

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09593

研究課題名(和文) 糖尿病による骨癒合遅延を解消する挑戦的治療の開発

研究課題名(英文) Development of a treatment to eliminate delayed bone healing due to diabetes

研究代表者

松原 秀憲 (Matsubara, Hidenori)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：10507057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病患者では骨折後の癒合不全、偽関節形成のリスクが非常に高いことが知られており、その原因として糖化ストレスの関与を証明し、新たな治療を目指すことを目的とした。マウスでの実験において、糖尿病マウス(DM)の骨折治癒遅延に対するピリドキサミン(pyr)の効果を比較検討したところ、uCT,病理学的に糖化ストレスによる骨癒合遅延がpyrにより改善することを確認できた。糖化ストレス(メチルグリオキサール)と骨癒合遅延の因果関係を示す分子基盤が希薄であったため、細胞実験でメチルグリオキサールと特異的に結合する蛍光プローブを用いることでその関与を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者における骨折後の癒合不全、偽関節形成は手術を適切に行なったとしてもなかなか骨癒合を得られないために、非常に難治性である。これまで整形外科的なアプローチとしてインプラントの選択、固定力の増加、骨形成促進薬、超音波治療などが行われてきたが、効果は十分でなかった。本研究はこの難治性である糖尿病性骨癒合遅延に対して新たな解決策になりうる研究であり、今回の結果からその糸口が見出された。この治療が確立すれば、従来のアプローチに併用して治療を行うことで、難治性骨折でも早期に骨癒合が得られ、より早期に社会復帰が可能になると思われる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to prove the involvement of glycation stress as a cause of post-fracture healing failure and pseudoarthrosis in diabetic patients, and to develop a new treatment for this problem.

We compared the effect of pyridoxamine on bone fracture healing in diabetic mice (DM), and found that pyr ameliorated bone healing prolongation caused by glycation stress by uCT and pathology. Since the molecular basis for the causal relationship between glycation stress (methylglyoxal) and bone healing is still unclear, we demonstrated its involvement by using fluorescent probes that bind specifically to methylglyoxal in cellular experiments.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨癒合遅延 糖化ストレス メチルグリオキサール 難治性骨折 糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者では骨折後の癒合不全、偽関節形成のリスクが非常に高いことが知られている。実験動物においても糖尿病による慢性の高血糖によって同様に骨折治癒遅延が観察され、糖代謝異常が骨代謝や骨折治癒に悪影響を及ぼしていることが分かってきた。これまでの研究で、生体内の過剰な糖質がさまざまなタンパク質・脂質・核酸と非酵素的に反応する“糖化ストレス”がその原因であることが明らかになってきた。我々のグループでは糖化ストレスと骨折治癒遅延の関係に着目し、糖化ストレスを除去する新たな治療法の開発のためにこれまで研究を行い、その結果を報告してきた。

2. 研究の目的

本研究は、平成 28～30 年度の科学研究費(基盤 C)研究で得られた成果に基づき、骨折治癒研究をさらに発展させるものである。糖尿病患者では骨折後の癒合不全、偽関節形成のリスクが非常に高く、その原因として糖化ストレスの関与を明らかにしてきた。本研究では、発症機序を標的とした新たな治療法の確立を目指す。具体的には、糖尿病において加速的に増加・蓄積する糖化ストレスが糖尿病の骨治癒に与える分子メカニズムを明らかにし、既知の糖化ストレス阻害薬を用い骨治癒の回復を目指す事を目的とする。

具体的には

糖尿病状態としたマウスの骨修復が遅延するか検討する

マウス骨修復が改善する薬剤の候補であるピリドキサミンの骨修復能抑制効果を検討する

細胞実験において、糖化ストレスの関与を糖化ストレス特異的蛍光プローブを使用してモニタリングしつつ、その機能を評価することを目的とする。

3. 研究の方法

In vivo

7 週齢 C57BL/6J 雄性マウスに少量ストレプトゾトシンを 2 日間腹腔内に連続投与し、糖尿病を誘発した。糖尿病マウスにピリドキサミン (Pyr) (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を経口投与(500 mg/L)した群(STZ+Pyr)と非投与群(STZ)、さらに非糖尿病対照群(CNT)と糖尿病マウスに毎日インスリンを投与して血糖をコントロールした対照群(STZ+Ins)の計 4 群(各 5 匹)で実験を行った。0 日にマウス大腿骨遠位に骨孔をあけ、経時的に左大腿骨の CT を撮影し、骨孔の CT 値を測定した(Latheta LCT-200; Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan)。

