

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591909

研究課題名（和文）

骨折治癒過程におけるマクロファージ遊走阻止因子の役割とその制御による効果の解明

研究課題名（英文）

Role of MIF on the process of fracture healing and the effect of its regulation

研究代表者

小野寺 伸 (ONODERA SHIN)

北海道大学・大学院医学研究科・客員准教授

研究者番号：00359481

研究成果の概要（和文）：骨折治癒過程におけるマクロファージ遊走阻止因子（MIF）の役割を MIF KO マウスを用いて検討した。MIF KO マウスでは骨折治癒過程早期において骨折仮骨の力学的骨強度が低下しており、その機序として、類骨の石灰化の遅れ、破骨細胞数の減少が関与しており、これらは MMP-2, MT1-MMP, カテプシン K、およびアルカリホスファターゼ mRNA の発現の低下と関連していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) on the process of fracture healing using MIF KO mice. In MIF KO mice, the mechanical properties of the fracture callus were decreased at the early stage of fracture healing, which was caused at least in part by the delay in the calcification of osteoid or the decrease in the number of osteoclasts. These were considered to be associated with decreased mRNA expression of MMP-2, MT1-MMP, Cathepsin K, and alkaline phosphatase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

キーワード：骨折治癒、マクロファージ遊走阻止因子、ノックアウトマウス、構造特性、遺伝子発現、骨形態計測

## 1. 研究開始当初の背景

サイトカインはあらゆる生命現象の理解に不可欠な、細胞間情報を担うタンパク分子である。マクロファージ遊走阻止因子（MIF）は、当初マクロファージの炎症巣からの散逸を妨げるリンホカインとして見出されたが、その後、種々の組織の細胞において恒常的に発現し tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  な

ど炎症性サイトカインの発現を誘導することから、炎症反応のメディエータとして注目されてきた。一方、MIF は皮膚創傷部位においてその発現が亢進すること、マウス皮膚創傷モデルにおいて抗 MIF 抗体局所投与により創傷治癒が遅延すること、さらにレンズ細胞や脳の発生過程で発現して器官形成に関与することなどが報告され、MIF は組織損傷の

修復にも関与することが示唆された。

われわれは、培養骨芽細胞および新生マウス頭頂骨上骨芽細胞において MIF が免疫組織化学的に陽性であり MIF mRNA が強く発現していることを示した (Onodera S, et al. Immunology 89, 430-435, 1996)。また繊維芽細胞および骨芽細胞を用い、MIF がマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -1, -3, -9, -13 誘導活性を持つこと、またその細胞内情報伝達系を解析し報告した (Onodera S, et al. Journal of Biological Chemistry 277, 7865-7874, 2002)。この二つの論文は MIF と MMP との関係をはじめて示したものであり、多数回引用されている。また申請者は卵巣摘出 (=estrogen depletion) によって生じる骨量減少が MIF ノックアウトマウス (MIF KO) では回避されることを明らかにし、MIF KO は卵巣摘出によって生じる high bone turnover およびサイトカインカスケードの亢進が生じていないことを示唆した (Oshima S, et al. FEBS Lett 580, 1251-1256, 2006)。さらにわれわれは MIF トランスジェニックマウスは高回転型骨粗鬆症を呈すること、しかし MIF それ自体には破骨細胞誘導活性がないことを示し、MIF は MMP や他のサイトカインなどの発現を介してマウス骨組織を高回転型骨粗鬆症に至らしめていることを示唆した (Onodera S, et al. J Bone Min Res 21, 876-885, 2006)。これら一連の報告は、MIF が骨組織において代謝亢進的な作用を有していることを in-vitro および in-vivo で示すものである。

骨は運動器支持組織として非常に重要であり、骨折の治癒機序の理解は、骨折治癒を促す方法の開発に必須である。骨組織の損傷後の治癒過程は、組織特異的な差異はあるものの、1. 炎症細胞の流入と血腫の形成、2. 血腫から血小板由来成長因子をはじめとする成長因子の産生、3. 周囲の未分化な間葉系細胞の動員と増殖と軟骨細胞への分化、II 型コラーゲンを主体とする軟骨性細胞外マトリックスの産生による軟骨性架橋の形成、4. 軟骨組織の骨組織への置換および細胞外マトリックスの再構築 の一連の流れからなる。

