

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16605

研究課題名(和文) 成長板軟骨損傷後の治癒過程におけるガングリオシドによる内軟骨性骨化制御機構の解明

研究課題名(英文) The effect of gangliosides deficiency on repair process of physeal injury in growth plate injury

研究代表者

松岡 正剛 (Matsuoka, Masatake)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：70816066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々が独自に作製したマウス脛骨近位成長板軟骨損傷モデルを野生型マウス、GD3合成酵素ノックアウトマウスに適用し表現型を調査した。術後3週においては成長板軟骨損傷を作製した脛骨長の短縮率は野生型マウスとノックアウトマウスでは同程度であったが、マイクロCTでの解析により損傷部の骨橋形成が阻害されていたことが明らかとなった。術後5週において、ノックアウトマウスで脛骨長軸方向の成長障害が野生型マウスと比較して、抑制される結果を呈した。本研究結果は、GD3合成酵素ノックアウトマウスにおいては、成長が促進される3-6週齢の期間に骨橋形成を阻害することで、成熟時の8週齢で成長障害が抑制されることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成長板軟骨損傷に対して四肢変形の主因となる損傷部位の骨性癒合に対して、骨性架橋の切除に加えて骨セメント移植や自家脂肪組織移植などが試みられている。しかし、成長板障害に続発する骨性癒合を抑制する治療法は未だ存在しない。我々はこの点に着目し、内軟骨性骨化を制御することで骨性架橋形成の抑制を目指している。本コンセプトは、今まで骨性架橋を侵襲的に切除するしかなかった治療法とは異なり、成長板軟骨板損傷に対する非侵襲的治療法の開発という新たな方向性を示している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the current study was to clarify the roles of ganglioside series after growth plate (GP) injury. 5 weeks postoperatively, the length of operated tibia was significantly shortened compared to those of sham operated tibia in WT mice. The drop ratio in KO mice significantly decreased compared to those in WT mice. The height of growth plate in KO mice were significantly higher than those in WT mice. Bone volume of the physeal bridge and BMD of the subchondral area in KO mice were almost equal to those in WT mice.

The current study demonstrated that b-series gangliosides were most abundant gangliosides series in physeal chondrocyte and depletion of b-series gangliosides inhibited growth imbalance in mice. The treatment strategy that enhances viability of remaining cartilage via b-series gangliosides pathway may be future directions for the growth plate injury.

研究分野：整形外科

キーワード：骨端線損傷 成長板

1. 研究開始当初の背景

小児骨端線損傷は小児骨折における 30% を占め、そのうち 10% が四肢の短縮、変形をきたすため社会的に重要な問題である。長管骨の長軸方向の成長は、成長板での軟骨細胞肥大化に引き続く血管侵入による骨組織への置換 (内軟骨性骨化) により主に制御される。成長板軟骨損傷は損傷軟骨の部分的な骨化により成長障害を来し、若年者に大きな負担を与えるが、その詳細な機序は明らかにされていない。

一方、糖鎖は未成熟な脂質・タンパク質を生体内で修飾することで、機能を有する生理活性物質に変化させる。なかでも糖脂質上糖鎖は骨・軟骨の成長過程に重要な役割を担うことが知られている。研究代表者のグループは複数種の糖鎖合成酵素遺伝子改変マウスを用いて、軟骨代謝と関連の深いスフィンゴ糖脂質 (GSLs) の中でも特にガングリオシドが関節疾患の病態に重要な役割を担うことを明らかにしてきた (Arthritis Rheum. 2012, Osteoarthritis Cartilage. 2014)。特に研究代表者は独自に開発したマウス関節軟骨修復モデル (Matsuoka et al. Tissue Eng Part C Methods. 2015) を用いて、ガングリオシド欠損が Indian hedgehog pathway を介して軟骨肥大化過程を制御することで、内軟骨性骨化に重要な役割を担うことを明らかにしてきた (Matsuoka et al. Sci Rep. 2017)。

