

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 2月27日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20300158

研究課題名（和文） 交感神経系を介した新しい骨損傷治療法の開発に向けての実験的研究

研究課題名（英文） Experimental research on the development of a new therapy for bone injury via sympathetic nerve system

研究代表者 松本 健志 (MATSUMOTO TAKESHI)

大阪大学・基礎工学研究科・准教授

研究者番号：30249560

研究成果の概要（和文）：

骨折後の早期離床は安静・廃用による骨萎縮を軽減し、高齢者の寝たきりや骨粗鬆症の予防、若年者の正常な骨発達を助け、将来の骨粗鬆症罹患リスクを低減する。本研究では、 β 交感神経系を介した骨折の可能性について、特に骨修復早期に着目し、動物実験による検討を行った。脛骨皮質骨に欠損を作製したラットを尾部懸垂し、無処置（C）、propranololで β 交感神経を遮断（PRO）、desferrioxamineで血管新生を促進（DFO）した3群に対し、欠損作製後5日あるいは10日においてジルコニア・アガロース血管造影剤を注入した。各群の試料はジルコニア k吸収端の直上(18.1keV)及び直下(17.9keV)で放射光 CT スキャンし、再生骨及び新生血管をイメージングした。術後5日目には3群とも血管新生が見られたが、その体積率はC群に比較してDFO群で有意に高く、PRO群では増加傾向が見られたのみであった。骨の再生については特にPRO及びDFOの処置による効果は確認できなかった。術後10日目には血管新生の体積率は3群で差はなくなったが、再生骨の体積率はDFO群で有意に高値を示した。PRO群では骨再生の増加傾向は見られたが、有意な効果は認められなかった。 β 交感神経遮断の骨修復への効果については、効果の濃度依存性や選択的遮断など、さらに詳細な検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：

Early postoperative ambulation after fracture treatment is effective in mitigating disuse-mediated bone atrophy, thereby preventing elderly persons from a bedridden state or osteoporosis and assisting healthy bone development of juveniles to reduce the future risk of osteoporosis. In this study, we examined a potential of fracture treatment through β -adrenergic system, especially in the early stage of healing. In anesthetized rats, a full thickness unicortical defect was created in a tibial diaphysis, and hindlimb unloading was achieved through tail suspension. The animals were grouped into three categories: rats treated with none (C), with propranolol for β -adrenergic blockade (PRO), and with desferrioxamine for the enhancement of angiogenesis. Five or ten days later the defect surgery, the animals were injected with zirconia-agarose contrast medium from the abdominal aorta. Then the defect region was cut out and scanned with synchrotron light with 17.1 and 18.1 keV for subtraction CT, immediately below and above the zirconia k-edge, respectively. Reconstructed images were segmented into bone and blood vessels. Five days after surgery, volume fraction of newly formed vessels was significantly higher in DFO but only tended to be higher in PRO than that in C. Both treatments had no effect on bone regeneration at this stage. Ten days after surgery, angiogenesis advanced to the similar degree in three groups; however, volume fraction of regenerated bone was significantly higher in DFO but only tended to be higher in PRO than that in C. Further studies on the effective concentration or selectivity of β -adrenergic blockers are needed for their beneficial utilization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	11,300,000	3,390,000	14,690,000

研究分野：医用生体工学・生体材料学

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：骨再生・血管新生・交感神経・放射光サブトラクション CT

1. 研究開始当初の背景

我が国の骨粗鬆症患者のうち、骨折をきっかけとして罹患する高齢者は少なくない。高齢骨折の場合、治療後の早期離床は容易ではなく、要介護や寝たきりを招く原因にもなる。一方、将来の骨粗鬆症発症の危険因子として、発育期の子どもの易骨折性が憂慮されている。骨量の最大獲得期である 10 代後半の骨折は、健全な骨発育の障害を招き、長期的には骨の成熟度を減じて、骨粗鬆症の発症リスクを高める。高齢者及び子どもの骨折は増加傾向にあり、予想される骨粗鬆症罹患率やその予備軍の拡大に対し、医学的かつ社会経済学的観点から有効な対応策が強く求められている。

