

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18017

研究課題名（和文）成長板軟骨損傷後の修復過程におけるケモカインCCR7/CCL21の果たす役割

研究課題名（英文）The Role of Chemokine CCR7/CCL21 in the Repair Process After Growth Plate Cartilage Injury

研究代表者

松岡 正剛（Matsuoka, Masatake）

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：70816066

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の最終目標は、ケモカインCCR7が成長板軟骨損傷の修復過程において果たす役割を解明することである。我々が独自に作製した3週齢マウス近位脛骨成長板損傷モデルにより成長板損傷後、脛骨全長はケモカインCCR7受容体欠損マウスにおいて野生型と比較して、骨橋形成が阻害された結果、脛骨の長軸方向の成長抑制を阻害できることを明らかにした。また、間葉系幹細胞から骨化誘導を行うと、血管内皮増殖因子などの骨化関連マーカーの発現がケモカインCCR7受容体欠損マウスにおいて、低下していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成長板軟骨損傷に対して四肢変形の主因となる損傷部位の骨性癒合に対して、骨性架橋の切除に加えて骨セメント移植や自家脂肪組織移植などが試みられている。しかし、成長板障害に続発する骨性癒合を抑制する治療法は未だ存在しない。我々はこの点に着目し、内軟骨性骨化を制御することで骨性架橋形成の抑制を目指している。本コンセプトは、今まで骨性架橋を侵襲的に切除するしかなかった治療法とは異なり、成長板軟骨板損傷に対する非侵襲的治療法の開発という新たな方向性を示している。本研究結果により、ケモカイン受容体CCR7を介した骨端線損傷に対する新規薬物治療法のターゲットとなる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The ultimate goal of this study is to elucidate the role that chemokine CCR7 plays in the repair process of growth plate cartilage injuries. Using our custom-designed model of proximal tibial growth plate injury in 3-week-old mice, it was demonstrated that the absence of the chemokine CCR7 receptor resulted in impaired formation of bony bridges compared to wild-type mice. This suppression of bridge formation subsequently prevented the inhibition of longitudinal growth in the tibia following growth plate injury. Additionally, when bone differentiation was induced in mesenchymal stem cells, the expression of bone-related markers such as vascular endothelial growth factor (VEGF) was shown to be reduced in chemokine CCR7 receptor-deficient mice.

研究分野：整形外科

キーワード：骨端線損傷

1. 研究開始当初の背景

小児骨端線損傷は小児骨折における 30%を占め、そのうち 10%が四肢の短縮、変形をきたすため社会的に重要な問題である。長管骨の長軸方向の成長は、成長板における軟骨細胞肥大化に引き続く血管侵入による骨組織への置換(内軟骨性骨化)により主に制御される。成長板軟骨損傷は損傷軟骨の部分的な骨化により成長障害を来し、若年者に大きな負担を与えるが、その詳細な機序は明らかにされていない。

ケモカインは 8-10 kD の低分子量タンパク質であり、幹細胞や前駆細胞の動員に重要な役割を担うことが知られている。研究代表者のグループはケモカインの網羅的解析により、軟骨自然修復過程に促進的役割を担うケモカイン受容体 CCR7 とそのリガンドである CCL21 を抽出し、研究代表者が独自に創出したマウス膝関節軟骨損傷モデルを用いて (Matsuoka M et al. Tissue Eng Part C Methods. 2015) CCR7/CCL21 が関節軟骨損傷直後に損傷部位に集積し、修復過程を促進することを見出した。さらに、CCR7 欠損マウスにおいて軟骨修復過程が抑制される一方で、外因性に CCL21 を投与すると関節軟骨修復が促進されることを明らかにした (Joutoku Z and Matsuoka M et al. Sci Rep. 2019)。

そこで研究代表者は、成長板軟骨損傷の治癒過程においても、ケモカイン CCR7/CCL21 が軟骨修復過程を制御することにより成長障害の発生に重要な役割を担う可能性があると着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は成長板軟骨損傷後の修復過程に対して、ケモカイン受容体 CCR7 が果たす役割を明らかにすることである。我々の先行研究から、ケモカイン受容体 CCR7 が骨髄間葉系幹細胞を損傷部に動員することで成長板治癒過程に対して中心的役割を担うことは明らかである。そのため、ケモカイン受容体 CCR7 の発現を調整された遺伝子改変マウスを用いて成長板軟骨損傷後の修復過程を解析することで、成長板軟骨損傷に対する新しい知見が得られる可能性がある。