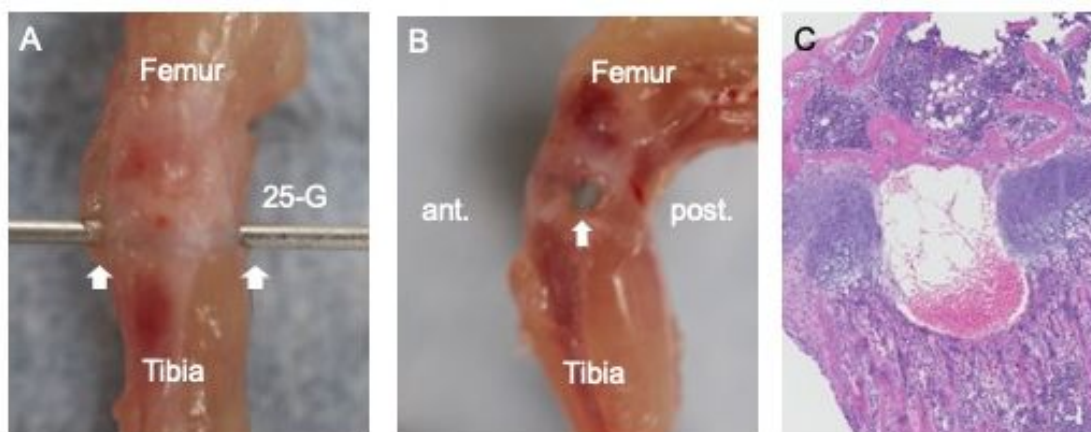
そこで研究代表者は、成長板軟骨損傷の治癒過程において、ガングリオシドが内軟骨性骨化を制御することにより、成長障害の発生に重要な役割を担う可能性があるかと着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、成長板軟骨損傷においてガングリオシド欠損が成長板軟骨損傷修復過程に対して促進的作用を及ぼすことを、ガングリオシド欠損マウスを用いて証明することである。我々の先行研究から、ガングリオシドの発現を抑制することで修復軟骨細胞の形質を維持し、損傷部の部分的骨化を抑制することで軟骨損傷の治癒過程に対して促進的に働くことは明らかである。そのため、ガングリオシドの発現を抑制された遺伝子改変マウスに対して、成長板軟骨損傷モデルを解析することによって、成長板軟骨損傷に対する新しい知見が得られる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究でターゲットとすべきガングリオシドシリーズを特定するために、生後 3-5 日齢の C57BL6 マウスより骨端線軟骨細胞を回収し、グライコプロッティング法 (Mol Cell Proteomics 2010) により成長板軟骨内糖脂質の発現パターンの網羅的構造解析を行った。また、マウス成長板軟骨損傷モデルを用いて、3 週齢の野生型マウスの修復過程を調査した。全身麻酔下に実体顕微鏡で観察を行い、膝関節に 5mm の皮膚切開により脛骨近位成長板を明らかにし、脛骨前方より後方に向かって 30-G 針で直径 300 μm の成長板軟骨損傷を作製した (図 1)。逆側膝は皮膚切開のみとし、修復結果の評価として各タイムコースで 10 匹 20 膝を回収し、肉眼的評価・組織定量評価を行った。また、マイクロ CT 解析により、損傷部に形成した骨橋の骨量、損傷部以遠の二次海綿骨の骨密度 (BMD)、損傷成長板の成長板高を調査した。



(図 1) 本研究で用いたマウス脛骨近位成長板軟骨損傷モデル。(A) 脛骨近位成長板に 25G 針を貫通し、損傷を形成、(B) 損傷を側面から確認、(C) 損傷後 1 日の組織学的解析後