In vitro

confluent まで培養したマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3 細胞) (Riken cell Bank, Tsukuba, Japan) に糖化ストレスの一つであるメチルグリオキサール反応性蛍光センサープローブ [Ir(2-phenylpyridine)₂(4, 5-diamino-1, 10-phenanthroline)] (以下 PF6) 25mM を投与し 7)、細胞外から代謝を調節するため、4 度もしくは 37 度の環境下で 3 時間培養後、顕微鏡での観察および PF6 の吸光度を測定した。また培地中のグルコース濃度を 5.5mM と 25mM、ピリドキサミン (Pyr) 濃度を 0mM もしくは 3mM とした 4 群にわけ、PF6 25mM を投与後 3 時間で共焦点顕微鏡での観察および PF6 の吸光度を測定した。同様の検討をマウス骨髄由来マクロファージを M-CSF/RANKL で刺激し得られた破骨細胞 (Osteoclasts: OCs) でも行なった。

次に新生仔マウスをコラゲナーゼで処理し、各分化培地で培養することで得られた primary の骨芽細胞の骨分化効果判定を行った。さらに同一の lysate を使用し同時に PF6 の吸光度を測定した。骨分化効果判定は 14 日目に ALP assay kit (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いて評価を行った。

4. 研究成果

STZ マウスでは健常マウスと比較し有意に骨修復過程が遅延し、ピリドキサミン投与にて改善された。また細胞実験では顕微鏡観察で、MC3、OCs いずれの細胞においても細胞質に均一に弱い PF6 の蛍光と核周囲の強い蛍光を認めた。高グルコース濃度で培養した 3 時間後には、その蛍光強度がいずれの細胞においても増加した。代謝を抑制するために 4 の低温環境下におくと蛍光強度が減少した。吸光度による定量を行っても有意であった。また、高グルコース濃度における蛍光強

度上昇は MG スカベンジャー 作用のある Pyr の処理によって有意に抑制できた。
骨分化能は高グルコース濃度群で低下しており、Pyr により骨分化能も改善しており、PF6 ; メ
チルグリオキサル濃度との関連が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hikichi Toshifumi, Matsubara Hidenori, Ugaji Shuhei, Hamada Tomo, Tsuchiya Hiroyuki	4. 巻 59
2. 論文標題 Large Osteochondral Defects of the Distal Tibia Plafond After Septic Arthritis of the Ankle Joint Treated by Arthrodiastasis and Iliac Bone Graft: A Case Report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Foot and Ankle Surgery	6. 最初と最後の頁 857 ~ 862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.jfas.2020.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato Satoshi, Kurokawa Yuki, Kabata Tamon, Demura Satoru, Matsubara Hidenori, Kajino Yoshitomo, Okamoto Yoshiyuki, Kimura Hiroaki, Shimura Kazuya, Igarashi Kentaro, Shimizu Takaki, Yonezawa Noritaka, Yokogawa Noriaki, Tsuchiya Hiroyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Improvement of locomotive syndrome with surgical treatment in patients with degenerative diseases in the lumbar spine and lower extremities: a prospective cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-020-03547-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Yasuhisa, Matsubara Hidenori, Kawashima Hiroki, Aikawa Takao, Ugaji Shuhei, Hamada Tomo, Tsuchiya Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Assessment of lateral hindfoot impingement with weightbearing multiplanar imaging in a flatfoot	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Radiologica Open	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2058460120945309	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Igarashi Kentaro, Yamamoto Norio, Hayashi Katsuhiko, Matsubara Hidenori, Takeuchi Akihiko, Miwa Shinji, Tsuchiya Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Distal Tibial Tuberosity Focal Dome Osteotomy Combined With Intra-Articular Condylar Osteotomy (Focal Dome Condylar Osteotomy) for Medial Osteoarthritis of the Knee Joint	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthroscopy Techniques	6. 最初と最後の頁 e1079 ~ e1086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.eats.2020.04.004	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松原秀憲, 土屋弘行	4. 巻 78
2. 論文標題 仮骨延長法を用いた骨再建	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 352-356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松原秀憲, 相川敬男, 吉田泰久, 宇賀治修平, 渡邊孝治, 土屋弘行	4. 巻 41
2. 論文標題 自家骨棘移植を用いた遠位脛骨斜め骨切り術の1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日足の外科学会誌	6. 最初と最後の頁 362-365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松原秀憲, 濱田知, 引地俊文, 土屋弘行	4. 巻 41
2. 論文標題 遠位脛骨斜め骨切り術が膝アライメントに与える影響についての検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日足の外科学会誌	6. 最初と最後の頁 139-141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamada T, Matsubara H, Yoshida Y, Ugaji S, Tsuchiya H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Comparison of treatment indices associated with the correction and lengthening of deformities along various lower limb frontal plane directions.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Orthop Trauma	6. 最初と最後の頁 57-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcot.2019.01.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi A, Yamamoto N, Hayashi K, Matsubara H, Miwa S, Igarashi K, Tsuchiya H	4. 巻 38
2. 論文標題 Joint-preservation surgery for pediatric osteosarcoma of the knee joint.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Metastasis Rev.	6. 最初と最後の頁 709-722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10555-019-09835-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato S, Demura S, Kurokawa Y, Shinmura K, Yokogawa N, Yonezawa N, Shimizu T, Oku N, Kitagawa R, Matsubara H, Kabata T, Tsuchiya H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Correlation between osteoporotic vertebral fracture and abdominal trunk muscle strength in middle-aged and older women.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arch Osteoporos	6. 最初と最後の頁 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11657-019-0654-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato S, Demura S, Matsubara H, Inaki A, Shinmura K, Yokogawa N, Murakami H, Kinuya S, Tsuchiya H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Utility of bone SPECT/CT to identify the primary cause of pain in elderly patients with degenerative lumbar spine disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Orthop Surg Res	6. 最初と最後の頁 185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13018-019-1236-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamada T, Matsubara H, Yoshida Y, Ugaji S, Nomura I, Tsuchiya H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Autologous adipose-derived stem cell transplantation enhances healing of wound with exposed bone in a rat model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0214106	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 -

