

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K12939

研究課題名(和文)骨折治癒におけるテリパラチド+デノスマブの協調効果の検討

研究課題名(英文)Combination Therapy with Teriparatide and Denosumab Contributes to Fracture Healing on Rat Femoral Fracture Model

研究代表者

片岡 晶志(Kataoka, Masashi)

大分大学・福祉健康科学部・教授

研究者番号：40301379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：難治性骨折モデルを作成し、テリパラチド単独、テリパラチド+デノスマブの協調効果の検討を行った。結果はテリパラチドのみでは早期骨癒合は見られないが、デノスマブを投与すると強調効果が見られた。さらに今回の実験で分かったことであるが、比較対象群としてゾレドロネートを使用したところ、予想していた以上にゾレドロネートの早期骨癒合効果(架橋形成など)が強く、テリパラチド単独にくらべ約10倍の効果がみられた。さらにゾレドロネートの軟骨仮骨形成促進作用を検討した。その結果、ゾレドロネートは骨代謝を抑制するが、軟骨仮骨の形成においては促進し、骨癒合においては決してマイナスに作用しない点を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト大腿骨骨折後の偽関節など難治性骨折を臨床においてしばしば遭遇する。本研究では難治性骨折に対する治療法を新たに樹立することを目的とした。本治療法は他の難治性骨疾患へも応用できる可能性が高い点が重要である。テリパラチド+デノスマブの協調作用の有効性が確率すると骨折のみでなく、関節リウマチの骨破壊、骨壊死症、ペルテス病、人工関節周囲の緩み、骨延長術、骨移植術、難治性骨折治療に対しても臨床応用可能になる可能性が十分あると考えている。

研究成果の概要(英文)：Delay in fracture healing or non-union can be devastating complication. Recent studies have reported that Teriparatide (TP) demonstrated effectively on callus formation and mechanical strength and Denosumab (DM) increased the callus size and resistance at the fracture site in rat fracture model. In this study the effects of combination therapy with low dose TP and DM on fracture healing was evaluated. From 1 week post-operation, TP (5 times a week administration) and DM (0.1 mg/kg single administration) were administered by dividing the rats into the following five groups: TP 1 μ g group, DM group, TP1 μ g+DM group, TP10 μ g+DM group, and control group. It is suggested that administration of low dose TP and DM in combination may lead to the treatment of delayed union of fracture. We hope the combination treatment may become one of new therapeutic strategy.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨リモデリング 骨粗鬆症 骨折早期治癒 難治性骨折 仮骨形成 骨吸収抑制 骨形成促進

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

テリパラチドは強力な海綿骨内骨形成促進作用を有する蛋白質である。これまでテリパラチドの骨折治癒遷延例に対する治療効果の報告はすくない。その原因の一つとしてテリパラチドは、骨梁構造を成熟させる効果や金属 - 海綿骨間の loosening を減少させる効果が見られるが、骨癒合率には影響しないと考えられている。つまり海綿骨には影響を及ぼすが、皮質骨への影響は少ないことが示唆されている。しかしながら、我々の予備実験の結果からテリパラチド投与下でデノスマブの投与時期をうまくずらすことで、骨折治癒遷延にたいする早期骨癒合の効果があることが証明された。これまでラットチャンバーモデルを用いての BMP, ビスフォスフォネートの研究 (kataoka 他 J Orthop Res 26(9)1245-9, 2008) やこれまで行ってきたハイドロゲルを担体としたリコンビナントヒト線維芽細胞増殖因子 - 2 (rhFGF-2) (2009年 - 2011年基盤C 研究課題番号 22591661) の経験により、実験方法、設備、手技などの問題はない。

2. 研究の目的

骨折治癒遷延に対して副甲状腺ホルモン(テリパラチド)製剤とデノスマブの協調効果による治療法の開発を目指す。骨に対して同化作用を有するテリパラチドと異化作用を有するデノスマブを組み合わせることにより、骨リモデリングにおけるこれら2つの協調効果をラット実験モデルにおいて明らかにしたい。さらにラット大腿骨骨折治癒遷延モデルにおいて早期骨癒合の効果と骨質について検討を行う。テリパラチドとデノスマブを組み合わせると、実臨床における骨粗鬆症治療において、これまでにないすばらしい結果を生み出していることが報告されている。しかしながら、この実験モデルにおける骨は急速な骨形成促進と骨吸収の抑制とによるものであり、両者によって作り出される新生骨の骨質についても検討する必要がある。

3. 研究の方法

- (1) テリパラチドとデノスマブの協調効果について検討するために、上記実験のチャンバー設置6週後に、中の移植骨を取り出し病理組織学検討と、組織形態計測による検討をおこなう。

対象：Sprague Dawley ラット 雄、10週齢、体重300g 48匹

移植骨の準備：24匹を麻酔死させた後、両脛骨近位より移植骨(海面骨)を採取し-80℃に保存する。

チャンバー設置：全身麻酔下、24匹のラット両脛骨内側に移植骨を中に入れたボーンチャンバー(BC)を挿入する(BCの先端は骨髄と交通している)。

テリパラチドの投与：10µg/Kgのテリパラチドを術後1日、1週、2週、4週に皮下注する。さらにデノスマブ10mg/kgを手術直後に8匹のラットに投与し、残りの8匹には手術2週間後に皮下投与した。さらに手術2週間後に生理食塩水を皮下投与した8匹をコントロールとした。