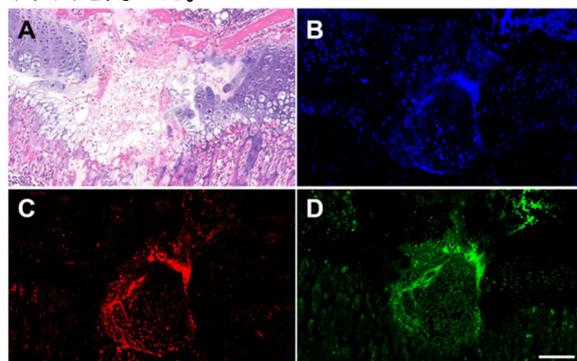
3. 研究の方法

マウス成長板軟骨損傷モデルを用いて、3 週齢の野生型マウスの修復過程を調査した。全身麻酔下に実体顕微鏡で観察を行い、膝関節に 5mm の皮膚切開により脛骨近位成長板を明らかにし、脛骨前方より後方に向かって 25-G 針で直径 500 μ m の成長板軟骨損傷を作製した。逆側膝は皮膚切開のみとし、修復結果の評価として各タイムコースで 10 匹 20 膝を回収し、肉眼的評価・組織定量評価を行った。また、マイクロ CT 解析により、損傷部に形成した骨橋の骨量、損傷部以遠の二次海綿骨の骨密度 (BMD)、損傷成長板の成長板高を調査した。さらに 2 週齢マウスの四肢骨より間葉系幹細胞を樹立し、ケモカイン受容体 CCR7 が骨化誘導に与える影響を調査した。

4. 研究成果

・成長板損傷部に集積する細胞集団の発現解析

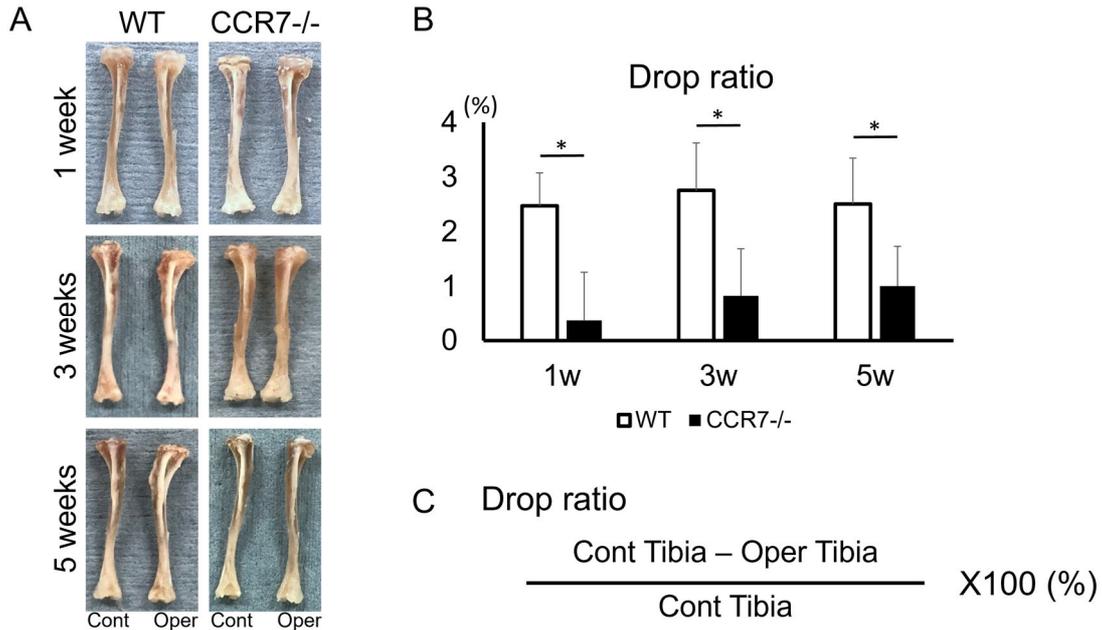
成長板損傷後 1 日の野生型マウスを回収し、免疫組織学的解析により損傷部に集積する細胞集団の発現解析を行ったところ、損傷部に集積した細胞集団は血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) に強陽性であり、かつそれらはケモカイン受容体 CCR7 にも陽性であった (図 1)。本検討により、ケモカイン受容体 CCR7 が VEGF 陽性の前骨芽細胞の動員に中心的役割を担っている可能性が示された。以上より、成長板損傷後の治癒過程検討のために以後の検討にケモカイン受容体 CCR7 欠損マウス (KO) マウスを用いた。