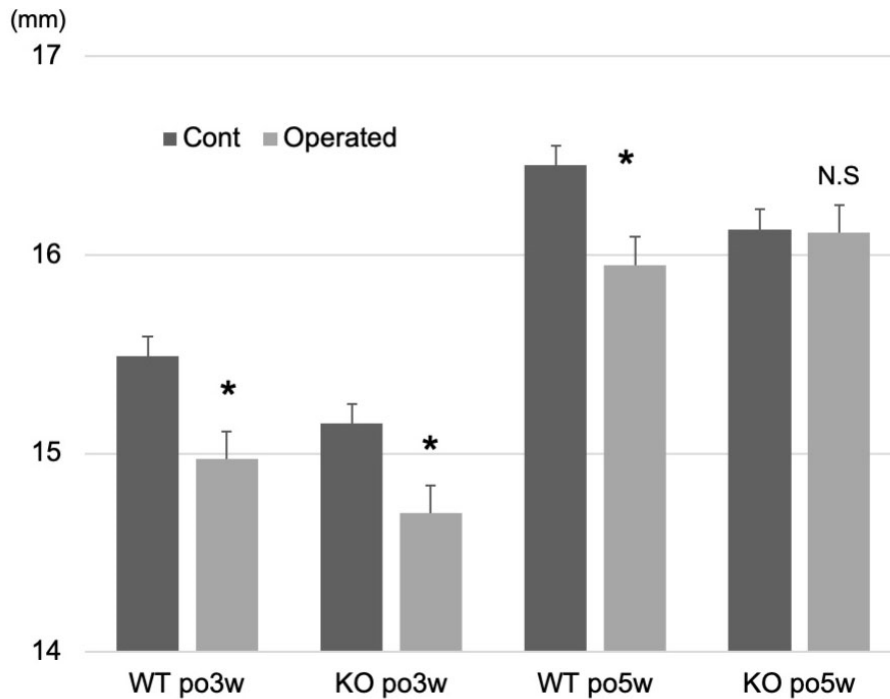
4. 研究成果

・ グライコプロット法による糖脂質の網羅的解析

まず、本研究でターゲットとすべきガングリオシドシリーズを明らかにするために、グライコプロット法により解析を行ったところ、GD3 合成酵素により合成される b-series ガングリオシドが 70.4% と最も豊富に physeal cartilage に発現していることが明らかとなった。以上の結果より、以下の実験には野生型として C57BL6 マウス (WT)、GD3 合成酵素ノックアウトマウス (KO) を用いた。

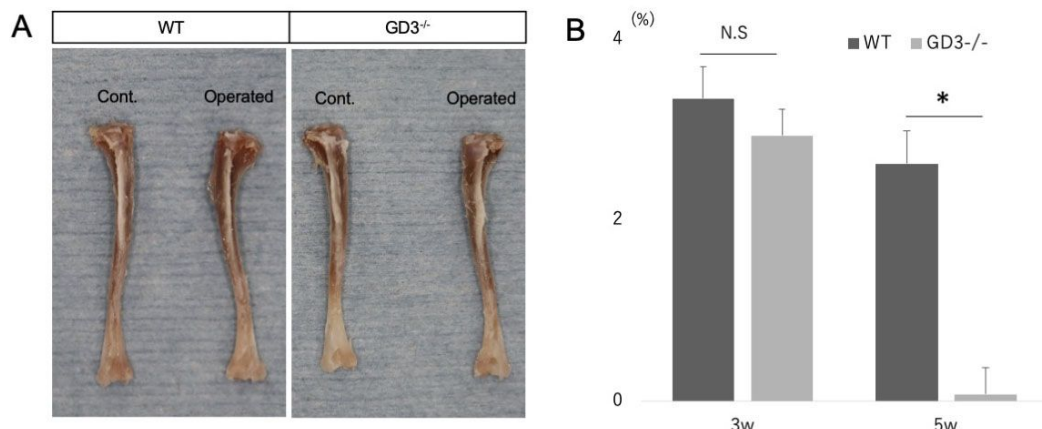
・ マウス成長板軟骨損傷後における脛骨成長障害の検討

損傷後 3、5 週において脛骨全長を測定した (図 2)。術後 3 週において、WT、KO のいずれにおいても患側の脛骨長が短縮した (平均 ± 標準偏差、WT: 患側 15.4 ± 0.5 mm、健側 15.5 ± 0.4 mm、P = 0.001、KO: 患側 14.8 ± 0.5 mm、健側 15.2 ± 0.4 mm、P = 0.04)。術後 5 週においては、野生型において患側の脛骨長が短縮した (患側 16.0 ± 0.5 mm、健側 16.5 ± 0.4 mm、P = 0.04) 一方で、KO マウスで差はなかった (患側 16.0 ± 0.4 mm、健側 16.0 ± 0.3 mm、P = 0.70)。



