

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17013

研究課題名（和文）ヘッジホッグシグナル転写因子Gli1の骨折治癒過程における関与とその治療への応用

研究課題名（英文）Gli1 promotes fracture healing in a mouse model

研究代表者

北浦 義昭（Kitaura, Yoshiaki）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・特任研究員

研究者番号：00816895

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）：胎生期の器官形成に必須のヘッジホッグシグナルが成体の骨の恒常性維持にも関与していることを新たに見出し、骨折の早期治癒治療薬としての応用を検討した。再現性、安定性に優れたマウスの骨折モデルを確立し、局所投与用のアデノウイルスベクターの作製、新しい in-vivo imaging法等の新規実験手法を開発、整備し、これらを総合的に駆使することによって、ヘッジホッグシグナルを骨折部に作用させると、仮骨の形成が促進され、機械的強度も向上することを確認した。本研究により、骨折治療新規薬剤の可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界の中でも高齢化先進国の日本に於いては、高い生活の質（QOL）を維持し、健康寿命を延ばすことが喫緊の課題であるが、そのQOLを下げる大きな原因となっているのが骨折・転倒である。高齢者の場合、骨折により一度寝たきりになると、廃用症候群による心身機能の低下を招き、さらに動けなくなるという「負のスパイラル」に陥るため、その予防や治療法の改善は社会的ニーズが非常に高い。高齢者の場合、既に複数の疾患を抱え、種々の薬が処方されている場合が多いため、他の疾患の治療に干渉しない治療法が望まれている。本研究はヒトが本来持っている機能（シグナル）を応用したものであり、上記応えられる新しい治療法として期待される。

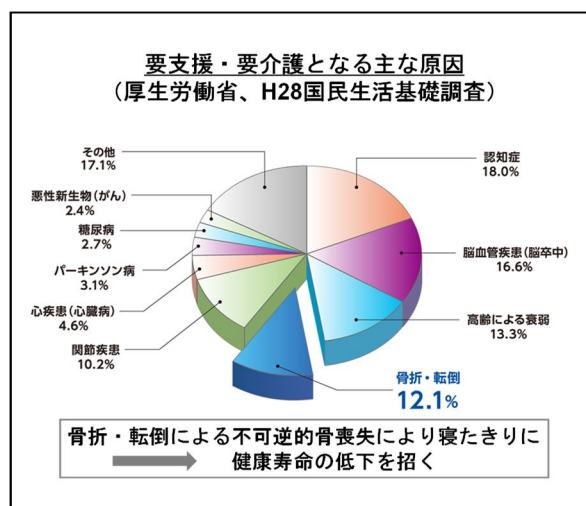
研究成果の概要（英文）：Fracture healing is generally impaired in the elderly. The impairment especially in the lower limb fractures severely affects the quality of life (QOL) of the elderly, often leading them to become bedridden. Thus, in the aging society, managing fractures of the elderly as well as maintaining their bone quality is a key for the extension of the healthy life expectancy, which contributes to enhanced productivity and reduced medical expense in the society. Since hedgehog signal is a factor that exists for many organ formations from the embryonic period, it has few side effects and may be a new treatment method that is particularly effective for maintaining bone quality and early healing of fractures in the elderly. Through this study, I found the feasibility as a new therapeutic agent for fractures.

研究分野：整形外科

キーワード：骨折治癒 ヘッジホッグシグナル

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え、生活の質(QOL)の高い健康寿命を延ばすことは喫緊の課題である。寝たきりはQOLが最低の状態であり、平成28年度厚生労働省国民生活基礎調査によると、骨折・転倒は、要支援・要介護となる主要な原因の一つである(図1)。一度寝たきりになると、全身器官の廃用症候群による心身機能の低下によりさらに動けなくなるという「負のスパイラル」に陥るため、その予防・治療法の改善は社会的ニーズが非常に高い。骨折・転倒により寝たきりとなる要因として骨粗鬆症が挙げられる。骨粗鬆症は、骨代謝機構が破綻し、破骨細胞による骨吸収が骨芽細胞による骨形成を上回った結果、骨量が減少し、骨が脆くなる疾患である。2040年には、世界中で骨粗鬆症による骨折患者が3億人以上になるとも予測されており、寝たきりや死亡率の増加を引き起こす骨粗鬆症による骨折患者への対策は重要な課題といえる。



これまで骨折リスクの低減のため、ビスフォスフォネート製剤、抗RANKL抗体薬、SERNなどの骨吸収抑制薬が使用され一定の効果が認められている。しかしその効果は、あくまで骨強度低下の進行により増大する骨折リスクを部分的に抑制しているに過ぎない。骨形成促進剤も骨折リスク低減をもたらすが、試用期間に制限があるため、長期的な治療効果を得ることはできない。それに加え、骨折リスクが高い大腿骨近位部骨折例に対する薬物療法の実施率は20%に満たないのが現状である(Calcif Tissue Int 90:14-2, 2012)。そのため、骨粗鬆症患者の骨折予防・骨折治療の改善のためには、長期投与しても安全で経口投与可能な骨形成促進剤の開発が必要であると考えられた。

