

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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22650126

研究課題名（和文）

脊髄損傷モデルマウスにおける実験的異所性骨化の成因と病態の研究

研究課題名（英文）

Etiology and pathophysiology of experimental heterotopic ossification in the spinal cord injury model mouse

研究代表者

河村 守雄 (KAWAMURA MORIO)

名古屋大学・医学系研究科（保健）・教授

研究者番号：30186150

研究成果の概要（和文）：異所性骨化の病態究明のために、脊髄損傷モデル動物と骨形成因子を用いて、骨化の状況を調べた。脊髄損傷モデルマウスでは非損傷マウス群に比べ、有意に旺盛な新生骨形成を示した。完全脊髄損傷群と不全損傷群の間では、新生骨形成の差はなかった。脊髄損傷モデルマウスに膝関節屈伸の他動的強制運動を課したところ、強度負荷群は非負荷群に比べ有意に旺盛な新生骨形成を示した。強度負荷群と軽度負荷群の間、軽度負荷群と非負荷群の間にはいずれも有意差はなかった。病理組織学的検討では、骨形成因子移植後早期に移植部周辺に旺盛な炎症反応が認められた。実験的異所性骨化の病態には、脊髄麻痺、強制運動負荷、炎症反応が関与していることが明らかになり、臨床と基礎の橋渡しの研究として有用であった。

研究成果の概要（英文）：For the purpose of clarification of patho-physiology of heterotopic ossification, we investigated the state of new bone formation, which was induced by bone morphogenetic protein, in the spinal cord injury model mouse. In the spinal cord injury mouse group, the more significant new bone formation was recognized than in the no injury mouse group. There was no difference in new bone formation between the complete and incomplete spinal cord injury mouse group. When we imposed passive enforced flexion and extension movement on the knee joint of spinal cord injury mouse, the heavy enforcement group showed more volume of new bone formation than no passive movement group. There was no difference of new bone formation between heavy and light enforcement group. And also there was no difference of new bone formation between light enforcement group and no passive movement group. In the patho-histological study, the dense inflammatory reaction was recognized around the bone morphogenetic protein powder in the early phase of implantation. It was suggested the spinal cord injury, enforced passive movement and inflammatory reaction influenced on the etiology of heterotopic ossification.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 ・ リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：異所性骨化、骨形成因子、脊髄損傷、動物モデル

1. 研究開始当初の背景

異所性骨化については脳血管障害、脊髄損傷、ポリオなどの麻痺性疾患や人工股関節術後などに発症することが臨床において多数報告されて来た。発生原因として外傷後の猛撃的 he 動運動、局所感染、浮腫・鬱血など局所循環・代謝障害などとの関連が指摘されている。しかし未だに発生機序、病態などについて不明な点が多い。その理由として、臨床においては、病理組織のサンプリングの困難さや、基礎実験では方法論の困難さが挙げられる。これらのことから、発生の予防法や発生後の治療法は全く確立されていない。そのため、リハビリテーションを進めるうえで障壁となり、障害を有する人々に大きな苦痛をもたらしている。したがって、リハビリテーション医学領域においては異所性骨化の病態を明らかにし、その予防法・治療法を確立することが急務とされる。

一方骨形成因子 **bone morphogenetic protein** (以下 **BMP**) による異所性骨化モデルは、病理学的には化骨性筋炎に見られる内軟骨骨化の像と一致しており、また移植用量依存性に新生骨が形成されることから、このモデルを動物に用いることにより上記の問題点を明らかにすることが可能になると考えられる。

われわれのこれまでの研究では、この異所性骨化モデルにおいて関節拘縮に he 動運動を猛劇的に負荷すると旺盛な新生骨が形成されること、関節固定より自由運動させたマウスで新生骨形成が抑制されること、**BMP** 移植早期に関節運動を負荷するとより旺盛な新生骨が形成されること、**BMP** 移植部に中程度から強度の超音波を照射すると新生骨形成が抑制されることなどが判明して来ている。さらに、脊髄損傷モデルマウスにおいて、非損傷マウスより旺盛な新生骨が形成されることが予備的実験で明らかになって来た。臨床において脊髄損傷患者の麻痺肢関節周辺にしばしば異所性骨化が発症すること、またそれが関節運動の程度に影響を受けること、つまり過度の運動が骨化を誘導・促進し、逆に適度の運動が骨化を抑制するとい

う事実が経験的に推測されている。

以上のことから、臨床での知見を基礎的実験において証明することが、異所性骨化の病態解明さらには予防法の開発に繋がると予測された。

2. 研究の目的

骨サイトカインの一つである **BMP** をマウスの筋肉内に移植することにより実験的異所性骨化の動物モデルが作成される。この骨化現象の病理学的所見は内軟骨性骨化過程を示しており、人体に見られる異所性骨化や化骨性筋炎の病理所見と一致する。臨床的には外傷後の猛撃的 he 動運動後や脳卒中や脊髄損傷などの麻痺肢の大関節周辺部に異所性骨化・化骨性筋炎が生じやすいことが知られており、これまでのわれわれの研究においても上記実験的異所性骨化動物モデルで関節に不動化を行ったうえ強制 he 動運動を負荷すると、異所性骨化による新生骨形成量が多いことが判明している。また、**BMP** 移植後の運動負荷時期が新生骨形成量に影響することも判明している。このように、動物実験モデルにより、リハビリテーションにおいて機能回復の障害になる異所性骨化の病態が徐々に明らかになってきた。

