

令和元年6月17日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06659

研究課題名(和文) 血液凝固線溶系の修飾による骨折治癒の促進

研究課題名(英文) The effect of fracture healing by modifying the fibrinolytic system.

研究代表者

湯浅 将人 (YUASA, Masato)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80808254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：プラスミノゲン蛋白を欠損したマウスの大腿骨の骨折術+骨接合術(髄内釘法)を行った。さらにアンチセンス療法として、²Anti-Plasminのアンチセンスを用いて、プラスミノゲンヘテロマウスならびに野生型マウスに、アンチセンス療法を行い、プラスミン活性をあげた状態で骨折させた。レントゲンにて骨折の修復程度を野生型と比較した。骨折骨を組織学的評価した。結果、アンチセンス療法を行った、野生型マウス、ならびにヘテロに関しては、レントゲン上で明らかな違いを認めず現在病理組織で解析中であり、今後なんらかの結果が分かるかもしれない。今後病理組織だけでなく、新生血管などの状態についても検証していきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

整形外科領域において骨折の治癒促進は広く試みられているが、いまだ臨床応用まで至っていないのが現実である。特に高齢化に伴い骨粗鬆症が原因の高齢者の骨折は今後さらに増加すると考えられる。骨折の治癒の促進は、こういった高齢者の早期ADL向上にもつながると考えられる

研究成果の概要(英文)：We employed mouse femur fracture fixing with retrograde pin insertion. By this model, we compared Wild type (WT), Plasminogen heterozygous (Plg-Het), Plg-KO, Plg-Het treated with ² anti-plasminogen inhibitor antisense oligonucleotide (Plg-Het-a2AP ASO) and WT-a2AP-ASO expecting Plg-Het-a2AP and WT-a2AP mouse fracture heal faster than other mice since by ASO treatment, plasminogen activity should be higher in these mice. Radiographically, we did not observe any differences between untreated groups and ASO treated groups. However we did observe the difference in terms of heterotopic ossification amount. We are now going to examine those femurs histologically whether we are able to see any differences among those groups in the fracture healing.

研究分野：整形外科

キーワード：骨折治癒 骨再生 凝固線溶系 整形外科

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外傷によって発生する骨折は、ときに遷延治癒または癒合不全となることがある。癒合を阻害する要因を見つけ、癒合不全を予防し、骨折治癒を促進させるような治療の開発が望まれている。骨折後には必ず‘骨折後血腫’が発生するが、以前より我々は血腫の骨折治癒過程における役割に関して研究を行ってきた。その結果、血腫の主な成分である‘フィブリン’が骨折部に残存すると骨折治癒を阻害するということが、フィブリンの形成量を減らすことで骨折治癒阻害が‘部分的に’レスキューされることを発見した。その結果からフィブリンの沈着だけでなくフィブリンを溶解する線溶系タンパクが、フィブリン溶解だけではない作用によっても骨折治癒を促進するのではないかと仮説を立てた。本研究では骨折治癒促進に向けて、形成されたフィブリンを溶解する線溶系タンパクである‘プラスミン’の活性を高めることで、骨折治癒促進が期待できるのではないかと考え、プラスミン活性を高める薬剤の骨折治癒における有用性とその安全性を検証する。

2. 研究の目的

血液凝固線溶系の修飾による骨折治癒の促進

3. 研究の方法

(1) *In vivo* での 2AntiPlasmin ASO 治療マウスの骨折治癒過程の検証 (Systemic に線溶系を活性化)

骨折部でのフィブリンの溶解の検討

血清内プラスミンによる線溶効果の検討 (フィブリン溶解産物 FDP 測定)

2AntiPlasmin ASO 治療マウスの骨折治癒過程の検討：時間的空間的骨折治癒過程をコントロール群と比較

(2) *In vitro* (メカニズムの検証)：血管新生亢進が骨折治癒の亢進 (骨形成亢進) の原因の一つと考えられるため、そのメカニズムを探る

フィブリン Migration Assay：フィブリン網を作成し、そこを細胞の通過性を確認する。

Metatarsal Culture での血管新生：血管新生の検証

細胞を用いた血管分化、骨分化に寄与する遺伝子やタンパクの発現の検証

(3) *In vivo* での骨折部 tPA 局所投与マウスの骨折治癒過程の検証 (Local に線溶系活性化)：

フィブリン Degradation の検討による至適濃度の検討 (安全性の検討)

tPA 局所投与マウスの骨折治癒過程の検討：時間的空間的骨折治癒過程の検討

(本文)

