

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年～2010年

課題番号：20591782

研究課題名 長管骨長径成長における新たな制御機序の解明

研究課題名 New mechanisms of regulation of longitudinal growth of tubular bone

研究代表者 高田 信二郎 (TAKATA SHINJIRO)

徳島大学・病院・准教授

研究者番号：20284292

研究成果の概要 (和文)：週齢8週のラット大腿骨骨幹部骨膜の全周性切除を行って6週間の自由飼育を行うと、大腿骨長径が過成長した。骨形態計測では、骨膜切除は、大腿骨遠位成長軟骨板における内軟骨性骨化を刺激して長径成長速度を高め、その結果として、大腿骨長径の過成長をもたらすことがわかった。さらに、 μ CTを用いた海綿骨構造解析では、骨膜切除を行うと大腿骨遠位骨幹部端部における骨梁数の増加を示した。これらの結果は、骨膜は成長軟骨板における内軟骨性骨化を調節していることを示唆した。

研究成果の概要 (英文)：Circumferential periosteal division (CPD) of diaphysis of femur of rat aged 8 weeks produces longitudinal overgrowth. Periosteum of diaphysis of the right femur was divided circumferentially (CPD group), and the left femur was control (Control group). Bone histomorphometry analysis revealed that CPD stimulates endochondral ossification of CPD group compared with Control group. Three-dimensional microstructure analysis of trabecular bone by μ CT system showed that CPD increased number of trabecular bone compared with Control group. These results suggest that periosteum regulates endochondral ossification of tubular bone.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

長管骨骨幹部骨膜の全周性切除は、その長径を過成長させる。この生命現象は、1979年、ラットの脛骨を用いた研究で初めて報告された(Warrel E et al. J Anat 128(19): 179-184, 1979.)。以後、ラット脛骨の長径成

長が最も促進される部位は、脛骨近位成長軟骨板近傍であること(Lynch WC et al. J Bone Joint Surg 69:812-816, 1987.)、ラット脛骨骨膜切除後は、肥大軟骨細胞数が増加すること(Taylor JF et al. J Anat 151: 221-231, 1987.)、が続いて報告された。

申請者は、これまでの研究の中で、長管骨の成熟を促進する因子の発見に努めてきた。さらに、上記先行研究の結果を踏まえ、ラット大腿骨骨幹部の骨膜を全周性に切除することにより、その長径が過成長する実験モデル(長管骨長径過成長モデル)を確立した。

2. 研究の目的

本申請研究の目的は、申請者が確立した長管骨長径過成長モデルをもちいて、骨膜全周性切除が成長軟骨板における内軟骨性骨化や骨代謝におよぼす影響を明らかにすることである。

3. 研究の方法

実験動物は、8週齢のWistar系ラットを用いた。全身麻酔を行った後、右大腿骨の第3転子直下から遠位方向に向かって約8mmの幅で、骨膜を全周性に切除した(CPD group)。左大腿骨は、非侵襲であり、これを対照とした(Control group)。麻酔薬の過剰投与によって安楽死させた後、両側の大腿骨を摘出して、以下の解析を行った。

骨形態計測は、大腿骨の成長途上の変化をみる目的で、骨膜切除後4週で実施した(n=6)。第1回骨標識は、安楽死6日前にテトラサイクリンを皮下投与した。第2回骨標識は、安楽死2日前にカルセインを皮下投与した。成長軟骨板における長径成長速度と、遠位骨幹部部の海綿骨において骨形態計測は、骨膜切除前、同2週後、同4週後、同6週後において実施した。

一方、 μ CTを用いた海綿骨構造解析は、骨膜切除後6週で、遠位骨幹部部において実施した(n=6)。

CPD groupとControl groupにおける上記解析結果の統計学的比較は、対応のあるt検定を用い、その有意水準は5%とした。

4. 研究成果

ラット大腿骨骨幹部骨膜の全周性切除を行い6週間の自由飼育を行うと、CPD groupの大腿骨長径はControl groupにくらべて、約4%過成長した(図1, 2)。