(図 2) マウス脛骨近位成長板軟骨損傷後の脛骨長の検討

さらに、健側との比 (Drop ratio: [健側脛骨長 - 患側脛骨長] / 健側脛骨長 × 100%) を算出した。術後 3 週においては Drop ratio に WT と KO の 2 群間で同程度であったものの、術後 5 週において KO の方が有意に低値となった (3 週: WT 3.3 ± 2.6%、KO 2.7 ± 3.6%、P = 0.66、5 週: WT 3.1 ± 1.2%、KO 0.3 ± 1.4%、p < 0.01、図 3)。



(図 3) マウス脛骨近位成長板軟骨損傷後における脛骨短縮率の検討。(A) 損傷後 5 週における脛骨マクロ所見、(B) 損傷後の脛骨短縮率の検討

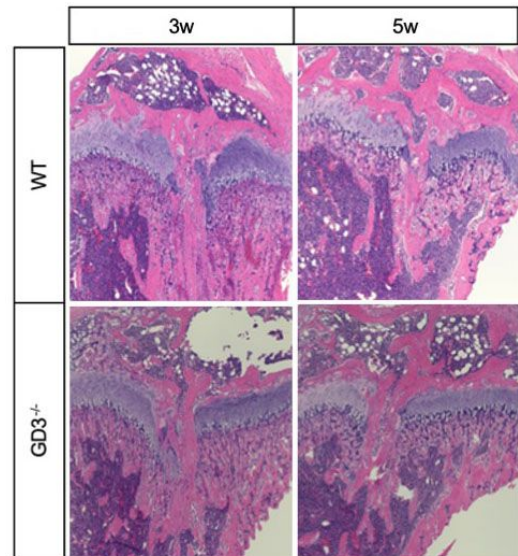
・組織学的解析

術後 3、5 週における組織学的解析において、3 週では KO において骨梁はまばらで不連続な形状を示していた一方で、5 週においては両者の明らかな違いは見いだされなかった (図 4)。

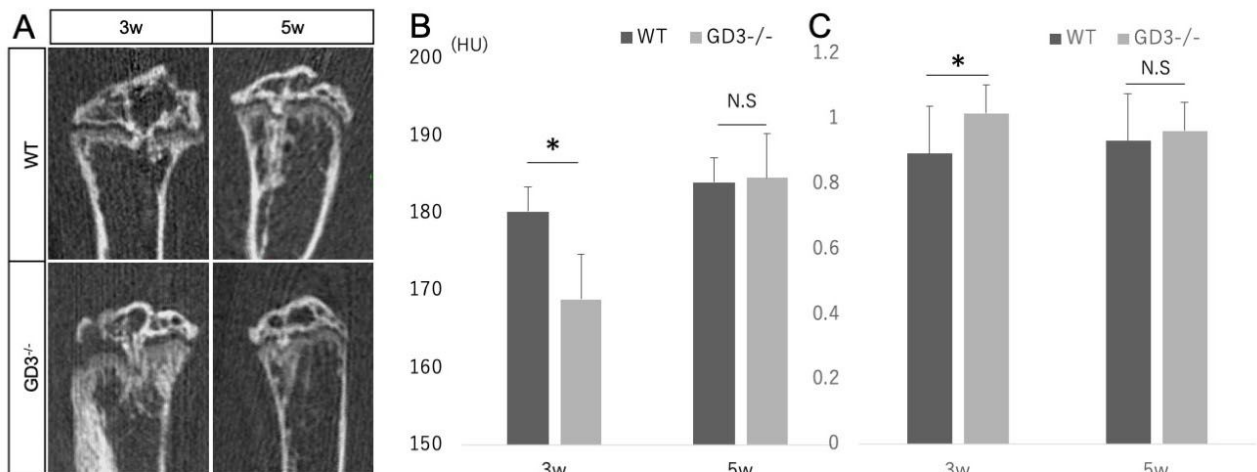
・マイクロ CT 解析 (図 5)

