

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791641

研究課題名(和文) Parathyroid hormone の難治性骨折・骨癒合不全治療への応用

研究課題名(英文) Application of parathyroid hormone to treatment of intractable fractures and nonunions

研究代表者

新倉 隆宏 (Niikura, Takahiro)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・特命講師

研究者番号：40448171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症治療薬PTH 1-34には骨形成作用があり、これを骨折治癒促進に応用できると仮説を立て、検討した。まず、骨折患者の骨折部血腫から分離した細胞に対するPTH 1-34の作用を調べたところ、増殖に有意な作用はなく、骨・軟骨分化には抑制的に作用した。骨折後早期にPTH 1-34を投与しても促進的効果が得られない可能性が示唆された。さらに、ラットの骨折部骨膜を焼灼することで骨折治癒が得られなくしたモデルにPTH 1-34の局所投与および全身投与を行い、その影響を調べた。局所投与は無効であるが全身投与では治癒促進の傾向がみられ、投与形態は骨粗鬆症治療と同様に全身投与が適切であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Parathyroid hormone (PTH) 1-34 has capacity of enhancing bone formation. We hypothesized that the osteogenic capacity can be applied to enhance fracture healing. First, we investigated the effect of PTH treatment on human fracture haematoma-derived cells in vitro. PTH treatment did not affect cell proliferation. Osteogenic activity was also not significantly affected by continuous PTH treatment but significantly inhibited by pulsatile PTH treatment. Conversely, chondrogenic differentiation was significantly inhibited by continuous PTH treatment. Next, we conducted in vivo experiments. A rat fracture model which leads to nonunion by cauterization of periosteum was used. PTH was given to the rats by local and systemic administration. Although the local administration revealed no effect, the systemic administration demonstrated a tendency to enhance fracture healing. Our results suggested that a systemic administration was an appropriate way for a use of PTH to enhance fracture healing.

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：骨折治療 難治性骨折 骨癒合不全 骨癒合促進

### 1. 研究開始当初の背景

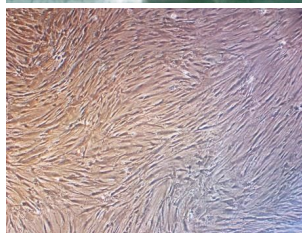
骨折治癒促進という課題には、難治骨折をなんとか治癒に導くこと、さらに、骨折を早く治癒させることという意義があり、これが達成されれば患者が被る恩恵は大きなものとなる。しかし、日本の実臨床現場において骨折治癒促進目的で使用可能なものは超音波骨折治療法、骨折電気刺激療法しかなく、その効果も限定的である。そのため、新たな骨折治癒促進法の開発が切望されている。われわれは、骨粗鬆症治療薬 PTH 1-34 (副甲状腺ホルモン製剤、テリパラチド) に注目した。多くの骨粗鬆症治療薬の主な薬理作用が骨吸収抑制であるのに対し、PTH 1-34 には積極的な骨形成作用があることが薬理作用の特徴である。われわれは、この PTH 1-34 の持つ骨形成作用が骨折治癒にも有利に、促進的に作用すると仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、PTH 1-34 を骨折治癒促進剤として応用できるという仮説を検証することである。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト骨折血腫細胞の骨・軟骨分化誘導に及ぼす PTH 1-34 の作用の生物学的検討



対象は骨折患者 7 例で、骨折を整復固定する手術中に、骨折部に形成された血腫を採取した。この血腫という組織を培養液中で細切し静置しておくことで組織から遊走し接着した線維芽細胞様細胞を得て、これをヒト骨折血腫細胞として培養した。

上図：骨折血腫を培養液中に浸したところ

下図：増殖したヒト骨折血腫細胞

PTH 1-34 非投与群：PTH(-)、PTH 1-34 連続投与群：PTH-C、PTH 1-34 間欠投与群：PTH-P の 3 群に分けて骨分化誘導を行い、骨分化能を比較検討した。また、培養 8 日目までの細胞増殖能を検討した。さらに PTH 1-34 非投与群：PTH(-)、PTH 1-34 連続投与群：PTH-C の 2 群でペレット培養という 3 次元培養を用いて軟骨分化誘導を行い、軟骨分化能を比較検討した。これらの群とともに、骨・軟骨分化誘導を行わない通常の維持培地で培養した GM (Growth Medium) 群も作成し、比較検討した。