(A) (B) (C) (D)

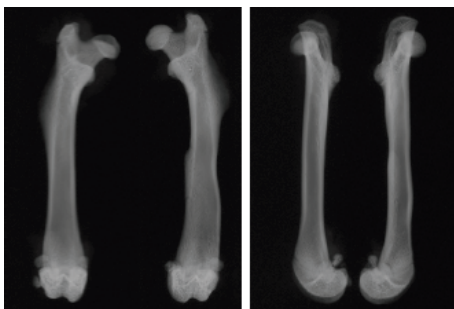


図1. ラット大腿骨骨膜切除による骨形態変化。(A)Control group 正面、(B)CPD group 正面、(C)Control group 側面、(D)CPD group 側面。

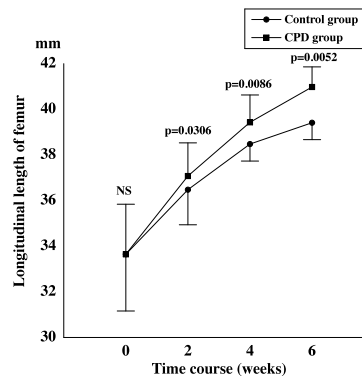


図2. 大腿骨長径の経時的変化。

μ CTを用いた海綿骨構造解析では、骨膜切除後6週で、遠位骨幹部部において実施した。その結果、CPD groupはControl groupに比べて海綿骨の数的増加がみられた(図3)。

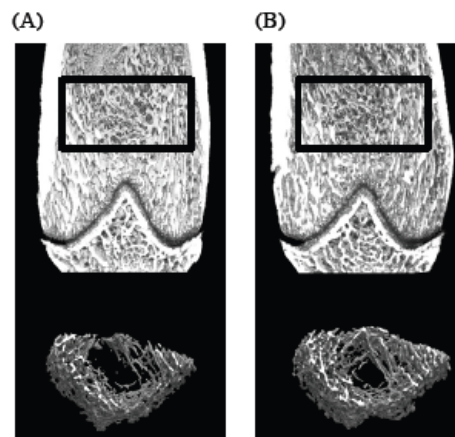


図3. ラット大腿骨遠位骨幹部部の海綿骨構造の変化。(A)Control group、(B)CPD group

骨形態計測では、長径成長速度(longitudinal growth rate, LGR)は、骨膜切除前(週齢8週)が最大であった。以後、成長とともにLGRは次第に低下したが、骨膜切除を行うと、その低下を有意に抑制していた(図4)。

骨石灰化速度(mineral apposition rate, MAR)も、LGR同様に、骨膜切除前が最も高く、以後、成長とともに低下した。しかし、骨膜切除を行った結果、MARの成長に伴う低下を有意に抑制していた(図5)。

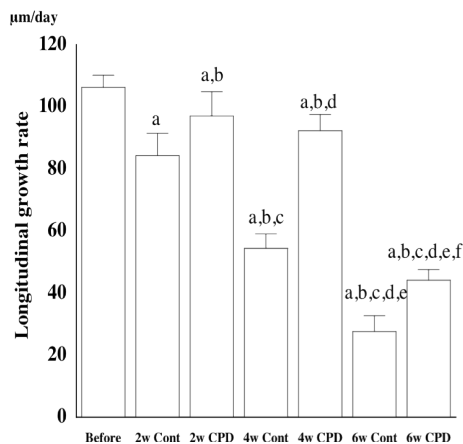


図 4. ラット大腿骨遠位成長軟骨板における長径成長速度の比較.
Before, 骨膜切除前;Cont, Control group;CPD, CPD group
 $ap < 0.05$ vs. Before, $bp < 0.05$ vs. 2w Cont, $cp < 0.05$ vs. 2w CPD, $dp < 0.05$ vs. 4w Cont, $ep < 0.05$ vs. 4w CPD, $fp < 0.05$ vs. 6w Cont

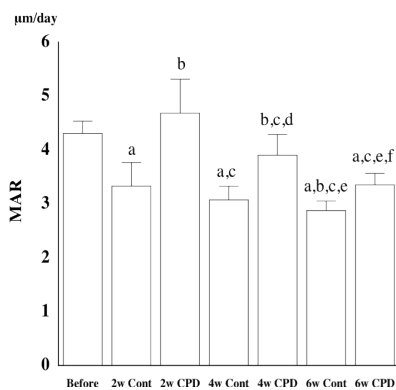


図 5. ラット大腿骨遠位成長軟骨板における骨石灰化速度の比較.
Before, 骨膜切除前;Cont, Control group;CPD, CPD group
 $ap < 0.05$ vs. Before, $bp < 0.05$ vs. 2w Cont, $cp < 0.05$ vs. 2w CPD, $dp < 0.05$ vs. 4w Cont, $ep < 0.05$ vs. 4w CPD, $fp < 0.05$ vs. 6w Cont

骨形成の指標である骨形成速度 (bone formation rate / bone surface, BFR/BS)、LGR や MAR 同様に、成長とともに低下した。しかし、骨膜切除を行うと、特に、骨膜切

2週 of CPD group は、骨膜切除前の BFR/BS を超えた (図 6)。同じく、骨形成の指標である bone formation rate / tissue volume (BFR/TV) も同じ傾向であった (図 7)。

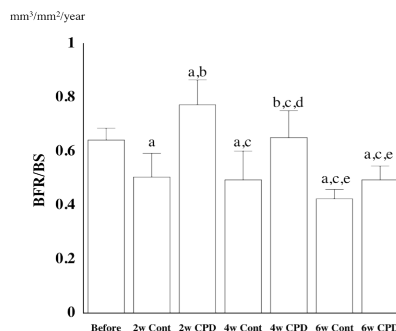


図 6. ラット大腿骨遠位成長軟骨板における骨形成速度 BFR/BS の比較.

Before, 骨膜切除前;Cont, Control group;CPD, CPD group
 $ap < 0.05$ vs. Before, $bp < 0.05$ vs. 2w Cont, $cp < 0.05$ vs. 2w CPD, $dp < 0.05$ vs. 4w Cont, $ep < 0.05$ vs. 4w CPD, $fp < 0.05$ vs. 6w Cont

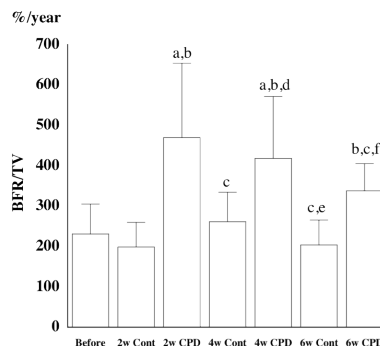


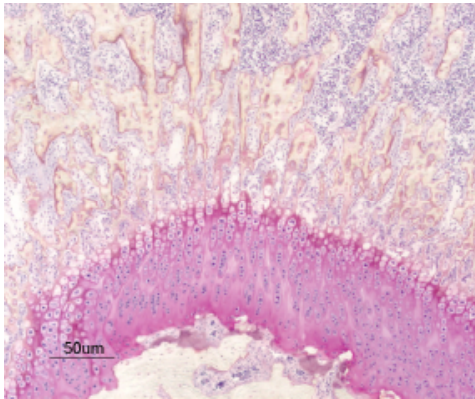
図 7. ラット大腿骨遠位成長軟骨板における骨形成速度 BFR/TV の比較.