(図 1) 脛骨骨端線損傷作製後 1 日の発現解析。(A) HE 染色 (B) DAPI (C) CCR7 (D) VEGF

・マウス成長板軟骨損傷後における脛骨成長障害の検討

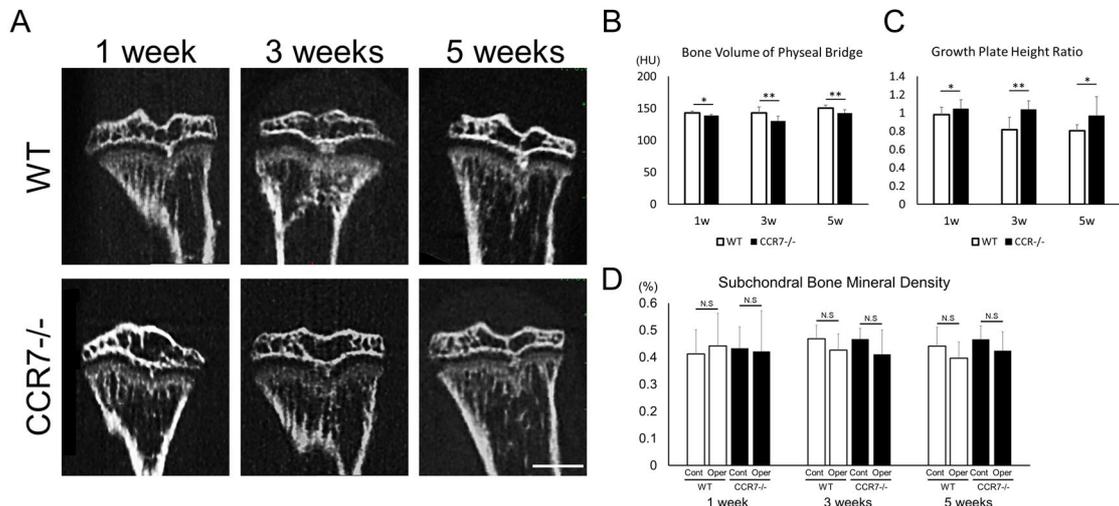
脛骨全長について、健側との比 (Drop ratio: [健側脛骨長 - 患側脛骨長] / 健側脛骨長 × 100%) を算出した。術後 1、3、5 週いずれにおいても KO マウスにおいて、Drop ratio は WT より低値であり、脛骨全長が保たれていることを示した (1 週: WT 2.48 ± 0.60%、KO 0.37 ± 0.89%、p < 0.01、3 週: WT 2.76 ± 0.86 ± 0.60%、KO 0.83 ± 0.86%、p < 0.01、5 週: WT 2.51 ± 0.84 %、KO 1.01 ± 0.74、p < 0.01、図 2)。



(図 2) 脛骨骨端線損傷作成後の肉眼評価。(A) 術後 1、3、5 週における肉眼所見 (B) 術後 1、3、5 週における Drop ratio (C) Drop ratio の算出式