われわれは、ラット大腿骨骨折モデルを用い、骨折治癒過程における骨折仮骨での MIF の発現を免疫組織化学および RT-PCR により明らかにした (Onodera S, et al. Histochem Cell Biol 121, 209-217, 2004)。MIF mRNA の発現は骨折後 4 日目にピークに達し、以後漸減して 28 日目に定常状態に戻る。こうした骨折治癒過程において MIF は、たとえば損傷初期におけるマクロファージ等の炎症細胞の動員と集積、MMP や vascular endothelial growth factor (VEGF) の誘導を介した組織再構築などにおいて重要な役

割を果たすことが予想される。しかしながら、骨折治癒における MIF の意義を詳細に検討した報告はなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、MIF KO マウスの脛骨骨折モデルを使用して、マクロファージ遊走阻止因子遺伝子の欠損が骨折治癒に与える影響を明らかにすることであり、それを通して骨折治癒に対する MIF の役割を解明することである。我々は、①MIF KO マウスの骨折治癒過程において仮骨の構造特性が低下する②MIF KO マウスでは骨形態計測における各パラメーターが低下する③MIF KO マウスにおいて骨折治癒に関与するとされる因子の mRNA の発現が減少する、という仮説を立て、骨折治癒過程における MIF の役割について検証した。

## 3. 研究の方法

①雄 10 週齢の wild-type マウス (WT 群) 16 匹と MIFKO マウス (KO 群) 16 匹を用いた。右脛骨骨幹部中央を sagittal plane saw にて骨折作製後、スパイナル針を用いて髓内釘固定し、骨折モデルとした。左脛骨は骨折を行わずスパイナル針による髓内釘固定のみ行った。骨折作製後 6 週および 12 週にて 8 匹ずつマウスを屠殺し両側の脛骨を採取し、5mm/min の速度で 3 点曲げ力学試験を行った。得られた荷重-変位曲線から最大破断荷重および線形剛性を求め、対健側比を算出した。②(1)雄 10 週齢の wild-type マウス (WT 群) と MIF-KO マウス (KO 群) を用いた。脛骨骨折モデルを作製した。骨折後 7, 14, 21, 28 日に軟 X 線撮影を実施し仮骨面積の計測を行った。(2)骨折後 14, 28 日に Villanueva bone 染色を実施し骨形態計測の各パラメーターについて計測を行った。(骨梁幅、骨量に対する類骨量、骨面に対する類骨面、類骨面に対する類骨量、類骨幅、骨面に対する吸収面、骨面に対する破骨細胞面、骨面に対する破骨細胞数、骨面に対する骨芽細胞面、骨面に対する骨芽細胞数、骨石灰化速度、類骨成熟時間、表面基準の骨形成速度、骨石灰化面、骨量に対する軟骨量、既存骨量に対する新生骨量、血管数および骨量に対する血管数について計測した。(3)骨折後 3, 7, 14, 21, 28 日にリアルタイム RT-PCR を施行し MIF、TNF- $\alpha$ 、cyclooxygenase (COX)-2、receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)、procollagen type I ( $\alpha$ 1)、procollagen type II ( $\alpha$ 1)、MMP-2、MMP-9、MMP-13、membranous type (MT) 1-MMP、VEGF、cathepsin (cts)K、tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) の遺伝子発現について検討した。内部コントロールとし Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

③8 週令 MIFKO および wild-type マウス (WT)

各 3 匹を用い、大腿骨および脛骨を摘出して骨髄細胞を採取し、24well plate 上で 28mM アスコルビン酸、10mM  $\beta$  グリセロリン酸および 2mM の L-グルタミン酸を含む培地で培養し骨芽細胞に分化誘導した。培養後 14, 21, 28 日目で von Kossa 染色を行い石灰化面積を定量した。④MIF の骨折局所投与による効果を調べるため、10 週齢 WT 雄 10 匹を用い右脛骨骨折を作製し、骨折局所にリコンビナント MIF5  $\mu$ g/PBS10  $\mu$ l を投与した群 5 匹 (MIF 群) と PBS10  $\mu$ l を投与した群 5 匹にわけ、骨折後 42 日目でマウスを屠殺し両側の脛骨を採取した。3 点曲げ力学試験を行い最大破断荷重および線形剛性を求め、対健側比を算出した。

統計学的比較には ANOVA および t-検定を用い、有意水準は 5%とした。

#### 4. 研究成果

##### 4-1 結果

①(1)破断様式：6 週および 12 週における偽関節は、それぞれ WT 群 2 例および 0 例、KO 群 3 例および 1 例において認められた。(2)術後 6 週：最大破断荷重は WT 群 63.2%および KO 群 47.6%、線形剛性は WT 群 96.3%および MK 群 55.5%であり、MK 群が有意に低値を示した (各  $p < 0.05$ )。 (3)術後 12 週：最大破断荷重は WT 群 77.6%および MK 群 66.7%、線形剛性は WT 群 92.7%および MK 群 97.5%であり、両群に有意差は認められなかった。

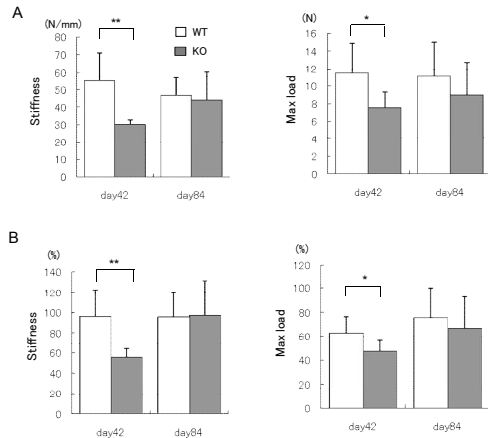


図 1. 骨折後 6 週 (42 日) および 12 週 (84 日) の WT および MIFKO 骨折仮骨の構造特性 (A)骨折側の曲げ stiffness および最大破断荷重。(B)曲げ stiffness および最大破断荷重の対健側比。Means  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n = 6-8$ /各群

②(1)軟 X 線撮影では、WT 群の仮骨面積に比べ KO 群の仮骨面積は小さく、骨折後 14 日に有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。

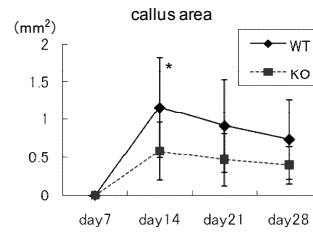


図 2. WT および MIFKO の仮骨面積 Mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ ,  $n = 9$ /各群

(2)骨形態計測では、類骨量/骨量、類骨量/類骨面、および類骨幅は骨折後 14, 28 日で KO 群が有意に高値を示し、骨石灰化速度、骨吸収面/骨面、破骨細胞数/骨面、および破骨細胞面/骨面は骨折後 14 日で KO 群が有意に低値を、類骨成熟時間は骨折後 28 日で KO 群が有意に高値を示した。すなわち KO 群では仮骨内の類骨石灰化が遅延していた。骨梁幅、骨芽細胞数/骨面、骨芽細胞面/骨面、軟骨量/骨量、および血管数/骨量は両群間で有意差を認めなかった。

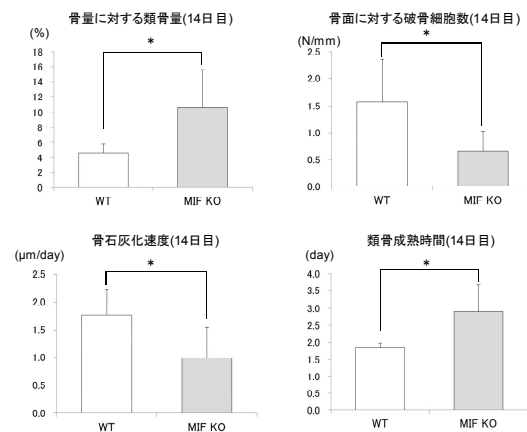


図 3. 骨折後 14 日における WT および MIFKO の骨形態計測パラメータ (類骨量/骨量、破骨細胞数/骨面、骨石灰化速度、類骨成熟時間を示す)。Means  $\pm$  SD, \* $p < 0.05$ ,  $n = 5$ /各群

(3)骨折後 21 日で MMP-2, MT1-MMP, カテプシン K、およびアルカリホスファターゼ mRNA の発現が KO 群で有意に低値を示した。

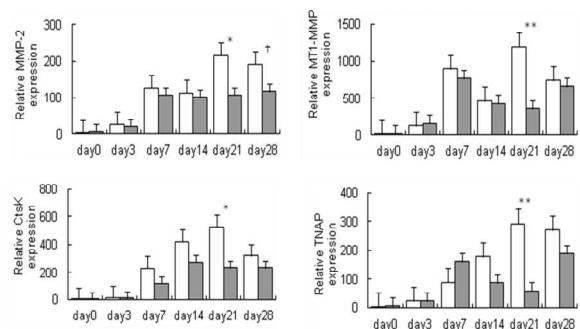


図4 リアルタイムPCR解析。WTおよびMIFKOより骨折後0, 3, 7, 14, 21, 28日目に採取した骨折部仮骨のMMP-2, MT1-MMP, CtsKおよびTNAPの相対的mRNAレベルを示す。Means ± SE. † p<0.05, \*p<0.005, \*\*p<0.0001, n=3/各群

③in-vitroでの石灰化面積は培養後14日目でWT群 0.90±0.23mm<sup>2</sup>、MIFKO群 0.97±0.74mm<sup>2</sup>、培養後21日目でWT群 1.15±0.84mm<sup>2</sup>、MIFKO群 8.46±15.51mm<sup>2</sup>、培養後28日目でWT群 29.24±5.82mm<sup>2</sup>、MIFKO群 25.66±2.64mm<sup>2</sup>となり、いずれも両群間に有意差を認めなかった。

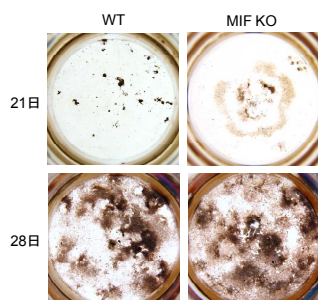


図5 von Kossa染色による骨髄細胞の石灰化

④骨折の非治癒例はMIF群で5匹中2匹、PBS群で5匹中1匹であった。残りを検討したところ、最大破断荷重および線形剛性の対健側比はMIF群で31.7%および38.7%、PBS群では48.1%および87.2%であった(p=0.31およびp=0.10)。統計学的有意差はないが、MIF群の方が力学強度が低い傾向にあった。

#### 4-2 考察

WTとKOの力学試験の結果より、骨折治癒過程において、MIFが何らかの役割を果たしていることが示唆された。KO群では破骨細胞数減少による線維状骨の骨吸収の遅延ならびに骨石灰化に関与する因子の遺伝子発現減少による類骨の石灰化の遅延によって、骨折治癒早期における仮骨の構造特性が低下する結果となったことが推察された。またこの類骨の石灰化速度の遅延に関し、in-vitroでの骨髄細胞の石灰化進行にWTとKOで差は認めなかった。しかしin-vitroとin-vivoでは外的環境が異なるため、MIFKO骨折で観察された類骨石灰化遅延が細胞活動の違いによると結論付けることはできない。また、骨折作製直後のMIF投与は骨折治癒を遅らせることが考えられ、炎症と骨折治癒との関係を考えて興味深い。本研究はMIFの骨折治癒に対する影響について検討した初めての研究であり、MIFは骨折治癒早期において重要な役割を担っている可能性を示し、骨折治癒

のメカニズムに関して新たな知見を提示した。

#### 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13件)

1. Kitamura N, Yasuda K, Ogawa M, Arakaki K, Kai S, Onodera S, Kurokawa T, Gong JP. Induction of spontaneous hyaline cartilage regeneration using a double-network gel: efficacy of a novel therapeutic strategy for an articular cartilage defect. *Am J Sports Med.* 39(6), 1160-1169, 2011 査読有
2. Imabuchi R, Ohmiya Y, Kwon HJ, Onodera S, Kitamura N, Kurokawa T, Gong JP, Yasuda K: Gene expression profile of the cartilage tissue spontaneously regenerated in vivo by using a novel double-network gel: Comparisons with the normal articular cartilage. *BMC Musculoskelet Disord* 12, 213, 2011 査読有
3. Yokota M, Yasuda K, Kitamura N, Arakaki K, Onodera S, Kurokawa T, Gong JP. Spontaneous hyaline cartilage regeneration can be induced in an osteochondral defect created in the femoral condyle using a novel double-network hydrogel. *BMC Musculoskelet Disord.* 12, 49, 2011 査読有
4. Kobayashi T, Onodera S, Kondo K, Tohyama H, Fujiki H, Yokoyama Y, Yasuda K. Impaired fracture healing in macrophage migration inhibitory factor-deficient mice. *Osteoporosis Int* 22(6), 1955-1965, 2011 査読有
5. Ohkawara T, Koyama Y, Onodera S, Takeda H, Kato M, Asaka M, Nishihira J. DNA vaccination targeting macrophage migration inhibitory factor prevents murine experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 95, 531-42, 2011 査読有
6. Arakaki K, Kitamura N, Kurokawa T, Onodera S, Kanaya F, Gong JP, Yasuda K. Joint immobilization inhibits spontaneous hyaline cartilage regeneration induced by a novel double-network gel implantation. *J Mater Sci Mater Med.* 93, 1160-1168, 2010 査読有