Before, 骨膜切除前;Cont, Control group;CPD, CPD group
 $ap < 0.05$ vs. Before, $bp < 0.05$ vs. 2w Cont, $cp < 0.05$ vs. 2w CPD, $dp < 0.05$ vs. 4w Cont, $ep < 0.05$ vs. 4w CPD, $fp < 0.05$ vs. 6w Cont

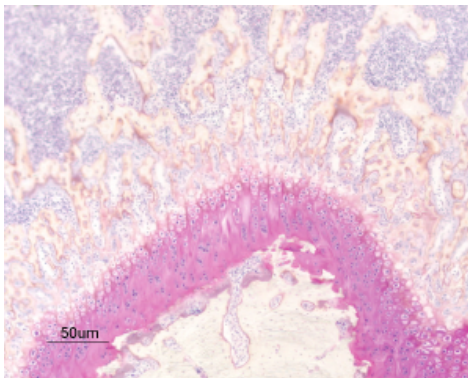
骨膜切除前の大腿骨遠位成長軟骨板の幅は、成長とともに、減少した。骨膜切除後 4 週を経過した CPD group の遠位成長軟骨板幅は、Control group に比べ厚かった。骨膜切除後 6 週では、骨膜切除後 4 週ほどではないものの、CPD group は Control group に比べて成長軟骨板の幅が大きかった。これら CPD

group と Control group における成長軟骨板幅の差は、肥大軟骨細胞層と肥大軟骨細胞数の差によってもたらされていた (図 8)。

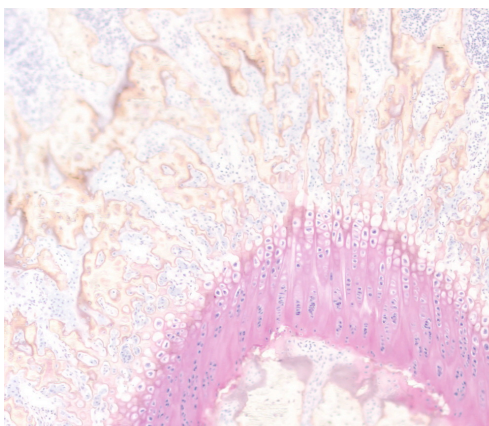
(A)



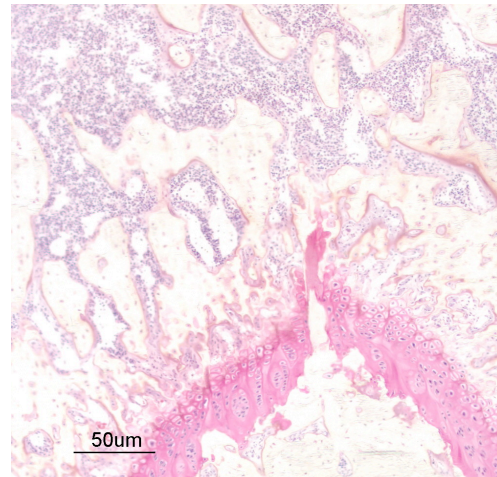
(B)



(C)



(D)



(E)

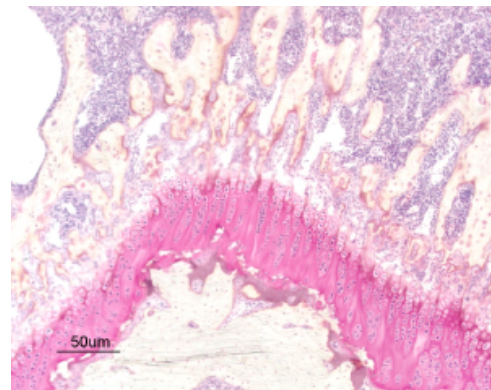


図 8. ラット大腿骨遠位成長軟骨板の比較.