・マイクロ CT 解析

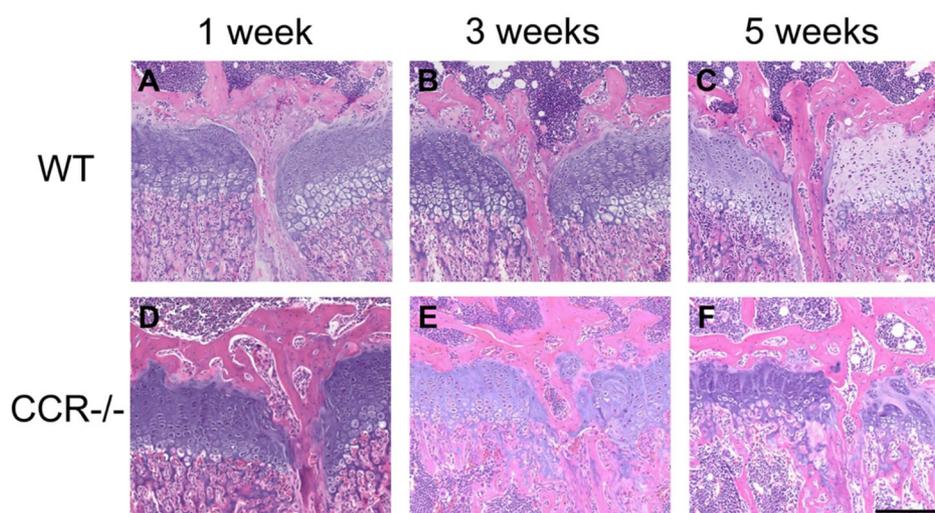
損傷後 1、3、5 週において損傷部に形成した骨橋の bone volume を測定したところ、全てのタイムコースで骨橋形成が KO において WT と比較して有意に抑制された (1 週: WT 143.00 ± 3.09 HU、KO 138.95 ± 1.58 HU、p < 0.05、3 週: WT 143.16 ± 9.21 HU、KO 130.37 ± 7.62 HU、p < 0.01、5 週: WT 150.29 ± 4.59 HU、KO 142.84 ± 5.07 HU、p < 0.05、Figure 3B)。成長板高については、同様に健側比を算出したところ (成長板高比: 患側成長板高 / 健側成長板高) 全てのタイムコースで WT は KO と比較して有意に低値であった (1 週: 0.98 ± 0.08 in WT vs 1.04 ± 0.10 in CCR7-/-、p < 0.05、3 週: 0.82 ± 0.14 in WT vs 1.03 ± 0.10 in CCR7-/-、p < 0.01、5 週: 0.80 ± 0.07 in WT vs 0.97 ± 0.21 in CCR7-/-、p < 0.05; Figure 3C)。BMD については WT と KO で同程度であった (Figure 3D)。



(図3) 脛骨骨端線損傷作成後のマイクロCT解析。(A) 各タイムコースにおける代表画像 (B) 術後1、3、5週における成長板高比 (C) 術後1、3、5週におけるBMD測定 (D) 軟骨下骨のBMD

・組織学的解析

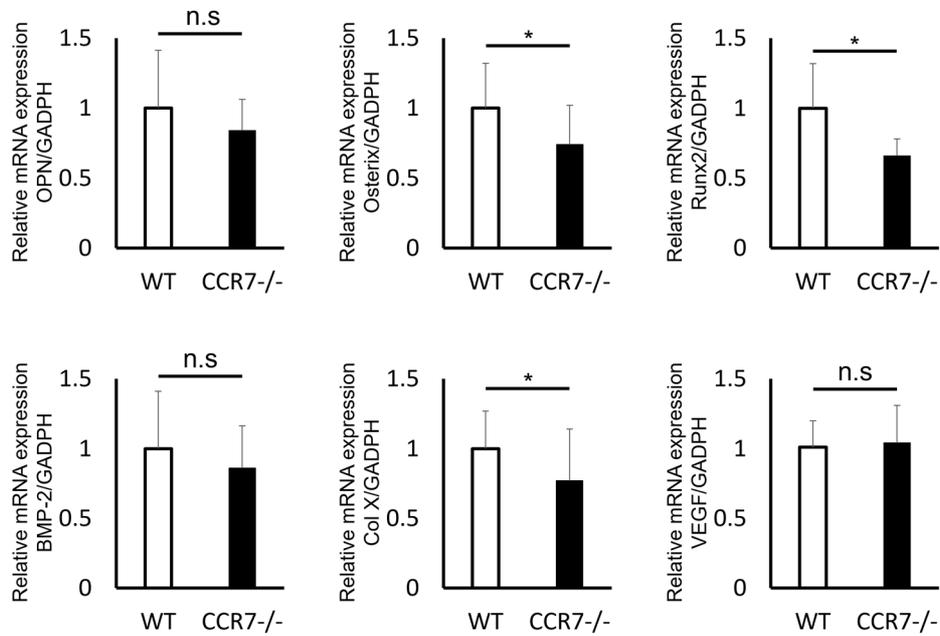
HE染色では、損傷部位の骨橋形成に違いが見られた。野生型マウスでは術後1週で骨橋形成が見られ、5週で損傷部をまたぐように骨橋が完成されていた(図4A-C)。一方、KOマウスの骨橋は、まばらで不安定かつ不連続な形状を示し、特に5週において一部は空虚であった(図4D-F)。