損傷後 3、5 週において損傷部に形成した骨橋の bone volume を測定したところ、3 週では骨橋形成が KO において WT と比較して抑制される傾向にあった (WT 180.2 ± 10.6 HU、KO 168.7 ± 15.0 HU、 $p = 0.13$)。一方で、5 週では骨橋形成については 2 群間で同程度であった (WT 184.0 ± 11.8 HU、KO 184.5 ± 12.0 HU、 $p = 0.91$)。成長板高においては、3 週において WT と KO で差はなかったものの、5 週では KO に比して WT で成長板高が低下していた (3 週: WT 122.5 ± 19.4 μm 、KO 169.0 ± 37.6 μm 、 $p < 0.01$ 、5 週: WT 122.5 ± 19.4 μm 、KO 169.0 ± 37.6 μm 、 $p < 0.01$)。

BMD については、術後 3 週において WT は KO と比較して低下していたが、5 週で両者は同程度であった (3 週: WT マウス $43.6 \pm 5.9\%$ 、KO マウス $48.2 \pm 2.2\%$ 、 $p = 0.04$ 、5 週: WT マウス $43.4 \pm 5.9\%$ 、KO マウス $44.1 \pm 2.6\%$ 、 $p = 0.99$)



(図 4) マウス脛骨近位成長板軟骨損傷後における組織学的解析



(図 5) マウス脛骨近位成長板軟骨損傷後におけるマイクロ CT 解析。(A) 損傷後 5 週におけるマイクロ CT 所見、(B) 骨橋部の骨量解析、(C) 損傷部遠位の二次海綿骨の骨密度解析

以上の結果を総合すると、GD3 合成酵素欠損は、脛骨の長軸方向が促進される生後 3-6 週齢において、骨橋形成を阻害することで成熟時の 8 週齢において成長障害を抑制しうることを示した。

成長板軟骨損傷に対して四肢変形の主因となる損傷部位の骨性癒合に対して、骨性架橋の切除に加えて骨セメント移植や自家脂肪組織移植などが試みられている。しかし、成長板障害に続発する骨性癒合を抑制する治療法は未だ存在しない。我々はこの点に着目し、内軟骨性骨化を制御することで骨性架橋形成の抑制を目指している。本コンセプトは、今まで骨性架橋を侵襲的に切除するしかなかった治療法とは異なり、成長板軟骨板損傷に対する非侵襲的治療法の開発という新たな方向性を示している。B-series ガングリオシドシリーズは骨端線損傷に対する新規薬物治療法のターゲットとなる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 細川 吉暁、松岡 正剛、小野寺 智洋、宝満 健太郎、金 佑泳、岩崎 倫政
2. 発表標題 マウス成長板軟骨損傷後に糖脂質ガングリオシドが果たす役割
3. 学会等名 第140回北海道整形災害外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細川 吉暁、松岡 正剛、小野寺 智洋、宝満 健太郎、金 佑泳、岩崎 倫政
2. 発表標題 マウス成長板軟骨損傷後にb-seriesガングリオシドが果たす役割
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細川 吉暁、松岡 正剛、小野寺 智洋、宝満 健太郎、金 佑泳、岩崎 倫政
2. 発表標題 マウス成長板軟骨損傷モデルにおける糖脂質ガングリオシドが果たす役割
3. 学会等名 第34回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiaki Hosokawa, Masatake Matsuoka, Tomohiro Onodera, Kim Woo Young, Norimasa Iwasaki
2. 発表標題 The depletion of b-series gangliosides inhibited the growth imbalance after growth plate injury
3. 学会等名 Orthopedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsuoka M, Hongying T, Wilson K, Otsuru S, Iwasaki N, Abzug M J, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M
2. 発表標題 Establishment of Proximal Tibial Growth Plate Injury Mouse Model.
3. 学会等名 The 65th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡正剛、内部健太、Ivan Alferiev、Joshua M Abzug、Min Liu、岩崎倫政、岩本資己、Michael Chorny、岩本容泰
2. 発表標題 選択的レチノイン酸受容体アゴニストによる長管骨骨成長の調整
3. 学会等名 第32回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡正剛、内部健太、Ivan Alferiev、Joshua M Abzug、Min Liu、岩崎倫政、岩本資己、Michael Chorny、岩本容泰
2. 発表標題 レチノイン酸選択的アゴニスト搭載ナノ粒子による骨成長の調整
3. 学会等名 第33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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------