- (A) 骨膜切除前 (週齢 8 週)
- (B) 骨膜切除後 4 週 Control group
- (C) 骨膜切除後 4 週 CPD group
- (D) 骨膜切除後 6 週 Control group
- (E) 骨膜切除後 6 週 CPD group

骨形態計測でもとめた長径成長速度は、CPD 後 2 週、4 週、6 週のいずれにおいても、CPD group は Control group にくらべて有意に高い値を示した (図 4)。長径成長速度は、カルセインとテトラサイクリンの 2 つの標識間の距離を投与間隔で除してもとめられる。CPD 実施前、CPD 後 2 週、CPD 後 4 週、CPD 後 6 週では、CPD を実施した日数が経つごとに、二重標識間の距離が短縮した。いずれの時期においても、CPD group は Control group に比べて、二重標識間距離が大きいことが示

された(図9)。

(A) (B) (C) (D)

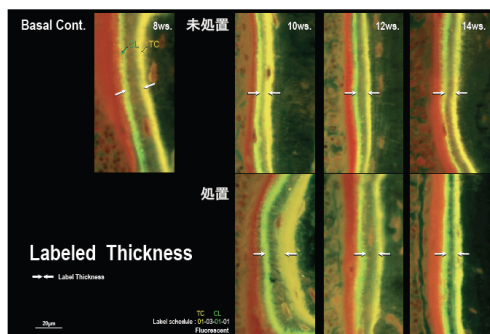


図9. ラット大腿骨遠位骨幹端部2次海綿骨におけるカルセイン(緑)とテトラサイクリン(黄)を用いた二重標識間の距離の比較.

- (A) CPD実施前(週齢8週)
(B) CPD実施後2週
(C) CPD実施後4週
(D) CPD実施後6週

未処置、Control group
処置、CPD group

これまでの研究結果から、ラット大腿骨骨幹部骨膜の全周性切除は、成長軟骨板における内軟骨性骨化を促進させ、その結果、長径が過成長することが明らかになった。

骨膜切除という機会的刺激は、成長軟骨板における内軟骨性骨化を促進した。その機序を解明すれば、内軟骨性骨化の新たな促進因子を発見することが可能となる。そして、その研究成果は、長管骨の成長抑制や過剰成長の新機序を見出し、その成果を四肢短縮症の治療法の開発に寄与することが可能であると確信している。

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11件)

1. Yoh K, Takata S, Yoshimura N, Hashimoto J: Efficacy, tolerability and safety of risedronate in Japanese patients with Paget's disease of bone. *J Bone Miner Metab* 28:468-476, 2010. (査読有)
2. Nakao S, Takata S, Uemura H, Kashihara M, Osawa T, Komatsu K, Masuda Y, Okahisa T, Nishikawa K, Kondo S, Yamada M, Takahara R, Ogata Y,

Nakamura Y, Yasui N: Relationship between Barthel Index scores and ADL in stroke patients during acute phase of rehabilitation. *J Med Invest* 57(1,2):81-88, 2010. (査読有)

3. Nakao S, Takata S, Uemura H, Nakano S, Egawa H, Kawasaki Y, Yasui N: Early ambulation after total knee arthroplasty prevents patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis from developing deep venous thrombosis. *J Med Invest* 57(1,2):146-151, 2010. (査読有)
4. Yukata K, Kubo T, Matsui Y, Koizumi T, Takata S, Yasui N: Nonunion of capital femoral physeal fracture with a large metaphyseal fragment. *J Orthop Trauma* 24(8): e75-77, 2010. (査読有)
5. Abbaspour A, Takahashi M, Sairyo K, Takata S, Yukata K, Inui A, Yasui N: Optimal increase in bone mass by continuous local infusion of alendronate during distraction osteogenesis in rabbits. *Bone* 44(5):917-923, 2009. (査読有)
6. Higashino K, Sairyo K, Katoh S, Nakano S, nishi T, yasui N: The effect of rheumatoid arthritis on the anatomy of the female cervical spine: a radiographical study. *J Bone Joint Surg* 91(8):1058-63, 2009. (査読有)
7. Kawasaki Y, Hanaoka N, Takahashi M, Egawa H, Yasui N: Percutaneous opening wedge varus osteotomy with a multidrilling guide in Perthes' disease: a technical note on two cases. *J Pediatr Orthop B* 18(5): 242-7, 2009. (査読有)
8. Hayashi F, Sakai T, Sairyo K, Hirohashi N, Higashino K, Katoh S, Yasui N: Intramedullary schwanomma with calcification of the epiconus. *Spine J* 9(5):e19-23, 2009. (査読有)
9. Abbaspour A, Takata S, Matsui Y, Katoh S, Takahashi M, Yasui N: Continuous infusion of insulin-like growth factor-I (IGF-I) into the epiphysis promotes longitudinal bone growth of the tibiae in young rabbits. *Int Orthop* 32(3): 395-402, 2008. (査読有)
10. Abbaspour A, Takata S, Sairyo K, Kato S, Yukata K, Yasui N; Continuous local