(図4) 脛骨骨端線損傷作成後の組織学的解析 (HE染色)。 (A-C) 野生型マウス (D-F) KOマウス。 Scale bar = 0.2 mm。

・骨化誘導過程における遺伝子発現解析

最後にケモカイン受容体 CCR7 が骨化誘導過程に与える影響を調査するために、マウスより間葉系幹細胞を回収し、骨化誘導を行い半定量的 RT-PCR 法により遺伝子解析を行った。14日間の分化誘導後、KOにおいては骨化関連マーカーの発現が低下していた (OPN: 1.00 ± 0.16 in WT vs 0.88 ± 0.14 in KO, $p = 0.28$; Osterix: 1.02 ± 0.22 in WT vs 0.78 ± 0.05 in KO, $p = 0.03$; Runx2: 1.01 ± 0.16 in KO, $p = 0.39$; Col X: 1.05 ± 0.16 in WT vs 0.7 ± 0.04 in KO, $p = 0.02$; VEGF: 1.01 ± 0.19 in WT vs 1.04 ± 0.27 in KO, $p = 0.92$; Figure 5)。



(図5) マウス間葉系幹細胞からの骨化誘導後の遺伝子解析。

成長板軟骨損傷に対して四肢変形の主因となる損傷部位の骨性癒合に対して、骨性架橋の切除に加えて骨セメント移植や自家脂肪組織移植などが試みられている。しかし、成長板障害に続発する骨性癒合を抑制する治療法は未だ存在しない。我々はこの点に着目し、内軟骨性骨化を制御することで骨性架橋形成の抑制を目指している。本コンセプトは、今まで骨性架橋を侵襲的に切除するしかなかった治療法とは異なり、成長板軟骨板損傷に対する非侵襲的治療法の開発という新たな方向性を示している。ケモカイン受容体 CCR7 を介した骨端線損傷に対する新規薬物治療法のターゲットとなる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 金 佑泳, 松岡 正剛, 小野寺 智洋, 細川 吉暁, 岩崎 倫政
2. 発表標題 小児成長板軟骨細胞損傷後の修復過程においてケモカインCCR7/CCL21の果たす役割
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金 佑泳, 松岡 正剛, 小野寺 智洋, 細川 吉暁, 岩崎 倫政
2. 発表標題 成長板軟骨細胞損傷後の修復とケモカインCCR7/CCL21の役割
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 WooYoung Kim, Masatake Matsuoka, Tomohiro Onodera, Yoshiaki Hosokawa, Norimasa Iwasaki
2. 発表標題 Ccr7 Depletion Alleviates Bony Growth Imbalance Following Physeal Injury In Mice.
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2023 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kim Woo Young, 松岡正剛, 小野寺智洋, 細川吉暁, 岩崎倫政
2. 発表標題 成長板軟骨細胞損傷後の修復過程においてケモカインCCR7/CCL21の果たす役割
3. 学会等名 第40回日本運動器移植・再生医学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kim Woo Young, Masatake Matsuoka, Tomohiro Onodera, Yoshihiro Hosokawa, Norimasa Iwasaki
2. 発表標題 Depletion of CCR7 ameliorated growth imbalance after physeal injury in mice
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masatake Matsuoka, WooYoung Kim, Yuko Sakai, Ryuichi Fukuda, Keizumi Matsugasaki, Kentaro Homan, Tomohiro Onodera and Norimasa Iwasaki
2. 発表標題 Depletion of CCR7 inhibited growth imbalance after physeal injury
3. 学会等名 ICRS2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂井 裕子、松岡 正剛、金 佑泳、細川 吉暁、福田 龍一、宝満 健太郎、小野寺 智洋、岩崎 倫政
2. 発表標題 ケモカインCCR7欠損は成長板損傷後の骨性架橋形成を抑制する
3. 学会等名 第36回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2023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
---------	---------