7. Kitayama S, Onodera S, Kondo K, Kobayashi T, Miyatake S, Kitamura N, Tohyama H, Yasuda K. Deficiency of Macrophage Migration Inhibitory Factor Gene Delays Healing of the Medial Collateral Ligament: A Biomechanical and Biological Study. *Journal of Biomechanics* 44, 494-500, 2010 査読有
8. Takahashi K, Onodera S, Tohyama H, Kwon HJ, Honma K, Yasuda K. *In vivo* Imaging of Particle-Induced Inflammation and Osteolysis in the Calvariae of NF $\kappa$ B/luciferase Transgenic Mice *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010 査読有
9. Yang JJ, Yong Mei C, Kurokawa T, Gong JP, Onodera S, Yasuda K. Gene expression, glycocalyx assay, and surface properties of human endothelial cells cultured on hydrogel matrix with sulfonic moiety: Effect of elasticity of hydrogel. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A* 95, 531-42, 2010 査読有
10. Inoue M, Tokuyasu S, Kuwahara S, Yasojima N, Kasahara Y, Kondo E, Onodera S, Yasuda K. Tunnel location in transparent 3-dimensional CT in anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction with the trans-tibial tunnel technique. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18, 176-83, 2010 査読有
11. Uo M, Watari F, Asakura K, Katayama N, Onodera S, Tohyama H, Hamada K, Ohnuki S. Analysis of Wear Debris from the Metal-on-metal Hip Joint. *Nano Biomedicine* 1, 133-136, 2009 査読有
12. Miyatake S, Onodera S, Sano T, Katoh S, Ikata T. Enhanced immunoreactivity for basic fibroblast growth factor (FGF2) in the adult rat spinal cord in experimental syringomyelia. *Nano Biomedicine* 1(2), 167-175, 2009 査読有
13. Hamasaka A, Abe R, Koyama Y, Yoshioka N, Fujita Y, Hoshina D, Sasaki M, Hirasawa T, Onodera S, Ohshima S, Leng L, Bucala R, Nishihira J, Shimizu T, Shimizu H. DNA vaccination against macrophage migration inhibitory factor improves atopic dermatitis in murine models. *J Allergy Clin Immunol.*

124(1):90-99. 2009 査読有

[学会発表] (計4件)

1. 小林 巧, 小野寺伸, 遠山晴一, 近藤英司, 安田和則: マクロファージ遊走阻止因子遺伝子の欠損が骨折治癒に与える効果. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会オステオポロシスセミナー, 2011年10月21日, 前橋市 (ベイシア文化ホール)
2. Onodera S, Tohyama H, Honma K, Yasuda K: *In vivo* Imaging of Particle-Induced Inflammation and Osteolysis in the Calvariae of NF $\kappa$ B/luciferase Transgenic Mice. ORTHOPAEDIC RESEARCH SOCIETY 58th Annual Meeting, New Orleans, USA, 2010
3. Onodera S: Role of MIF on the bone turnover and remodelling. International symposium of MIF, Sapporo (Hokkaido Information University Sapporo Satellite), Japan, 2009
4. Onodera S, Koyama Y, Nishihira J, Abe R, Tohyama H, Yasuda K: Development of a novel DNA vaccine targeting macrophage migration inhibitory factor and its efficacy on murine models of inflammatory diseases. The 2nd Annual Protein and Peptide Conference (PepCon-2009), Seoul, Korea, 2009

[図書] (計1件)

小野寺伸: 人工関節摩耗粉の生体影響と課題、78-83 (亘理文夫監修: ナノ材料のリスク評価と安全性対策、フロンティア出版、東京) 2010

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野寺 伸 (ONODERA SHIN)

北海道大学・大学院医学研究科・客員准教授  
研究者番号: 00359481

### (2) 研究分担者

遠山 晴一 (TOHYAMA HARUKAZU)

北海道大学・北海道大学病院・准教授  
研究者番号: 60301884

安田 和則 (YASUDA KAZUNORI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 20166507

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号: