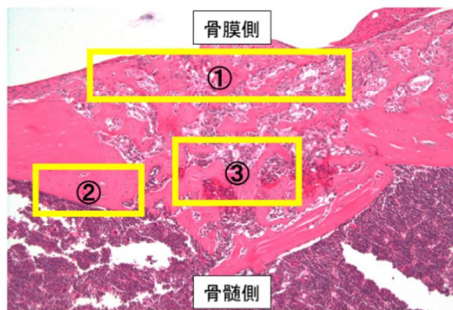
検証2) 骨折治癒過程における Wnt10a の役割 (修復部位特異的な発現遺伝子の解析)

詳細を図2に示す。Wnt10a KO マウスでは、骨膜修復遅延や仮骨形成不全を認める可能性がある。Wnt10a は、骨膜の修復や仮骨の形成に対して重要な役割があるのかもしれないが、実際に骨膜や仮骨に限定した発現遺伝子の解析は非常に困難である。そこで我々は、Laser microdissection 法による骨折修復部位特異的な発現遺伝子の解析を検討している。

検証2:骨折治癒過程における Wnt10a の役割(修復部位特異的な発現遺伝子の解析)

Laser microdissection 法:

顕微鏡にレーザー照射装置が接続された機器を使って、顕微鏡下で組織切片を観察しながら、切片上の標的とする部位をレーザーによって切り出し、採取・回収することができる。回収した組織から遺伝子を抽出することで、骨折修復部位特異的な発現遺伝子の解析が可能となる。



骨折治癒のプロセスは、炎症期を経て、仮骨形成期、リモデリング期へと移行する。様々なサイトカインや細胞増殖因子が骨折治癒に関与しており、各段階における種々の因子により一連の生物学的反応が生じている。
修復部位すべてが一様の修復反応が生じているとは考えにくく、少なくとも骨膜側と骨髄側は異なっていると思われる。

解析部位

- ① 骨膜性仮骨(骨膜側)
- ② 皮質骨の近くの線維骨(骨髄側)
- ③ 皮質骨から離れた線維骨(骨膜/骨髄側)

骨折修復過程における Wnt10a の役割がより詳細に明らかになることが期待される

図 2 : 検証 2 の方法論

検証 3) Wnt10a タンパクの補充による骨折治癒過程の変化

Wnt10a が骨折治癒過程において重要な役割を担っているとしたら、その補充により、骨折治癒は改善・促進することが予想される。検証 1 と 2 の結果を踏まえて今後検討することを計画している。

4 . 研究成果

研究期間の最初の二年間(2019~2020年度)我々は目的である検証1)骨折治癒過程における Wnt10a の役割(形態学・組織学的な評価)と検証2)骨折治癒過程における Wnt10a の役割(修復部位の特異的な発現遺伝子の解析)を行った。WT群に比し KO群では、海綿骨領域における静的パラメーターである BV/TV・Tb.N・Conn.D が低値、Tb.Sp が高値を示し、海綿骨量減少の所見であった。一方、動的パラメーターである MAR や BFR/BS は有意に低値であり、骨形成能低下の所見であった。骨髄内脂肪量も明らかに減少しており、KO群の骨髄細胞における、Col1a1、Osteocalcin、PPAR の mRNA 発現が低値であった。Wnt10a 遺伝子欠損により、生体内では骨形成能の低下に伴い、皮質骨の修復が遅延し、骨膜修復遅延や仮骨形成不全も認められた。Wnt10a は骨膜の修復や仮骨の形成、皮質骨の修復に対して重要な役割があることが示唆された。研究の最終年度(2021年)は、計画していた検証3)Wnt10a の発現を促進する物質を含む人工骨の補充による骨折治癒過程の変化についての検証を行った。Wnt10a そのものの試薬は販売されていないため、今回の研究では我々は Human BMP-2 recombinant protein、骨形成タンパク質 2 (BMP-2) を使用した。BMP-2 が骨折治癒過程において WNT10A の発現と骨再生への影響を検証するため、野生型マウスの大腿骨の骨幹部にドリルで径 1.0 mm の穴をあけ、2~10 μg の BMP-2 を含まれている人工骨(TCA 多孔体人工骨)を挿入し、術後 1、2、3、4 週に micro-CT 検査で仮骨形成や皮質骨修復の状況について評価を行った結果、BMP-2 添加群が無添加群より有意に骨量が増え、仮骨形成や皮質骨修復に対する促進作用が確認できた。特に骨折治癒過程の早期、骨膜周囲の線維芽細胞の増殖が促進され、BMP-2 添加による Wnt10a の発現も有意に増強された。我々は以前の研究で、Wnt10a が線維芽細胞の増殖の促進物質であり、創傷治癒に対し有効に働くことを証明しているが、本研究ではさらに、仮骨形成や皮質骨修復に対して、BMP-2 が Wnt10a を介して促進効果を示すことが示唆された。将来的に難治性骨折の治癒法の開発には Wnt10a を標的とした新しい創傷・骨折治療薬の効果も十分に考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Manabu Tsukamoto, Ke-Yong Wang
2. 発表標題 Findings to unravel the underlying mechanisms of in vivo interactions involving Wnt10a in bone, fat and muscle
3. 学会等名 ASBMR 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王 克ヨン、塚本 学、田崎貴嗣
2. 発表標題 骨・脂肪及び筋組織発生におけるWnt10aの役割の初期研究
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------