細胞増殖の評価には MTS assay を用いた。

骨分化能の評価においては、Alkaline phosphatase (ALP) 活性、Real-time PCR での Runx 2・ALP・osteopontin の発現量、Alizarin red 染色を検討した。ALP・osteopontin は骨芽細胞が分泌する蛋白であり、骨芽細胞分化の指標となる。Runx 2 は骨芽細胞分化に必須の転写因子である。Alizarin red 染色は石灰化を評価できる染色法である。

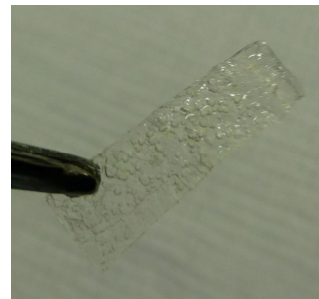
軟骨分化能については、Safranin-O による染色および real-time PCR による collagen-II・collagen-X の発現評価を行った。Safranin-O 染色は軟骨基質を染色する代表的な染色法である。collagen-II・collagen-X はいずれも軟骨細胞が産生する代表的な蛋白であり、特に、collagen-II は増殖軟骨細胞が、collagen-X は肥大軟骨細胞が産生するもので、これらは代表的な軟骨分化マーカーである。

(2) ラット難治性骨折モデルの骨癒合を PTH 1-34 が促進するかの検討

ラット難治性骨折モデルの骨癒合を PTH 1-34 が促進するかの検討を、局所投与および全身投与において行った。ラット難治性骨折モデルは、キルシュナー鋼線で髓内釘固定した大腿骨骨折を作成後、骨折部局所を展開し、骨折治癒に重要な骨膜を焼灼することで骨癒合が得られないようにして作成した。

ラット難治性骨折モデルの骨癒合を PTH 1-34 局所投与が促進するかの検討

PTH 1-34 を含浸させた、徐放能を有するゼラチンハイドロゲルを骨折部に外科的に埋め込み、骨折治癒促進作用があるかを検討した。単純 X 線写真、マイクロ CT による X 線学的骨癒合評価、組織切片の観察による組織学的評価を行った。



左図：PTH 1-34 を含浸させたゼラチンハイドロゲル

右図：これを骨折部に外科的に埋め込んでいるところ

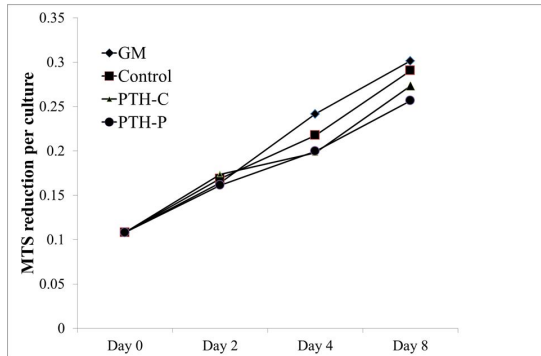
ラット難治性骨折モデルの骨癒合を PTH 1-34 全身投与が促進するかの検討

PTH 1-34 全身投与においては、一回当たりの投与量として 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  および 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を設定し、これらを週 3 回、腹腔内投与した。評価項目は局所投与時と同様で、単純 X 線写真、マイクロ CT による X 線学的骨癒合評価、組織切片の観察による組織学的評価を行っ