infusion of fibroblast growth factor-2 enhances consolidation of the bone segment lengthened by distraction osteogenesis in rabbit experiment.

Bone 42(1):98-106, 2008. (査読有)

11. Takata S, Takao S, Yoshida S, Yasui N: Therapeutic effects of one-year alendronate treatment in three cases of osteoporosis with parietal thinning of skull. *J Med Invest* 55(3,4): 297-302, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

1. Takata S et al.: Circumferential periosteal stripping of femoral diaphysis of developing rat produces longitudinal overgrowth and cortical hypertrophy. 32nd Annual Meeting for American Society of Bone Mineral Research. Toronto, Canada, October 10-15, 2010.
2. 高田信二郎他: ラット大腿骨骨幹部の全周性骨膜切除は内軟骨性骨化と膜性骨化とを促進する. 第28回日本骨代謝学会 平成22年7月21日~23日. 東京都.
3. 高田信二郎: シンポジウムリハビリテーション医学領域の基礎研究と臨床応用. 骨関節領域の基礎研究. 第47回日本リハビリテーション医学会学術集会. 平成22年5月20日~22日. 鹿児島市
4. 高田信二郎他: 成長期ラット大腿骨骨幹部の全周性骨膜切除が内軟骨性骨化と膜性骨化に及ぼす影響. 第30回日本骨形態計測学会. 平成22年5月14日~15日. 米子市.
5. Takata S, et al.: Unilateral circumferential periosteal removal causes overgrowth of rat femur by activation of endochondral ossification of growth plate. 31st Annual Meeting of American Society for Bone Mineral Research. Denver, Colorado, USA. Nov. 11-15, 2009.
6. 高田信二郎他: ラット大腿骨骨幹部の骨膜切除は成長軟骨板における内軟骨性骨化を活性化して骨を延長する. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会. 平成21年11月5日~6日. 横浜市
7. 高田信二郎, 江西哲也他: ラット大腿骨骨幹部骨膜の全周性切除が長径成長と骨微細構造におよぼす影響. 第11回日本骨粗鬆症学会. 平成21年10月14日~16日. 名古屋市.
8. 高田信二郎他: ラット大腿骨骨幹部の骨膜切除がその長径成長におよぼす影響. 第46回日本リハビリテーション医学会学術集会. 平成21年6月4日~6日. 静岡市
9. 高田信二郎他: 長管骨骨幹部の骨膜切除による長径成長促進と骨形態変化の機序解明. 第29回日本骨形態計測学会. 平成21年5月28日~30日. 大阪市
10. Takata S, et al.: Therapeutic effects of one-year alendronate treatment in three cases of osteoporosis with parietal thinning. 30th Annual Meeting of American Society for Bone Mineral Research. Montrea, Quebec, Canada, Sep. 12-16, 2008, Canada.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 信二郎 (TAKATA SHINJIRO)

(徳島大学・病院・准教授)

研究者番号: 20284292

(2) 研究分担者

安井 夏生 (YASUI NATSUO)

(徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授)

研究者番号: 00157984

高橋 光彦 (TAKAHASHI MITSUHIKO)

(徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教)

研究者番号: 10372715

江西 哲也 (ENISHI TETSUYA)

(徳島大学・病院・医員)

研究者番号: 20467806

(3) 連携研究者

なし