(H29年)

(1) *In vivo* での 2AntiPlasmin ASO 治療マウスの骨折治癒過程の検証 (Systemic に線溶系を活性化)

骨折部でのフィブリン溶解の検討：野生型マウス C57BL6 雄 8 週齢を使用する。過去の応募者のデータと同じ濃度 (330 mg/kg/week) の 2AntiPlasmin ASO を用い、治療として 1 週間に一回の皮下注射により、約 1-2 週で効果がでる。血清中の 2AntiPlasmin レベルを ELISA 法にて測定し、効果判定を行う。応募者の過去の研究より、応募者らのマウスの骨折モデルの場合フィブリンが骨折部から溶解されるのは 2 週間を要する (Fig.1)。その期間から、ASO 治療開始はその 2 週間内に行うことが望ましい。また臨床応用を考慮すると、骨折直後より ASO 治療を行い、プラスミン活性を上げることが重要と考えるが、今回はより確実にプラスミン活性が高められる骨折前からの治療も含む。コントロール ASO (スクランブル ASO) 群と

2AntiPlasmin ASO 群を作成し、2AntiPlasmin レベルの差を確認し、骨折部のフィブリン蓄積に関して、組織学的にコントロール群と経時的に定性定量評価し比較する (Fig.2)。

プラスミン線溶効果：プラスミン活性が亢進していれば、フィブリンの溶解も亢進し、その結果血中フィブリン溶解産物 FDP 値が高くなるはずである。2AntiPlasmin ASO によってコ

Fig.1

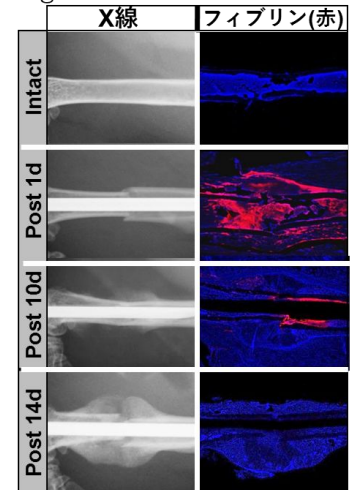
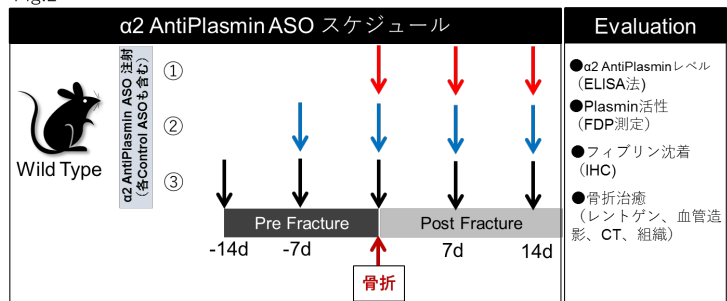


Fig.2



ントロール群と比較し差があるかを、マウスの血液を採取し ELISA 法を用いて経時的に定量評価する。

骨折治癒：骨折治癒のドラスティックな変化（血管新生ならびに骨癒合）は、マウスの場合 7 日～14 日で通常認められるため、14 日以内で評価を行う。

具体的には、X 線、 μ CT にて骨形成評価、血管造影評価（マイクロフィル）、組織学的評価（H&E, Fast Green&Safranin-O 染色, CD31 免疫染色）を行い、仮骨量及び血管増殖に対して定性定量評価する。

（ 2 ） *In vitro*（メカニズムの検証）：

フィブリン Migration Assay：Transwell Chamber を用いてフィブリンで覆ったメンブレンに細胞を播種し、その状態で線溶系活性有無で Culture し、その細胞の Migration を定性定量評価する。Migration した細胞をクリスタルバイオレットにて染色、その後一定量の Tween 入り PBS で脱色し、プレートリーダーにて吸光度を測定する（Fig.3-A,B）。

Metatarsal Culture：血管新生評価として、出生間もないマウスより中足骨を採取し、線溶系活性有無具体的にはプラスミンの添加の有無の条件下で 24well Dish で 2 週間 Culture する。ホルマリンにて固定した後 CD31 免疫染色し、血管新生の差を評価する