早期離床によってリハビリテーションの開始を早めることは、骨粗鬆症や寝たきり・要介護の予防、あるいは骨の発育において極めて重要である。近年、 β 交感神経の骨量調節への関与が報告され (Elefteriou ら, Nature 2005; Karsenty, Cell Metb 2006)、骨折治療における β 交感神経遮断の有効性も注目されるようになった (Graham ら, Expert Opin Investig Drugs 2008)。しかし、骨折の早期修復期における β 交感神経遮断の役割、特に血管新生への影響については、詳しく検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、骨折治療後の早期離床に対する β 交感神経遮断の有効性を、骨再生及び血管新生のイメージングに基づいて実験的に検証する。血管領域と骨領域を分離してイメージングする手法として、造影剤投与前後のイメージの差分から血管像を求めるインビボ CT アンギオグラフィー、及び造影剤の k 吸収端を利用して血管像を求める放射光サブトラクション CT を確立した。

3. 研究の方法

インビボ CT アンギオグラフィー インビボ観察に基づく評価を可能とするため、傾斜型

インビボ CT システムを構築した。本システムは、マイクロフォーカス X 線透視装置(島津製作所 SMX-1000)をベースとし、試料を固定する回転テーブルと駆動モータ、及びそのドライバと X 線検出器を制御するコントローラからなる。また、回転テーブルにはマウスへの X 線被曝を抑えるための鉛シールドを装着した。

全身麻酔したマウスを対象とし、これを仰向けに回転テーブルに固定した。測定部となる膝部は、後肢を進展させた状態で、テーブルの回転軸に位置する支柱の先端ホルダーに固定した。尾静脈より小動物用ヨード血管造影剤を投与する前後で CT 撮像を行い、両イメージの比較から血管像が得られる。

放射光サブトラクション CT ジルコニア水性ナノ・コロイド(日産化学工業)とアガロース溶液(1.2%w/v)を体積比 1:2 で混合し、ジルコニア血管造影剤を開発した。ジルコニアの k 吸収端は 18.0 keV 付近にあり、その X 線透過像はこのエネルギー前後で不連続に変化する。この k 吸収端の直上・直下で放射光 CT 撮像を行い、イメージ差分することによって血管領域が抽出される。また、単色性を利用することで骨ミネラルも定量可能である。CT 撮像は大型放射光施設 SPring-8 のビームライン 20B2 で行った。

試料にはラット脛骨を用いた。全身麻酔下で腹部動静脈にカニューレ挿入し、ヘパリン生理食塩水で下肢の血液を洗い出した後、ジルコニア造影剤を灌流した。心停止後、直ちに全身を冷水に浸して造影剤をゲル化した。実験後、ラットを冷蔵庫に一昼夜保存し、下腿部から欠損部骨試料を摘出し、パラホルムアルデヒドで固定した。

4. 研究成果

2008 年度にはインビボ CT の手法を確立した。図 1 に造影剤投与前後のマウス膝部の断面再構成像を示す。ボクセルサイズは 10 μm 、被曝量は 650 mGy/scan である。造影剤投与前

に比較して、投与後には血管部の輝度値が骨に対して相対的に上昇し、血管部と骨部の明確な区別が可能であった。しかし、本手法の被曝量は通常のインビボ CT レベルではあったが、細胞活性の高い骨再生、血管新生には被曝の影響が無視できないこと、また、造影剤投与による浮腫みが無視できないこと等、克服すべき課題が残った。現時点では、被曝量の低減、造影剤の減量で対応せざるを得ないが、画像解像度が定量解析には不十分となるため、他の解決法を模索中である。