ここで申請者は安全で経口投与可能な低分子ペプチドに着目し、骨芽細胞分化に対するペプチドスクリーニングを行った。その結果、骨芽細胞の分化を優位に促進する骨形成性ペプチドを見出した。本ペプチドをマウス骨折モデルに飲水投与したところ有意な骨折治療効果

そこで申請者は安全で経口投与可能な低分子ペプチドに着目し、骨芽細胞分化に対するペプチドスクリーニングを行った。その結果、骨芽細胞の分化を優位に促進する骨形成性ペプチドを見出した。本ペプチドをマウス骨折モデルに飲水投与したところ有意な骨折治療効果

2. 研究の目的

そこで本研究では、申請者が見出した新規骨形成性ペプチドの骨粗鬆症モデルに対する効果とその骨再生メカニズムの解析を通して、骨粗鬆症に患者に対する新たな骨修復戦略の確立を目指す。さらに、臨床応用を見据え既存の骨形成促進剤との比較検証により、安全性・治療効果を明らかにする。

これまで骨形成促進剤として臨床で使用されてきた副甲状腺ホルモン製剤(PTH製剤)に加えて、最近抗スクレロスチン抗体医薬が開発され、その有効性が報告されている。しかしながら、いずれの製剤も使用期限があり長期的な投与はできない。特に高齢者に対して、経口投与・長期投与が可能な安全な医薬品の開発が求められているものの、未だ有効な薬の開発には至っていないのが現状である。本研究においてペプチドスクリーニングにより見いだされた新規骨形成性ペプチドは天然ペプチド由来であるため安定性が保証されているだけでなく、in vitroおよびin vivo検証で有望な結果が得られつつあることから、さらなる解析により有効性の実証と作用機序が解明されれば、有望な骨粗鬆症治療薬となることが期待される。

3. 研究の方法

野生型雌 8 週齢マウスの卵巣摘出術により骨粗鬆症モデルを作製した後、新規骨形成性ペプチドを 4 週間飲水投与する。その後脛骨に骨折術を施し、その骨折治癒に対するペプチドの効果を検証する。マウス骨折の治癒過程は、炎症期（骨折後 0 - 7 日）、細胞増殖期（骨折後 4 - 7 日）、仮骨形成期（骨折後 7 - 21 日）、骨リモデリング期（骨折後 14 - 28 日）に分けられる（Einhorn TA et al. Nat Rev Rheumatol 11(1):45-54, 2015）。骨折部に形成される仮骨の体積は右図に示すように変化することから、定期的な仮骨形成の観察により治療効果を観察することが可能である。骨折手術後 7、14、21、28 日目に in vivo マイクロ CT により仮骨形成に対する新規骨形成性ペプチドの効果を検証する。さらに、仮骨形成に変化が認められたタイミングにおいて脛骨を採取し、軟性仮骨、硬性仮骨、骨癒合等骨折治癒の状態を評価する。解析方法としては、組織学的解析（H-E/alcian blue 二重染色、Masson's trichrome 染色、免疫染色（PCNA, TRAP 染色）、放射線学的解析（マイクロ CT、軟 X 線）、DEXA 法による骨密度測定を行う。さらに機械的強度試験を実施し、骨折部の強度を評価する。また、仮骨内の骨治癒状態を同定するため、in situ hybridization 法により、軟骨細胞のマスターレギュレーターである Sox9、骨芽細胞のマスターレギュレーターである Runx2 と Sp7、骨芽細胞マーカーである Col1a1、Ibsp、Bglap の発現を明らかにする。新規骨形成性ペプチドにより有意な治療効果が認められた場合は、既存の骨形成促進剤である PTH 投与の効果と比較検証する。