遺伝子発現：骨芽細胞や血管内皮細胞（Cell Line）を用い、線溶系活性の有無、具体的にはプラスミンの添加の有無での細胞の増殖、さらには細胞の遺伝子発現（VEGF, ALP, Osteocalcin など）を定量評価する。

（ 3 ） *In vivo*での骨折部 tPA 局所投与マウスの骨折治癒過程の検証（Local に線溶系活性）：

フィブリン Degradation の検討による至適濃度の検討（安全性の検討）：

組織型プラスミノゲン活性化因子（tPA）療法の最大の利点は、その即効性である。これまで虚血性脳血管疾患に臨床応用されている。今回この薬剤を用いて骨折部に局所投与を行い、フィブリン溶解を促進できないか、そして骨折治癒を促進できないかと考えた。と同様野生型マウスを用い、検証する。至適 tPA 濃度が不明なため、濃度を体重に合わせた臨床使用濃度をもとに、1, 1/10, 1/100 などと濃度を振り、フィブリン沈着が多くみられる、（ 1 ）骨折後 1 日目、（ 2 ）骨折後 3 日目、（ 3 ）骨折後 5 日目に tPA を局所投与する。これにより超初期の骨折による出血をコントロールしつつ、その後のフィブリン溶解を促進できると考えている。コントロールとして生理食塩水を注入する。

tPA 局所投与マウスの骨折治癒過程の検討：時間的空間的骨折治癒過程の検討

評価項目として、骨折後 7-14 日の A)フィブリン沈着、B)骨折治癒過程、C)局所の過剰出血の有無（線溶系が過亢進しているサイン）とした。過程の検討：時間的空間的骨折治癒過程の検討

4 . 研究成果

血液凝固線溶系の修飾による骨折治癒の促進をゴールとして実験を行った。まずプラスミノゲン蛋白を欠損したマウスを、プラスミノゲンヘテロマウスを掛け合わせるにより作成し、生後 8 週の時点で大腿骨の骨折術 + 骨接合術（髄内釘法）を行った。コントロールとしてヘテロマウスを掛け合わせて作成できたワイルドタイプマウスを使用した。さらにアンチセンス療法として、 2 Anti-Plasmin のアンチセンスを用いて、プラスミノゲンヘテロマウスならびに野生型マウスに、アンチセンス療法を術前より行い、プラスミン活性をあげた状態で骨折させた。まずレントゲンを用いて後 3 日、5 日、7 日、10 日、14 日と 5 ポイントで撮影を行い、骨折の修復程度を野生型と比較した。さらに各ポイントにて骨折大腿骨を摘出し、ホルマリン固定のち組織切片とした。結果として、レントゲンでは野生型は予想通りの骨折の治癒過程を示した。プラスミノゲンヘテロマウスに関しては、骨折部中心に異所性骨化を形成したものの、骨折の治癒過程としては野生型と相違ないように見えた。現在組織切片にて解析中である。またノックアウトマウスは異所性骨化が顕著で、骨折の治癒過程も遅れているように見えた。さらにアンチセンス療法を行った、野生型マウス、ならびにヘテロマウスに関しては、レントゲン上で明らかな違いが判らなかつた。現在病理組織で解析中であり、今後なんらかの結果が分かるかもしれない。今後病理組織だけでなく、新生血管などの状態についても検証していきたい。

Fig.3-A

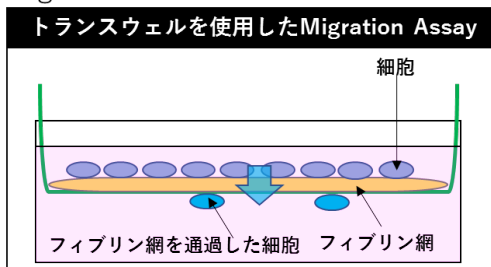
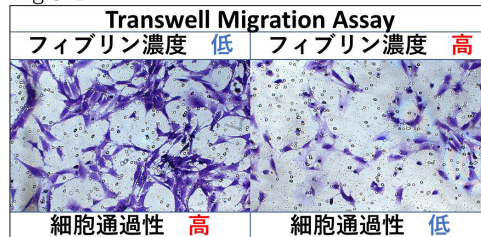


Fig.3-B



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。