た。

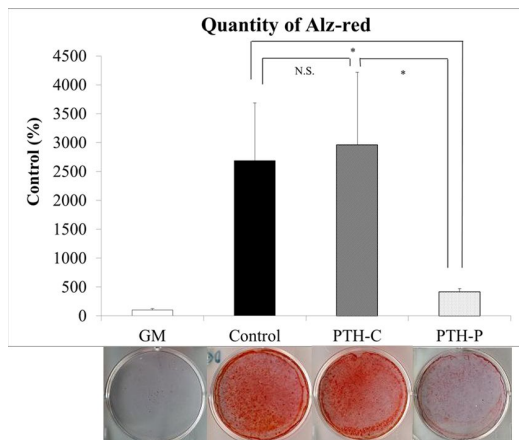
#### 4. 研究成果

(1) ヒト骨折血腫細胞の骨・軟骨分化誘導に及ぼす PTH 1-34 の作用の生物学的検討  
細胞増殖には PTH 1-34 の有意な影響を認めなかった。



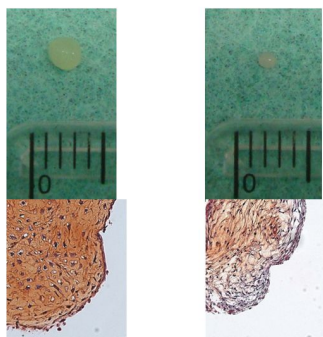
細胞増殖能比較の結果。PTH 1-34 の有意な影響なし。

骨分化能は、PTH(-)群に比べ、PTH-C 群では有意な差を認めなかったが、PTH-P 群においては抑制されていた。



Alizarin red 染色の結果。赤色が濃いほど、石灰化が起きていることを示す。

軟骨分化能は、PTH(-)群に比べ、PTH-C 群では有意に抑制されていた。



左が PTH(-)群、右が PTH-C 群。上図は出来た

軟骨組織の大きさを比較している。下図では軟骨基質の染色性の比較を行っている。

ヒト骨折血腫細胞に対する PTH 1-34 連続投与の効果は、骨分化と増殖能に関して有意な作用を与えず、軟骨分化に関しては抑制的に作用した。このことより、PTH 1-34 の骨折部への局所投与は、骨折血腫細胞および偽関節細胞には直接的に促進的な影響を与えないことが示唆され、骨折部の他の細胞・組織に働くことで生物学的作用が生じる可能性が考えられた。

(2) ラット難治性骨折モデルの骨癒合を PTH 1-34 が促進するかの検討

ラット難治性骨折モデルの骨癒合を PTH 1-34 局所投与が促進するかの検討

PTH 1-34 投与を行わない対象群では手術後 8 週間放置すると、骨癒合しない偽関節となった。PTH 1-34 局所投与群においては、複数の投与量の条件で検討したが、いずれも骨癒合は得られず、骨折治癒促進作用は見出せなかった。

ラット難治性骨折モデルの骨癒合を PTH 1-34 全身投与が促進するかの検討

PTH 1-34 全身投与を行った群では、部分的ではあるが骨折部の骨性架橋形成が認められ、この骨折治癒促進作用は 100  $\mu$ g/kg 投与群の方が強かった。

骨折治癒促進作用の機序であるが、旺盛な外仮骨形成を伴っておらず、内軟骨性骨化の促進ではなく、膜性骨化の促進が主であると考察された。PTH 1-34 の作用は主に骨芽細胞分化を促進することであり、骨膜由来骨形成性細胞の分化が促進されることで膜性骨化の促進へと繋がるものと考えられた。

(3) 研究期間全体を通じて実施した研究の成果

まず in vitro 研究で、骨折部血腫から分離した細胞に PTH 1-34 を連続的、間欠的に投与しても骨芽細胞系細胞および軟骨細胞系細胞への分化の促進作用がみられなかったことから、PTH 1-34 を骨折部局所に投与するのではなく、ホルモンとして作用させるべく骨粗鬆症治療と同様に全身投与が適切な投与形態であると示唆された。これを in vivo 研究で検討したところ、やはり局所投与では明らかな骨折治癒促進作用は認められず、全身投与では骨折治癒促進作用が期待されることが見出された。