1. 著者名 Takeuchi A, Matsubara H, Yamamoto N, Hayashi K, Miwa S, Igarashi K, Inatani H, Tsuchiya H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Successful treatment of pathologic femoral shaft fracture associated with large arteriovenous malformations using a 3-dimensional external fixator and teriparatide: a case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Surg	6. 最初と最後の頁 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12893-019-0498-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Y, Matsubara H, Fang X, Hayashi K, Nomura I, Ugaji S, Hamada T, Tsuchiya H	4. 巻 14
2. 論文標題 Adipose-derived stem cell sheets accelerate bone healing in rat femoral defects.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0214488	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 -

1. 著者名 Matsubara H, Tsuchiya H	4. 巻 24
2. 論文標題 Treatment of bone tumor using external fixator.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Orthop Sci	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2018.06.022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 松原秀憲, 濱田知, 引地俊文, 土屋弘行
2. 発表標題 遠位脛骨斜め骨切り術が膝アライメントに与える影響についての検討
3. 学会等名 日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松原秀憲, 野村一世, 濱田知, 引地俊文, 土屋弘行
2. 発表標題 先天性脛骨偽関節症の骨癒合後に対する脛骨仮骨延長術
3. 学会等名 日本創外固定・骨延長学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松原秀憲, 高田宗知, 濱田知, 引地俊文, 下川寛右, 土屋弘行
2. 発表標題 骨形成における力学刺激について
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松原秀憲, 引地俊文, 下川寛右, 土屋弘行
2. 発表標題 内側アプローチによる足関節固定術
3. 学会等名 日本足の外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsubara H, Ugaji S, Hamada T, Hikichi T, Tsuchiya H
2. 発表標題 The treatment of osteomyelitis using alpha-tricalcium phosphate impregnated with antibiotics
3. 学会等名 Combined Congress of the ASAMI-BR & ILLRS societies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsubara H, Hamada T, Hikichi T, Tsuchiya H
2. 発表標題 Deformity correction and lengthening for the treatment of benign bone tumors using external fixation
3. 学会等名 Annual Congress of the Korean Orthopaedic Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松原秀憲、高田宗知、宇賀治修平、濱田知、土屋弘行
2. 発表標題 整形外科多領域における電気・物理刺激の応用 骨形成における力学刺激について
3. 学会等名 第 92回 日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松原秀憲、宇賀治修平、濱田知、土屋弘行
2. 発表標題 化膿性骨髄炎に対する抗生剤含有リン酸カルシウム骨ペーストによる治療経験
3. 学会等名 第32回 日本創外固定・骨延長学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松原秀憲、宇賀治修平、濱田知、引地俊文、土屋弘行
2. 発表標題 遠位脛骨斜め骨切り術が膝アライメントに与える影響についての検討
3. 学会等名 第44回 日本足の外科学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究 分担 者	山本 靖彦 (Yamamoto Yasuhiko) (20313637)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	

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