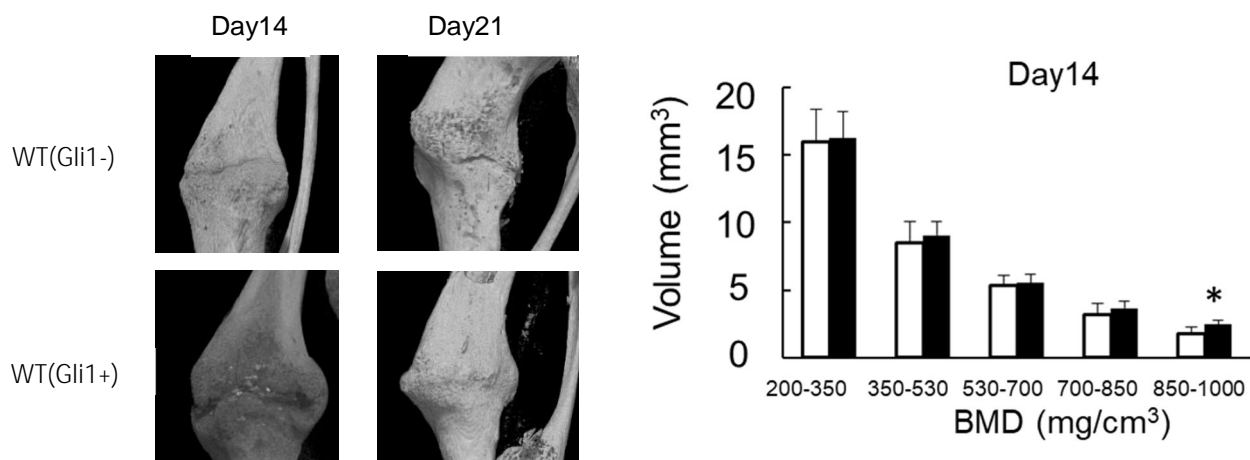
4. 研究成果

胎生期の器官形成に必須のヘッジホッグシグナルが成体の骨の恒常性維持にも関与していることを新たに見出し、骨折の早期治癒治療薬としての応用を検討した。

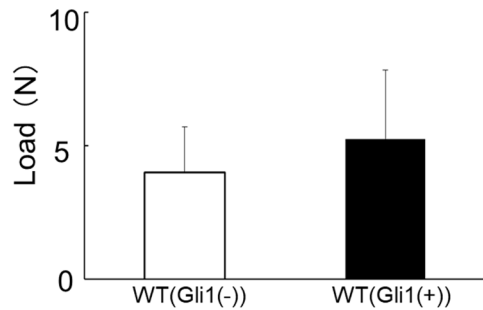
再現性、安定性に優れたマウスの骨折モデルを確立し、局所投与用のアデノウイルスベクターの作製、新しい in-vivo imaging 法等の新規実験手法を開発、整備し、これらを総合的に駆使することによって、ヘッジホッグシグナルを骨折部に作用させると、仮骨の形成が促進され、機械的強度も向上することを確認した。

下左の図は、確立したマウスの骨折モデルを使用し、脛骨に外科的手法により導入した骨折部位の治癒過程をマイクロ CT により観察した典型的な CT 画像を示している。

骨折手術後 14 日と 21 日を示しているが骨折部にヘッジホッグシグナルを作用させた WT(Gli1(+)) では、作用させていない WT(Gli1(-)) と比べて、明らかに仮骨の体積が大きく、新生骨形成能力が向上していることが分かった。手術後 21 日では、骨癒合が顕著に進行しており、骨折治癒が促進されていることが確認できた。



上右の図は、骨折手術後 14 日目の仮骨体積を骨質レベル毎に評価した結果である。図中の白抜き棒グラフはヘッジホッグシグナルを作用させていない場合の体積、黒色棒グラフはヘッジホッグシグナルを作用させた場合の体積を示しているが、ヘッジホッグシグナルを作用させることによって、骨質の高い骨の体積が有意に増大していることを確認した。(本検討では、各 n=6、 $P < 0.05$ で評価)



さらに、これらの骨折部の機械的強度を 3 点曲げ試験で評価した結果を下図に示す。

骨折部が破断に至る前の最大応力を比較すると、骨折部にヘッジホッグシグナルを作用させた WT(Gli1(+)) は作用させていない WT(Gli1(-)) と比べて、機械的強度が向上する傾向が確認できた。

以上の結果により、胎生期の器官形成に非常に重要な役割を果たすヘッジホッグシグナルを局所的に作用させることによって、骨折等の局所的な疾患部位の新生骨形成が加速され、治癒が促進することを確認した。今後、さらに、他の骨疾患への投与効果や安全性等の確認を進め、骨疾患関連の新しい創薬実現に向けた検討を進めていく。

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 Daiki Yamakawa, Yoko Kawase-Koga, Yasuyuki Fujii, Yuki Kanno, Marika Sato, Shinsuke Ohba, Yoshiaki Kitaura, Miki Kashiwagi, and Daichi Chikazu	4. 巻 21(23)
2. 論文標題 Effects of Helioxanthin Derivative-Treated Human Dental Pulp Stem Cells on Fracture Healing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 9158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21239158.	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Doori Park, Yoshiaki Kitaura, Thomas Dean, Shinsuke Ohba, Thomas James Gardella, Ung-il Chung, Soo Young Lee, Sihoon Lee,
2. 発表標題 Therapeutic Potentials of Dimeric Cys250TH(1-34) Peptide for Osteoporosis and Fracture Healing of The Bones
3. 学会等名 Endocrine Society（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021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
---------	---------