手術6週間後にチャンバー内の骨を摘出しH.E染色による病理組織標本作製する。専用ソフト(analySIS FIVE)を用いてそれぞれ移植骨全体の面積、骨吸収領域の面積、骨形成領域の面積を求め、統計学的検討を行う。

ラット飼育中の体重変動を記録し、2週間ごとの採尿(代謝測定器使用)による尿中NTX(クレアチニンで補正)を測定する。また手術6週間後屠殺時に採血を行いTRACP-5b、BAPの測定を行う。

- (2) ラット大腿骨骨折治癒遷延モデルにおけるテリパラチド+デノスマブの強調効果の検討をおこなう。軟X線撮影、病理組織標本から架橋形成、骨陵の大きさ、細胞浸潤の程度など検討する。さらに骨強度試験を行い、骨質についても検討する。

対象：Sprague Dawley ラット 雄、10週齢、体重300g 45匹

全身麻酔下、45匹のラット大腿骨骨折治癒遷延モデルを作成する。右大腿骨を骨鋸で骨切し、骨膜を骨折部より幅1cmにかけて剥離する。Kirschner 鋼線(1.8mm)で逆行性に骨髄内に刺入し骨接合を行う。大腿筋膜と皮膚を縫合する。45匹のラットをコントロール群(生理食塩水のみ)、テリパラチド単独投与群(10µg/kg 術後1日、1週、2週、4週に投与)、テリパラチド+デノスマブ(10mg/kg)の3群に分ける。

1. テリパラチド、デノスマブの投与方法は上記の実験(1)に準ずる。

1週ごとに体重測定する(体重増加の有無はラットのコンディションを反映するため)

手術6週間後に右大腿骨を摘出し、軟X線撮影を2方向おこない、その後各群から無作為に3標本を選び、病理組織標本作製する(H.E染色、トルイジンブルー染色)。軟X線撮影像から骨癒合の判定の有無(2方向撮影のうち骨癒合がなければ0点、1方向のみ骨癒合があれば1点、2方向とも骨癒合があれば2点として評価する)と病理組織標本での仮骨の面積を評価する(専用ソフトanalySIS FIVEを使用)。さらに病理組織標本から架橋形成、骨陵の大きさ、細胞浸潤の程度など検討する。

残った標本を用いて生体力学的試験をおこなう（3点曲げ試験）。（マルトー社製 MZ - 500Sを使用）

（3）ラット大腿骨骨折治癒遷延モデルにおける血管新生について検討する。

上記1. - 3.までは同様の操作をおこなう。（ラット各群10匹）手術6週後に、麻余暇に回復し下大静脈に26ゲージ針を留置後、2500単位のヘパリンを静脈内投与しつぎにIndian Ink 50mlを130mmHgで静脈内に投与する。その後大腿骨を摘出し、透明標本作製する。

評価は専用ソフト NS2K-Pro を用いて、単位面積当たりの黒さを数値化し、各群において統計学的検討を行う。

4. 研究成果

ラット、10週齢（オス）難治性骨折モデルを作成し、低容量のテリパラチドの効果の検討および、テリパラチド+デノスマブの協調効果の検討を行った。結果は低容量テリパラチドのみでは早期骨癒合は見られないが、デノスマブなどの骨吸収抑制剤を投与すると協調効果が見られた。さらに今回の実験で分かったことであるが、比較対象群としてゾレドロネートを使用したところ、予想していた以上にゾレドロネートの早期骨癒合効果（架橋形成など）が強く、テリパラチド単独にくらべ約10倍の効果がみられた。さらにゾレドロネートの軟骨仮骨形成促進作用を検討した。その結果、ゾレドロネートは骨代謝を抑制するが、軟骨仮骨の形成においては促進し、骨癒合においては決してマイナスに作用しない点を明らかにした。以上の結果を英文雑誌に投稿し受理された。Tsubouchi Y, Ikeda S, Kataoka M, Tsumura H. Combination Therapy with Low-Dose Teriparatide and Zoledronate Contributes to Fracture Healing on Rat Femoral Fracture Model J .Orthop Surg and Res, 13:267-271 2018. さらに、ゾレドロネートの早期骨癒合効果を用いて、同種骨移植に応用可能かを検討した。結果は仮骨形成が著しく、早期骨癒合の可能性が示唆された。今後検証予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsubouchi Y, Ikeda S, Kataoka M, Tsumura H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Combination therapy with low-dose teriparatide and zoledronate contributes to fracture healing on rat femoral fracture model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Orthop Surg Res.	6. 最初と最後の頁 267 - 272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13018-018-0917-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tsubouchi Y, Kataoka M, Ikeda S, Tsumura H
2. 発表標題 The effects of combined low dose Teriparatide and Zoledronate treatment on fracture healing in rats fracture model.
3. 学会等名 6th FFN Global Congress（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坪内優太, 片岡晶志, 池田真一, 津村弘
2. 発表標題 ラット難治性大腿骨骨折モデルにおける低用量teriparatideとzoledronateの協調効果
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----