

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：82404

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03298

研究課題名（和文）感覚神経-骨組織連関に着目した廃用性骨萎縮の病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathophysiology of disuse osteoporosis with a focus on the interaction between sensory nerves and bone tissue.

研究代表者

越智 広樹 (Ochi, Hiroki)

国立障害者リハビリテーションセンター（研究所）・研究所 運動機能系障害研究部・研究員

研究者番号：30582283

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、感覚神経と骨芽細胞のネットワークに着目し、神経障害で認められる廃用性骨萎縮の病態解明を目的として研究を実施した。神経障害モデルでは、骨内神経が有意に減少することならびに、骨芽細胞による骨形成能の低下を介した骨量減少が引き起こされることを明らかにした。さらに、感覚神経末梢伝達物質を持続的に投与すると、神経障害で認められる骨量減少が軽減された。以上の結果から、廃用性骨萎縮の病態には骨組織内の感覚神経の減少が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経障害患者では、神経障害による骨代謝変化に加え、不動・非荷重による廃用が原因となり著しい骨量減少が生じる。骨量減少に続発する骨折は、リハビリテーション介入において極めて大きな障害となり、効果的な神経機能回復を阻む要因となるだけでなく、寝たきり状態へ移行することで死亡率を高めることが社会的問題となっている。そのため、非荷重が導く骨代謝異常のメカニズム解明ならびに骨形成を特異的に促進する効果的な治療方法の開発は、喫緊の課題である。本研究の成果は、神経障害に伴う廃用性骨萎縮の病態解明に大いに貢献し、将来的には神経に着目した新たな治療薬の開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the pathophysiology of disuse osteoporosis induced by neurologic disorders with a focus on the interaction between sensory nerves and osteoblasts. In a nerve ablation model, nerve fibers inside the bones exhibited remarkably reduced. The histomorphometric analysis revealed that nerve ablation significantly decreased the bone volume via the reduction of osteoblast activities. Furthermore, continuous administration of peripheral sensory neurotransmitters substantially rescued the bone loss induced by nerve ablation. These results suggest that reduced sensory nerve innervation in bone contributes to involvement in the pathogenesis of disuse osteoporosis.

研究分野：骨代謝

キーワード：感覚神経 廃用性骨萎縮

1. 研究開始当初の背景

中枢神経障害患者では、神経障害による骨代謝変化に加え、不動・非荷重による廃用が原因となり著しい骨量減少が生じる。骨量減少に続発する骨折は、リハビリテーション介入において極めて大きな障害となり、効果的な神経機能回復を阻む要因となるだけでなく、寝たきり状態へ移行することで死亡率を高めることが社会的問題となっている。そのため、非荷重が導く骨代謝異常のメカニズム解明ならびに骨形成を特異的に促進する効果的な治療方法の開発は、骨代謝疾患に対する治療のみならず、リハビリテーションの効果を促進するためにも喫緊の課題である。申請者らは、発生期における骨組織内への感覚神経の正常な侵入が、生理的な骨量維持に重要であることを世界に先駆けて報告した(越智ら *Nature* 2013)。骨組織の感覚神経は、不動性骨量減少の病態発生においても極めて重要な役割を担っていることが考えられるが、詳細なメカニズムは依然不明である。一方、これまでに骨代謝細胞である破骨細胞、骨芽細胞および骨細胞に関連する研究を進めてきた申請者らは、予備的検討において、骨芽細胞培養上清を用いて神経細胞を培養すると、神経突起の伸長が促進されることが明らかとなった。このことは、骨から神経へのフィードバック機構を解明する上で重要な候補分泌因子が存在する可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では感覚神経-骨芽細胞ネットワークに着目した骨・神経の恒常性維持機構の解明をするとともに、廃用性骨萎縮の発生機構を新たな視点から明らかにすることを目的とした。さらには、骨組織から神経系へのフィードバック機構の生理的意義の解明に基づき、骨代謝・神経再生をとともに促進する新規治療薬開発の分子基盤構築を目指し研究を実施した。

3. 研究の方法

1) 神経障害モデルならびに廃用性骨萎縮モデルにおける骨内神経の3次元解析

骨透明化技術を用いて、神経障害モデルならびに廃用性骨萎縮モデルにおける骨内神経の変化を、3次元的に解析を行った。

2) 神経障害モデルにおける骨組織解析

神経障害が骨組織におよぼす影響を放射線学的、組織学的に解析を行った。

3) 神経障害モデルにおける感覚神経伝達物質投与が骨代謝に及ぼす影響の検討

神経障害モデルに対し、感覚神経末梢から分泌される物質を持続的に投与し、骨代謝に及ぼす影響を、放射線学的ならびに組織学的に解析した。加えて、*in vitro* において骨芽細胞における作用機序を検討した。

4) 骨芽細胞に由来する神経調節因子の同定と機能解析

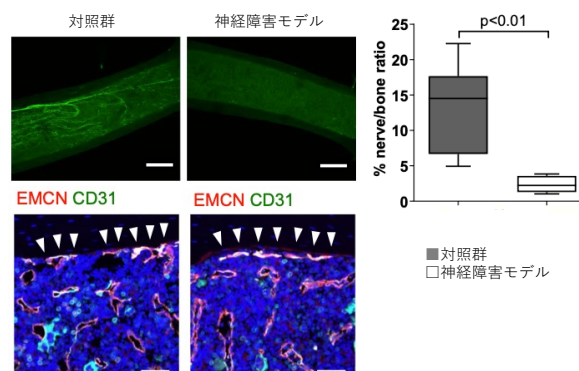
骨芽細胞の網羅的遺伝子発現解析の結果に基づき、神経の機能を調節する因子を同定するとともに、その機能解析を *in vitro* において実施した。

4. 研究成果

1) 廃用性骨萎縮モデルにおける骨内神経変化の3次元解析

これまでに我々が開発した、骨透明化技術を用いて、廃用性骨萎縮モデルにおける骨内神経の変化を3次元的に解析した。廃用性骨萎縮モデルとして、従来から用いられている尾懸垂モデルならびに、我々が独自に開発した神経傷害モデルを用いた。両モデルともに、有意な骨量減少が認められた。透明化技術による骨内神経の観察では、両群ともに骨内神経の有意な減少が認められた。一方で、血管系への影響は認められなかった(図1)。以上のことから、廃用性骨萎縮における骨量減少の病態に、骨内感覚神経の減少が関与している可能性が示唆された。

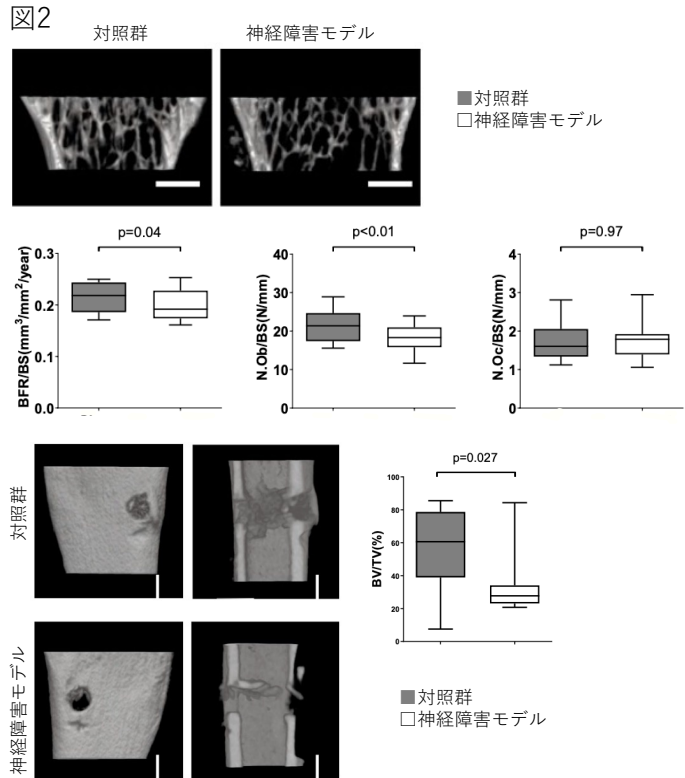
図1



2) 神経障害モデルにおける骨組織解析

我々が独自で開発した神経傷害モデルにおいて、骨量減少の詳細なメカニズムを解明するために、骨形態計測による組織学的解析を行った。本モデルでは、骨形成能ならびに骨芽細胞数において対照群と比較して有意な減少を示すことが明らかとなった。一方、破骨細胞系のマーカーに関して変化は認められなかった。以上のことから、神経障害モデルでは、骨芽細胞による骨形成の低下に伴う骨量減少が生じることが明らかとなった(図2)。

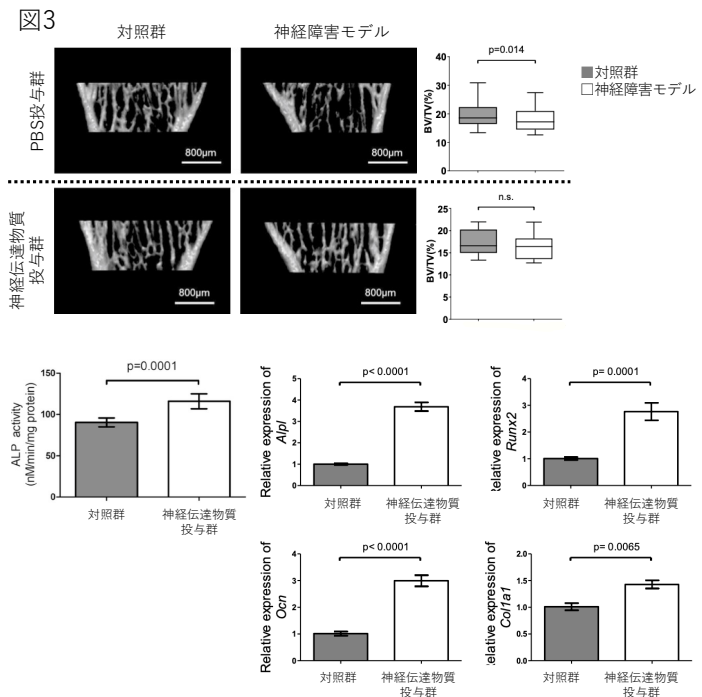
さらに、神経障害が、骨再生に及ぼす影響を検討した。神経モデルにおいて脛骨骨幹部に外科的に穴を開け、9日後にマイクロCT解析により皮質骨の再生を解析した。その結果、神経障害モデルでは、骨の修復が有意に低下していることが明らかとなり、骨内神経は骨再生においても重要であることが示唆された(図2)。



3) 神経障害モデルにおける感覚神経伝達物質投与が骨代謝に及ぼす影響の検討

骨内感覚神経が骨の恒常性維持に重要であるということを検証するために、神経障害モデルにおいて浸透圧ポンプを用いて感覚神経伝達物質またはPBSを4週間連続投与した。PBS投与群では、神経障害群と対照群を比較した結果、骨量(BV/TV)および海綿骨数(Tb.N)が有意に減少した。一方、神経伝達物質投与群では、神経障害群と対照群とではどのパラメータにも有意差は確認されなかった。以上のことから、神経障害モデルで認められた骨量減少は、感覚神経伝達物質の持続投与によって実質的に救済されたことから、骨内部の感覚神経から分泌される伝達物質自体が骨リモデリングに寄与している可能性が示唆された。

続いて、感覚神経伝達物質の骨芽細胞における機能を検討するために *in vitro* において添加実験を行った。骨芽細胞には、神経伝達物質の受容体が発現していることを確認した。骨芽細胞の活性および分化に対する神経伝達物質の影響を評価するために、骨芽細胞分化中の初代骨芽細胞の培養液に生理的な量の神経伝達物質を添加した。4日間の骨形成誘導期間後、アルカリホスファターゼ活性測定したところ、アルカリホスファターゼ活性は神経伝達物質の添加によって上昇した。また、リアルタイムPCR法により、骨形成誘導2日後の神経伝達物質処理骨芽細胞において、Alp1、Runx2、Ocn、Col1a1などの骨形成マーカーの遺伝子発現レベルが上昇していることが示された(図3)。



4) 骨芽細胞に由来する神経調節因子の同定と機能解析

これまで多くの研究成果から、骨は多くの環境因子（ホルモンやサイトカインなど）による調節を受けていることが明らかとなっており、これらをターゲットとした製薬開発も実現している。さらには、近年の分子生物学的技術の発展により、臓器連関が注目される中、我々のグループも含め、神経による骨代謝調節機構が注目され、徐々に知見が蓄積されている。一方近年では、長らく静的な臓器として認識されていた骨が、自らホルモンを分泌することで、全身臓器の恒常性を調節していることも明らかになりつつある。しかしながら、骨から神経へのフィードバック機構に関しては、その存在が推測されているもののその本態は未だ不明である。

我々は予備的研究において、骨芽細胞培養上清を用いて神経細胞を培養した結果、神経突起の伸長を促進することを見出したことから、骨芽細胞による神経調節因子の探索を実施した。成熟骨芽細胞の網羅的遺伝子発現解析によって、神経突起の伸長に関与する因子 X を候補遺伝子として同定した。まず、因子 X の骨芽細胞分化に及ぼす影響を *in vitro* において検討した。加えて、組織における発現についても、生理的条件ならびに不動化状態において検討した。現在神経に対する因子 X の影響ならびに *in vivo* における影響を検討中である。

以上の内容の一部をまとめて論文の作成中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe-Takano Haruko, Ochi Hiroki, Chiba Ayano, Matsuo Ayaka, Kanai Yugo, Fukuhara Shigetomo, Ito Naoki, Sako Keisuke, Miyazaki Takahiro, Tainaka Kazuki, Harada Ichiro, Sato Shingo, Sawada Yasuhiro, Minamino Naoto, Takeda Shu, Ueda Hiroki R., Yasoda Akihiro, Mochizuki Naoki	4. 巻 36
2. 論文標題 Mechanical load regulates bone growth via periosteal Osteocrin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109380 ~ 109380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muroi Norihiro, Ochi Hiroki, Shimada Masakazu, Asou Yoshinori, Hara Yasushi	4. 巻 16
2. 論文標題 Effects of long-term plate fixation with different fixation modes on the radial cortical bone in dogs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0247410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Utagawa Kurando, Shin Takaei, Yamada Hironori, Ochi Hiroki, Sunamura Satoko, Unno Aiko, Akazawa Chihiro, Ema Masatsugu, Takeda Shu, Okawa Atsushi, Sato Shingo	4. 巻 13
2. 論文標題 Three-dimensional visualization of neural networks inside bone by Osteo-DISCO protocol and alteration of bone remodeling by surgical nerve ablation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-30492-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	佐藤 信吾 (Sato Shingo) (40462220)	東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・講師 (12602)	

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