そのような状況の中で、今回われわれは異所性骨化という病態が臨床で脊髄損傷患者においてしばしば発生するという事実に着目した。すなわち、脊髄損傷患者に強度の関節運動を負荷すると異所性骨化を起こしやすいとする経験的事実と、一方で適度の運動療法は脊髄損傷における異所性骨化の発生を予防するという報告があり、こうした相反する事象を動物実験において事実究明する必要が生じた。そこで上記実験的異所性骨化動物モデルにおいて脊髄損傷を起こした時に、関節周辺部の異所性新生骨形成にどのような影響が見られるかを検討することとし、以下の点について明らかにすることを目的とした。

1) マウスにおいて、胸椎レベルの脊髄損傷で対麻痺を人為的に作成したうえ **BMP** 筋肉内移植を行い、異所性骨化を実験的に作成し、損傷群と非損傷群の間で新生骨形成量に差が生じるか否か。

- 2) 脊髄損傷群の中で、麻痺の程度すなわち完全脊髄損傷と不全脊髄損傷群の間で新生骨形成量に差が生じるか否か。
- 3) 脊髄損傷群に他動的運動負荷を加えた時に新生骨形成量に影響が出現するか否か。
- 4) 上記において、他動運動負荷量が新生骨形成量に影響をおよぼすか否か。
- 5) BMP移植下において、移植部およびその周辺にどのような病理組織学的変化が認められるか。とくに移植早期における炎症反応の発現の有無と、筋細胞の脱分化状況はどうか。すなわち、BMPの移植による実験的異所性骨化のこれまでの検討では、新生骨形成に至るまでにBMP移植部位周辺にマクロファージやリンパ球など強い炎症細胞と筋細胞の脱分化が現れることがわかっていたため、BMP移植早期の炎症反応が異所性骨化に大きく影響をおよぼしているかを検討することとした。

3. 研究の方法

- 1) 粗製BMPの抽出と精製、および生物学的活性の確認：約10kgの若年豚長管骨皮質をstarting materialとし、4モル・グアニジウム塩酸もしくは尿素を用いて本実験に用いる粗製BMPを抽出・精製した。上記の準備は愛知学院大学歯学部歯科理工学教室の協力を得て行った。凍結乾燥されたBMP powderをddYマウス後肢筋膜下に移植し、3週後に異所性骨化が誘導されることをsoftex撮影下に確認した。また、BMP移植量を変え、新生骨形成量が用量依存性であることを新生骨灰分重量測定により確認した。これら生物学的活性の確認によりBMPが以下の研究に使用可能か否かを決定した。
- 2) 脊髄損傷モデルマウスの作成：雄性・6週齢ddYマウスの第8胸椎を椎弓切除し、現れた脊髄に対しweight drop方式により、完全脊髄損傷または不完全脊髄損傷（対麻痺）を惹起させる。一方、非損傷群をコントロール群として作成した。
- 3) 脊髄損傷作成後1週間にわたり麻痺の改善状況を確認後、粗製BMPを、両群のマウス後肢筋膜下に移植した。移植3週間後にサンプリングし、Softex X-Pにて新生骨形成状況をj確認後、骨化部の灰分重量を測定し、新生骨形成量を比較検討した。

- 4) 他動運動負荷の影響：上記と同様の方法で脊髄損傷マウスモデルを作成し、さらに他動運動を負荷して、新生骨形成量を調べた。他動運動はBMP移植後持続的他動運動装置（continuous passive movement、以下CPM）を用いて実施し、マウスの膝関節に約60°の膝関節屈伸運動を毎秒1回、20分間、週6回、3週間継続して負荷した群（CPM-1群）と約30°で毎秒0.5回、10分間、週3回、3週間継続した群（CPM-2群）および他動運動非負荷群の3群を作成した。3群間の新生骨形成量を灰分重量で体重あたりに換算し、一元配置分散分析にて統計学的検討を行った。CPM-1群については移植後3、5、7、14日目の病理組織学的検討を行った。
- 5) BMP移植下における炎症反応の出現とその影響：BMPを5mgずつゼラチン・カプセルに詰め、ddYマウスの大legハムストリングスの筋膜下に移植した。BMP移植後、3、5、7、10、14日目に移植部周辺の軟部組織をサンプリングし、ホルマリン固定した。それぞれヘマトキシリン・エオジンおよびトルイジンブルー染色ならびに、抗MyoD1抗体染色、抗IL-1 β 抗体染色、抗IL-6抗体染色、抗TNF- α 抗体による免疫染色を行い検討した。

4. 研究成果

- 1) 脊髄損傷モデルマウスの新生骨形成量：新生骨形成量（平均値±標準偏差）は麻痺群 $6.2 \pm 2.7 \text{mg}$ (n=73)、コントロール群 $4.3 \pm 0.8 \text{mg}$ (n=7) となり、対応のないt検定の結果で、統計学的有意差が認められた(p<0.01)。
- 2) 脊髄損傷による麻痺の程度と新生骨形成量について：新生骨形成量（平均値±標準偏差）は完全麻痺群 $6.7 \pm 1.5 \text{mg}$ (n=8)、不全麻痺群 $6.1 \pm 2.9 \text{mg}$ (n=65)、コントロール群は $4.3 \pm 0.8 \text{mg}$ (n=7) となった。一元配置分散分析の結果は、危険率18%となり統計学的有意差は認められなかった。麻痺の評価と骨形成量に対する直線回帰分析の結果は、危険率38%、相関係数は-0.10、回帰式は $y = -0.08x + 6.35$ 、となり統計学的有意差は認められなかった。
- 3) 脊髄損傷群に対する他動的運動負荷の新生骨形成量への影響：新生骨形成量（平均値±標準偏差）は CMP-1 群 $0.21 \pm$

0.07mg(n=11)、CMP-2 群 0.18±0.03mg (n=12)、コントロール群 0.15±0.04mg (n=11)であった。3群間での一元配置分散分析の結果、危険率3.8%でTukey法により、CMP-1群とコントロール群の間で危険率5%の有意差がみられた。

病理組織学的検討では、3日目の組織においてBMP近傍に存在する筋細胞の間に炎症細胞が浸潤し、筋細胞の正常形態喪失が認められた。5日目の細胞ではアルシアンブルー染色で軟骨基質の形成が認められ、MyoD1陽性の筋芽細胞の核を確認できた。7日目の組織では広範囲に軟骨形成が進行していることが確認できた。14日目ではカルシウムに特異的であるフォン・コッサ染色とアリザリンレッドS染色陽性の内軟骨骨化が確認できた。

4) BMP移植下における炎症反応の出現とその影響: 移植後3日目、5日目の組織像では、BMP周辺にマクロファージ、リンパ球、未分化間葉系細胞が広がり、明らかな炎症反応が見られた(図1-1,1-2)。また、炎症局所において、IL-1 β 、IL-6、TNF- α のいずれも発現していた(図2-1~3)。未分化な筋細胞の核が染まる抗MyoD1抗体染色により、炎症局所周圍の筋細胞が脱分化している様子も観察された。移植後7日目においても、炎症反応が持続しており、炎症局所において、IL-1 β 、IL-6、TNF- α のいずれも発現していた。また、筋細胞の核が中心化している様子も見られ、3日目、5日目と同様、筋細胞が脱分化していた。移植後10日目では、炎症反応はやや収まり、軟骨の形成が見られた(図5-1)。また、軟骨内にIL-6、TNF- α が発現していた。移植後14日目では、軟骨の形成がさらに明らかに見られた(図6-1)。また、10日目と同様、軟骨内にIL-6、TNF- α の発現が見られた。

以上より、本研究によって得られた成果として以下のことが挙げられる。

- 1) マウスにおけるBMP移植による実験的異所性骨化(新生骨形成)は、脊髄損傷によって有意に促進される。
- 2) 完全麻痺、不全麻痺の麻痺の程度によっては、新生骨形成に差は出ない。
- 3) 脊髄損傷モデルマウスに強制的な他動運動を強度に負荷すると新生骨形成が促進さ

れる。

4) 単純なBMP移植においては、移植早期から、旺盛な炎症細胞の浸潤と、成熟筋組織の脱分化がみられ、炎症反応と異所性骨化に何らかの関係がある。

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2件)

- 1) 脊髄損傷モデルマウスにおける麻痺の程度と骨形成量について-peak-out現象への対応-: 村瀬数馬、河村守雄; 名古屋大学医学部保健学科理学療法学専攻学士論文集、査読無、第9巻、2010、1-8.
- 2) 脊髄損傷モデルマウスに対する他動運動が実験的異所性骨化に及ぼす影響: 村瀬一馬、河村守雄; 名古屋大学大学院医学系研究科リハビリテーション療法学専攻修士論文、査読無、2012、1-14.

[学会発表] (計2件)

- 1) 村瀬数馬(代表)、河村守雄、勝水健吾、脊髄損傷モデルマウスにおける麻痺の程度と異所性骨化による骨形成量、第45回日本理学療法士会学術集会、2012年5月27日、岐阜市
- 2) K. Murase and M. Kawamura, The effect of passive movement on heterotopic ossification in experimental model mice of spinal cord injury、2011 Yonsei-Nagoya University Research Exchange Meetings、2011年11月1日、韓国原州市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 守雄 (KAWAMURA MORIO)
名古屋大学・医学系研究科 (保健)・教授
研究者番号：30186150

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし