

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18522

研究課題名（和文）高気圧酸素療法による異所性骨化の制御

研究課題名（英文）The effects on heterotopic ossification by hyperbaric oxygen treatment

研究代表者

湯浅 将人（Yuasa, Masato）

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・非常勤講師

研究者番号：80808254

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：外傷性筋肉内異所性骨化という難課題は今だとして完全に解明されていないが、今回、化学薬剤ではあるものの動物モデルを用いて、骨格筋肉内に骨化病変を作製することができた。それにより、血液凝固系異常が異所性骨化に何らかの寄与があるというきっかけを得た。治療法の開発として、高気圧酸素治療が有効である可能性を見出すことができた。もしこのモデルが確立できれば高気圧酸素療法の有用性をヒトでも確かめられる可能性もあり、今後異所性骨化の大いなる治療法になりうる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷後に生じる筋肉内異所性骨化はに対し、ゴールドスタンダードな治療法が確立されておらず、局所に痛みが生じ、ADLを著しく妨げる臨床像として問題となっている。しかしながらその治療法は、異所性骨化を意図的に作成することが困難だったことがゆえに、開発が滞っていた。今回動物モデルを用いて異所性骨化を人為的に作製することができ、さらに高気圧酸素療法を動物にも使用できることが示されたため、今後創薬などの研究が進められるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The difficult problem of traumatic intramuscular ectopic ossification has not yet been fully elucidated, but this time, although it is a chemical agent, we were able to create ossified lesions in the muscles. As a result, it was obtained that abnormalities in the blood coagulation system contribute to ectopic ossification. Furthermore, as a treatment method, we were able to obtain the possibility that hyperbaric oxygen therapy is effective.

研究分野：異所性骨化

キーワード：異所性骨化 血液凝固線溶系 高気圧酸素療法

1. 研究開始当初の背景

本来形成されるべきでない軟部組織中に形成される骨形成を異所性骨化という。筋組織挫傷を含む軟部組織外傷後に異所性骨化を生じることがある。この異所性骨化は、熱傷や重度の筋挫傷のみならず、手術による侵襲、また脊髄損傷後に発生するとされている。一度異所性骨化が生じると、局所の痛み、重度の可動域の制限などが出現し、日常生活に多大な弊害となる。さらに、その治療は、現在のところ対症療法のみといってよく、今後異所性骨化に対する予防的さらに根治的な治療法の開発が望まれる。

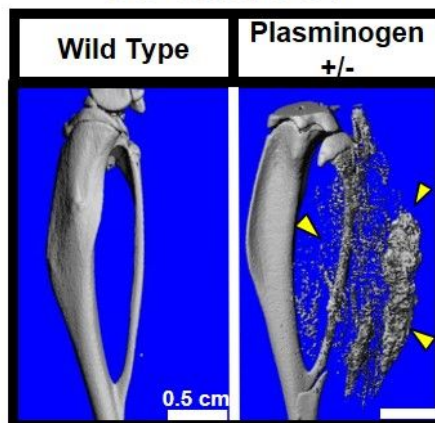
これまで様々な研究がされているが、残念ながら治療法に関して言えば、四半世紀は変化のないものと言っていい。その理由の1つとしてあげられるのが、In vivo 異所性骨化モデルの欠落である。骨形成蛋白であるBMPを遺伝子工学的に修飾したり、局所投与するなどして形成した異所性骨化モデルはあるが、不十分である。

2. 研究の目的

我々の新しい発見であるが、以前血液凝固線溶系の修飾マウスが、容易に作成できる異所性骨化モデルであることを国際科学報告している (*Mignemi NA, Yuasa M, Okawa A, Schoenecker JG et al. Plasmin Prevents Dystrophic Calcification after Muscle Injury. J Bone Miner Res. 2017*)。マウスの下腿三頭筋にカーディオトキシン(ヘビ毒、以下CTX)を注射すると筋挫傷モデルが作成できるのは過去の報告にあるが、それを、線溶系蛋白であるプラスミンの前駆体であるプラスミノゲン遺伝子欠損マウス (PlgKO)の下腿三頭筋にCTXを注射すると数時間後に筋肉内石灰化を生じる。それを経時的に追っていくと軟骨形成を経て骨細胞を有する骨化を形成する。一方野生型において、筋挫傷は起こるものの、過去の報告にある通り一週間から10日かけて自然修復する。この異所性骨化現象はプラスミノゲンヘテロ欠損 (PlgHet) マウスにおいても起こり (*Figure1*) その程度はPlgKOと比較し軽度となっておりDose Dependentな傾向が見られた。このマウスの革新的なのはBMP非依存性に骨化を生じることである。この新しい発見より、凝固系線溶系を制御することが異所性骨化の制御にとって重要ということが示唆された。しかし残念ながら、異所性骨化に対する根本的な治療法は確立するには至っていない。

異所性骨化の形成方法は諸説あるが、今回のPlgKOマウス同様内軟骨骨化説が多い。内軟骨骨化は軟骨を介した骨化プロセスであるが、軟骨形成の際に低酸素いわゆるHypoxia状態となる。(Agarwal S, et al. *Inhibition of Hif1alpha prevents both trauma-induced and genetic heterotopic ossification. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016*) Hypoxia環境のもと軟骨形成がおきる。言い換えればHypoxia状態を作れなければ軟骨は形成されず、骨化にも至らないということになる。

Figure 1
3D microCT



CTX注射後4週

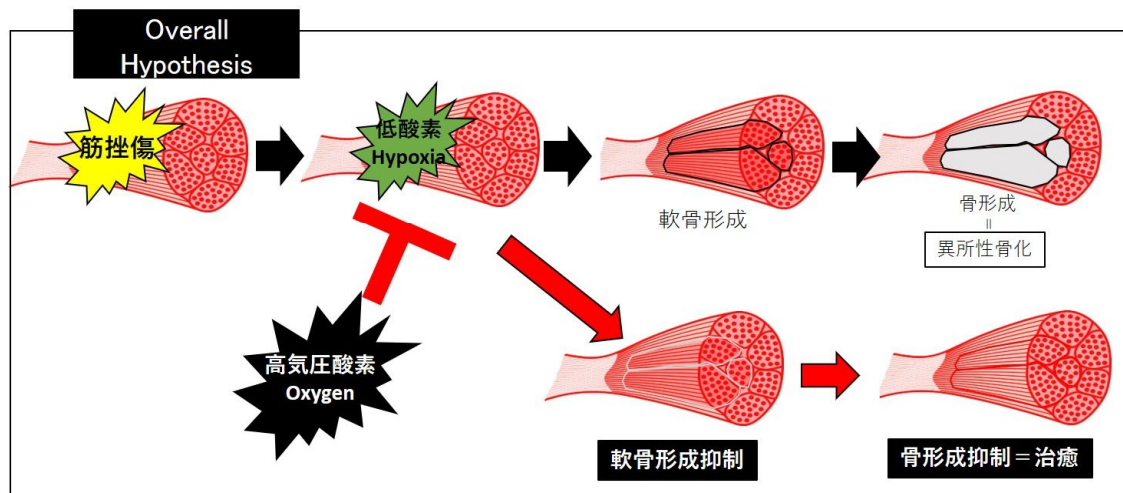
われわれの独自性であるが、その予防ならびに治療法として高気圧酸素療法 (HyperBaric Oxygen therapy 以下HBO療法) に着目した。HBOとは、圧力の高い部屋で100%の酸素を吸入し、全身に酸素を供給する治療である。一定時間100%酸素下にいることにより、血液中に酸素が溶解し、この「溶解型酸素」により、治療効果が発揮されるというものである。我々の施設では日本一の高気圧酸素タンクを有し、高気圧酸素治療チームの元、減圧症や難治性潰瘍、スポーツ外傷など幅広い治療を行っている。さらに基礎的実験も行っており、マウスやラットを収容できる高気圧酸素タンク (HBOタンク) をも開発し (Figure2)、特に急性の筋損傷に焦点を当て動物を用いた研究を行い過去に国際科学誌に多数報告している (*Hyperbaric oxygen reduces inflammation, oxygenates injured muscle, and regenerates skeletal muscle via macrophage and satellite cell activation.* Oyaizu T, Okawa A, Yagishita K. *Sci Rep.* 2018)。

Figure2



今回我々は、異所性骨化マウスにおいて、筋損傷後HBO療法を行うことにより、受傷部位のHypoxia状態を防ぐことができ、それによって軟骨形成を抑制し、結果的に骨形成すなわち異所性骨化を抑制できるのではないかと仮説を立てた (Figure3)。

Figure3



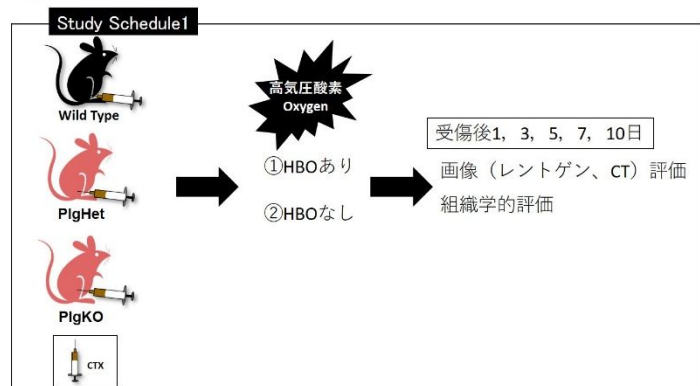
我々の究極な到達目標は、異所性骨化を起こしうる患者様をHBO療法によって予防することにある。その裏付けとして、今回HBO動物用HBOタンクを利用し、われわれの開発したIn vivo異所性骨化モデルを使い、HBOが異所性骨化を抑制する可能性を確認し、そのメカニズムについて検証する。

3 . 研究の方法

われわれが開発したIn vivo異所性骨化モデルを用いて、HBO療法を行い、軟骨形成ならびに骨化形成が抑制されるかを画像的、また組織学的に検証する

(方法)野生型マウス(WTマウス)とプラスミノゲン欠損マウス(PlgKOマウス)さらにプラスミノゲンヘテロ欠損マウス(PlgHetマウス)の3群にわけ、下腿筋にCTXを同量注射し、その後、HBO療法あり群とHBO療法なし群に分け、検証する (Figure4)。受傷後1日、3日、5日、7日、10日で検証する。

Figure4



HBO療法の至適時期を検証する

(方法) と同様な群分けをするが、HBO開始の時期として、受傷後直後、受傷後1日後、3日後、5日後、7日後に分け、その違いを検証し、実際の至適開始時期を検討する。

メカニズムの検証

(方法)HBO療法により、分子細胞的メカニズムをさぐる。具体的には、細胞は筋細胞、軟骨細胞、骨芽細胞に、さらに筋損傷後の石灰化に焦点を当て、メカニズムを探る。局所の酸素濃度なども裏付けとして測定する。

4. 研究成果

血液凝固線溶系遺伝子改変マウスを用いて、In vivoでの異所性骨化モデルを作成した。具体的には、マウスの下腿三頭筋にカーディオトキシン(ヘビ毒、以下CTX)を注射することにより、数時間で外傷性の筋肉内石灰化を作り出した。注射後レントゲンにて下肢の側面像にて確認できることを確立をしている。過去の自験例において認められたように、今回の実験においても野生型マウスにおいては1, 3, 5, 7日どの時期においても筋肉内石灰化は認めなかった。プラスミノゲン欠損マウスにおいては、注射後1日からすでに石灰化を認め、3, 5, 7日も持続的に石灰化を認めた。プラスミノゲン欠損ヘテロマウスにおいては、1, 3, 5, 7日に石灰化を認めはするものの、ノックアウトマウスとの比較ではその面積は少なかった。さらに受傷筋肉を摘出し、組織学的にも評価している。結果、野生型マウスにおいては、注射後筋肉内筋組織の壊死、ならびに周囲に炎症細胞が遊走している切片を認めたものの、時系列とともに筋肉の再生を多く認めた。一方プラスミノゲン欠損マウスにおいて、初期の段階から筋肉の壊死、ならびに石灰化と認めていた。さらに一部軟骨様組織がけいせいされており、その軟骨組織周囲ならびに、石灰化組織の周辺にはマクロファージや破骨細胞(TRAP染色)さらに骨芽細胞用のLining Cellの存在を認め、骨形成(内軟骨骨化性異所性骨化)の可能性を認めた。HBO療法を行い、軟骨形成ならびに骨化形成が抑制されるかを画像的1日、3日、5日、7日、10日で検証したが、画像的に差を見出すまでには至っていない。原因として注射の部位や量、薬液の広がりなどで個体でばらつきもあり、この今後の高圧酸素治療の効果を検証するのにこの薬剤性外傷モデルをさらに確立する必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yamamoto Naoki, Oyaizu Takuya, Enomoto Mitsuhiro, Horie Masaki, Yuasa Masato, Okawa Atsushi, Yagishita Kazuyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 VEGF and bFGF induction by nitric oxide is associated with hyperbaric oxygen-induced angiogenesis and muscle regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2744
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-59615-x	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 湯浅将人
2. 発表標題 腰椎固定術後の隣接椎間障害のリスクファクター：“L3 Slope”に着目する
3. 学会等名 日本整形外科学会
4. 発表年 2022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
---------	---------