また、PTH 1-34 を骨折治癒過程のどの段階において投与するかという問題であるが、われわれの in vitro 研究の結果からは、血腫が形成されるような骨折後早期においては骨折治癒促進作用が得られにくい可能性が示唆された。しかし、これは実際に、投与時

期をさまざまな骨折治癒過程において設定した動物実験等で検証する必要がある。

これらの、PTH 1-34 を骨折治癒促進剤として応用するにあたっての有益な情報が得られた。

#### 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 2 件)

1. 新倉隆宏. PTH による骨癒合促進の可能性. 整形・災害外科 5 月臨時増刊号 骨折の診断と治療 最新 update. 57(6), 637-645, 2014. 査読無
2. Dogaki Y, Lee SY, Niikura T, Koga T, Okumachi E, Nishida K, Kuroda R, Kurosaka M. Effects of parathyroid hormone 1-34 on osteogenic and chondrogenic differentiation of human fracture haematoma-derived cells in vitro. J Tissue Eng Regen Med. 2013 Aug 29. doi: 10.1002/term.1818. [Epub ahead of print]. 査読有

[学会発表](計 8 件)

1. Okumachi E, Niikura T, Lee SY, Koga T, Dogaki Y, Waki T, Kurosaka M. Therapeutic Effect of Local Application of Parathyroid Hormone for Unhealing Fracture. The 59th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2013/1/26. San Antonio, USA.
2. Dogaki Y, Lee SY, Niikura T, Koga T, Okumachi E, Waki T, Kurosaka M. Effects of Parathyroid Hormone 1-34 Treatments on Osteogenic/Chondrogenic Differentiation of Human Fracture Hematoma-Derived Cells in Vitro. The 13th Biennial Conference of International Society for Fracture Repair. 2012/11/6. Kyoto, Japan.
3. Okumachi E, Lee SY, Niikura T, Koga T, Dogaki Y, Waki T, Kurosaka M. Effects of Parathyroid Hormone 1-34 Treatments on Osteogenic Differentiation of Human Nonunion Tissue-Derived Cells in Vitro. The 13th Biennial Conference of International Society for Fracture Repair. 2012/11/6. Kyoto, Japan.
4. 堂垣佳宏, 李相亮, 新倉隆宏, 康暁博, 古賀敬章, 奥町悦子, 黒坂昌弘. Parathyroid hormone (1-34)連続投与によるヒト骨折血腫由来細胞の骨・軟骨分化に対する効果. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2012/10/26. 名古屋市.

5. Dogaki Y, Lee SY, Niikura T, Koh A, Koga T, Okumachi E, Kuroda R, Kurosaka M. Effects of Parathyroid Hormone Treatment on Osteogenic/Chondrogenic Differentiation of Human Fracture Hematoma-Derived Cells in Vitro. The 58th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2012/2/4. San Francisco, USA.
6. 堂垣佳宏, 李相亮, 新倉隆宏, 康暁博, 古賀敬章, 奥町悦子, 黒坂昌弘. ヒト骨折血腫細胞の骨分化に対する Parathyroid Hormone (1-34)の効果の検討 - 連続投与と間欠投与の比較 -. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2011/10/20. 前橋市.
7. Dogaki Y, Lee SY, Niikura T, Koh A, Koga T, Okumachi E, Kurosaka M. Effects of Parathyroid Hormone Treatment on Osteogenic/Chondrogenic Differentiation of Human Fracture Hematoma-Derived Cells in Vitro. SICOT 2011 XXV Triennial World Congress. 2011/9/6. Prague, Czech.
8. Dogaki Y, Lee SY, Niikura T, Oe K, Koh A, Koga T, Kurosaka M. Effects of Continuous and Pulsatile Parathyroid Hormone (PTH) Treatment on Osteogenic Differentiation of Human Fracture-Derived Cells in vitro. The 57th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2011/1/13. Long Beach, USA.

[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

新倉 隆宏 (Takahiro Niikura)  
神戸大学大学院医学研究科外科系講座リハビリテーション機能回復学分野 特命講師  
研究者番号：40448171

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：