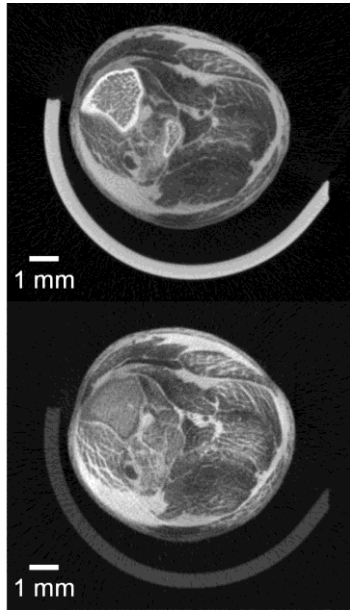


図1 マウス膝部のインビボ CT 断面像。上：造影剤投与前；下：投与後。

2009 年度にはジルコニア造影剤を開発し、再生骨、血管新生の計測手法の確立に着手した。ラットの脛骨骨幹部にマイクロドリルで欠損を作製し、5 日後あるいは 10 日後に造影剤を注入してゲル化させ、欠損部試料を摘出した。17.9 及び 18.1 keV で放射光 CT 撮像を行い、イメージサブトラクションにより、血管及び骨イメージを得た。代表例を図 2 に示す。ボクセルサイズは 2.74 μm である。骨はミネラル密度 0.5 g/cm^3 以上の領域として抽出した。

欠損部に占める再生骨の体積分率は術後 5 日で 3.1%，10 日で 28.1%，血管体積率は各々 4.9%，11.4% であった。また、再生骨の骨量増加に加えて、ミネラル密度も術後 5 日目の 0.81 g/cm^3 から 10 日目には 1.03 g/cm^3 に増加した。図 3 に個々の試料についての再生骨体積率と血管体積率のプロットを示す。術後 10 日目では、すべての個体について再生骨体積率は血管体積率を上回り、さらに、血管体積率と負の相関を示す傾向がみられた。この時期には既に血管新生の抑制が始まり、骨形成のための過剰な骨循環が正常へ向かうフェーズになっていることが示唆される。

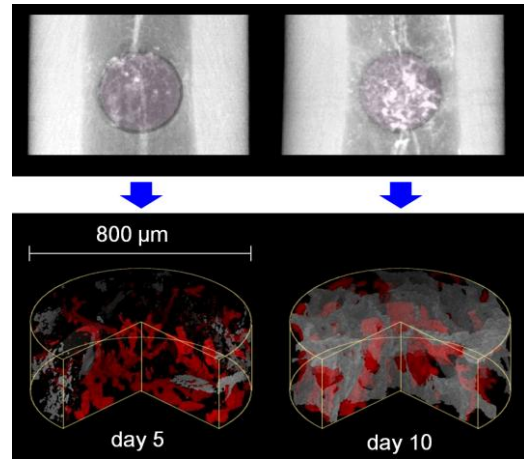


図2 ラット脛骨欠損部の術後 5 日目(day 5) 及び 10 日目(day 10)の修復過程イメージ。上：透過像；下：サブトラクションによる骨-血管分離後。赤：新生血管；グレイ：再生骨。

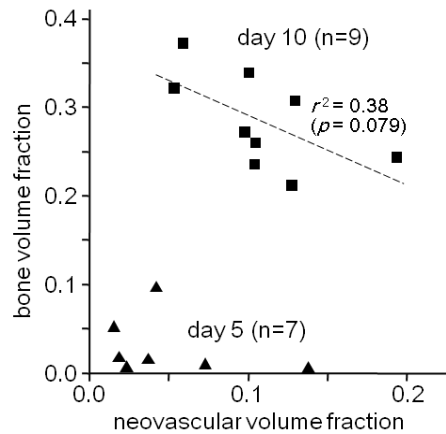


図3 再生骨体積率 vs. 血管体積率プロット。

次いで 2010 年度には、放射光サブトラクション CT を利用して β 交感神経遮断の骨修復への効果、併せて血管新生促進の骨修復への効果を評価した。 β 交感神経遮断には propranolol (PRO)、血管新生促進には骨芽細胞に低酸素症誘導性因子を安定誘導する desferrioxamine (DFO) を利用し、尾部懸垂ラットの脛骨ドリル欠損修復を対象に評価を行った。図 4 に結果を示す。尾部懸垂は除荷及び交感神経亢進を来たすため、骨再生は遅延する。本実験でも通常飼育の場合に比べて、骨体積率は術後 5 日目では 87%，10 日目では 41% の減少、血管体積率も各々 39%，38% の減少が観察された。DFO は血管新生を促進し、5 日目には薬剤処置なし (Cont) の場合に比べて血管体積率は約 2 倍に増加した。但し、骨形成には有意な作用は見られなかった。10 日目には DFO の血管新生への効果は見られなくなったが、骨形成は Cont に比べて有意に増加した。一方、PRO は 5 日目には血管新生を促進する傾向を示したが、骨再生へ

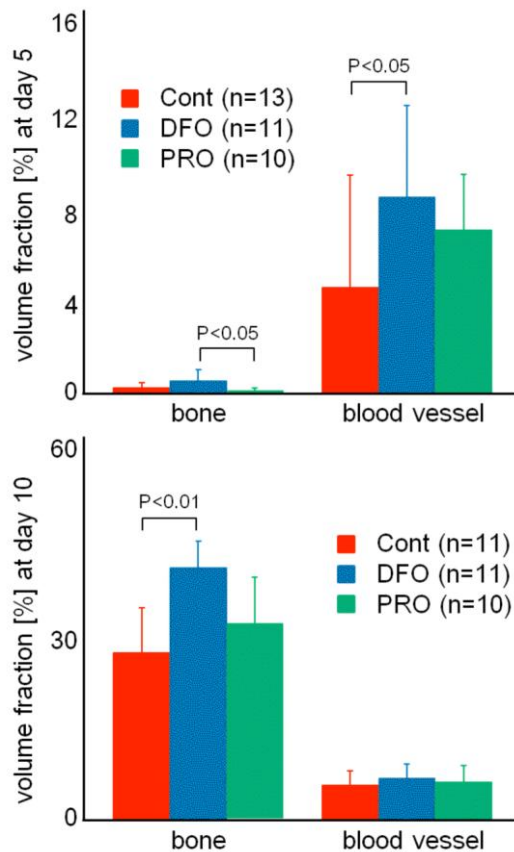


図4 術後5日目(上)及び10日目(下)における再生骨, 新生血管の欠損部における体積率. Cont: 尾部懸垂; DFO: 尾部懸垂+desferrioxamine; PRO: 尾部懸垂+propranolol.

の効果は確認できず, 10日目には骨形成が促進される傾向は見られたが, 有意な作用ではなかった.

尾部懸垂では交感神経が亢進され, β_2 受容体を介して骨形成は抑制され, 骨吸収は促進する. また, β_3 受容体を介した脂肪細胞からのレプチン分泌は低下し, レプチン受容体を介した骨形成も抑制される (Bonnet ら, Bone 2005). 実際, 尾部懸垂による骨量減少が, β 交感神経遮断あるいはレプチン投与によって緩和されることが報告されている (Kondo ら, J Biol Chem 2005; Baek ら, J Bone Miner Res 2009). 本研究でも PRO 投与による β 交感神経遮断は骨再生を促進すると考えられるが, 着目した骨修復早期には骨形成が支配的であり, 骨吸収への抑制作用はほとんど機能しなかったと考えられる. 実際に組織学的検討では骨欠損部位に破骨細胞は確認できなかった (図5). また, PRO は非選択的 β 交感神経遮断薬であり, アナボリック効果を示すと考えられる β_1 交感神経も遮断する. これらのことが, 骨修復早期において PRO 投与による確かな治療効果が得られなかった原因として考えられる.

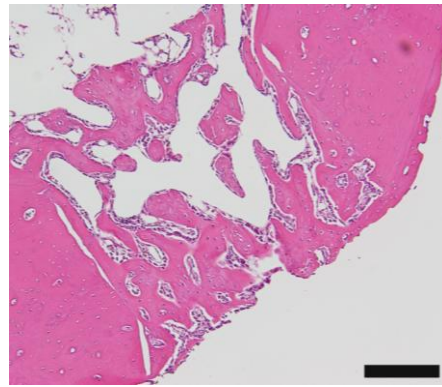


図5 術後10日(Cont)の骨欠損部 HE 染色. bar: 200 μ m.

一方, 本研究でのレプチンの動態は不明であるが, PRO 投与によって少なくとも通常飼育のレプチンレベルに近づいたのではないかと考えられる. レプチンは血管新生作用も有し, 術後5日目で見られた Cont に対する血管体積率の増加傾向は, β 交感神経遮断による骨芽細胞活性に伴う血管新生因子の増加とレプチン血清濃度の回復によるものと考えられる. β 交感神経遮断の骨修復への効果については, 濃度依存性や β_2 受容体の選択的遮断など, さらに詳細な検討が必要である.

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4件)

- ① T. Matsumoto, N. Ando, T. Tomii, K. Uesugi: Three-Dimensional Cortical Bone Microstructure in a Rat Model of Hypoxia-Induced Growth Retardation, Calcif. Tissue Int. 88: 54-62, 2011年, 査読有り.
- ② T. Matsumoto, K. Nishikawa, M. Tanaka, K. Uesugi: In Vivo CT Quantification of Trabecular Bone Dynamics in Mice After Sciatic Neurectomy Using Monochromatic Synchrotron Radiation, Calcif. Tissue Int. 88: 432-441, 2011年, 査読有り.
- ③ 松本健志, 上杉健太郎: ジルコニア k 吸収端を利用したサブトラクション放射光 CT による骨欠損部の再生骨・血管新生の高解像度イメージング, Osteoporosis Jpn. 19: 82-85, 2011年, 査読有り.
- ④ J. Kwon, H. Naito, T. Matsumoto, M. Tanaka: Computational Study on Trabecular Bone Remodeling in Human Femur Under Reduced Weight-Bearing Conditions, J. Biomech. Sci. Eng. 5: 552-564, 2010年, 査読有り.

[学会発表] (計9件)

- ① 後藤大智, 松本健志, 内藤尚, 田中正夫: サブトラクション放射光 CT による骨欠損修復早期の骨再生及び血管新生定量イメージング

- ジング, 第 34 回日本バイオレオロジー学会年会, 大阪, 2011 年.
- ② 松本健志, 上杉健太郎: ジルコニア k 吸収端を利用したサブトラクション放射光 CT による骨欠損部の再生骨/血管新生の高解像度イメージング, 第 12 回日本骨粗鬆症学会, 2010, 大阪, 2010 年.
- ③ T. Matsumoto, K. Uesugi: K-edge Subtraction 3D Imaging of Cortical Bone Repair and Angiogenesis by Synchrotron Radiation CT With a Zirconia-based Contrast Agent in a Rat Tibial Defect Model, 5th World Cong. Biomech., Singapore, 2010 年.
- ④ T. Matsumoto, K. Uesugi: Bone Angiography by SRCT With Newly Developed Zirconia Contrast Medium: Application to Bone Defect Filling, 10th Int. Conf. BSR & 6th Int Workshop MASR, Melbourne, 2010 年.
- ⑤ M. Tanaka, T. Matsumoto, H. Naito: Canal Network Structure and Oxygen Transport in Cortical Bone, 3rd Japan-Switzerland Workshop Biomech., Engelberg, 2009 年.
- ⑥ T. Matsumoto, N. Ando, H. Naito, M. Tanaka, T. Tomii: Effect of Chronic Postnatal Exposure to Hypoxic Environment on Canal Network Formation in Infant Rat Cortical Bone, 2nd Joint Meeting of IBMS and ANZBMS, Sydney, 2009 年.
- ⑦ T. Matsumoto, K. Nishikawa, H. Naito, M. Tanaka: Trabecular Bone Dynamics in Mice Subjected to Unilateral Sciatic Neurectomy Assessed by in vivo μ CT Using Monochromatic Synchrotron Radiation, Exp Biol. 2008, San Diego, 2008 年.
- ⑧ 松本健志: 単色放射光 CT による骨形態解析, 第 35 回日本臨床バイオメカニクス学会, 大阪, 2008 年.
- ⑨ 松本健志: 放射光 CT による骨の形態・生理解析, 日本顕微鏡学会関西支部 特別企画講演会, 岡崎, 2008 年.

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
松本 健志 (MATSUMOTO TAKESHI)
大阪大学・基礎工学研究科・准教授
研究者番号：30249560
- (2) 研究分担者
田中 正夫 (TANAKA MASAO)
大阪大学・基礎工学研究科・教授
研究者番号：40163571
- (2) 研究分担者
内藤 尚 (NAITO HISASHI)
大阪大学・基礎工学研究科・助教
研究者番号：40392203
- (2) 研究分担者
中村 匡徳 (NAKAMURA MASANORI)