

機関番号：22701
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591763
 研究課題名 (和文) 骨折治癒における末梢血由来細胞関与のメカニズムと低出力超音波による作用促進の研究
 研究課題名 (英文) Homing of circulating osteogenic progenitors to sites of fracture repair under the low-intensity pulsed ultrasound treatment
 研究代表者
 齋藤 知行 (SAITO TOMOYUKI)
 横浜市立大学・医学研究科・教授
 研究者番号：30170517

研究成果の概要 (和文)：GFP マウスと野生株マウスを体側で結合する parabiosis ペアを作製し、末梢血のキメリズムを形成後、野生株マウスに骨膜除去を伴う難治性骨折を作製した。骨折部に低出力超音波照射を行った結果、骨折治癒が促進され、GFP 陽性骨前駆細胞のホーミングが観察された。本研究により、低出力超音波刺激が難治性骨折モデルの骨形成を促進し、そのメカニズムの一つとして骨前駆細胞の骨折部へのホーミングを促進することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：A parabiotic model was created by surgically conjoining one transgenic GFP mouse and one wild-type partner. After shared circulation was established, a transverse fracture with periosteal stripping was created in the contralateral diaphysial femur of the wild-type partner. The fracture site was treated with daily exposure of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS). GFP+ cells that gained access to the osteotomy site via the systemic circulation were identified in the bone-forming site. The findings suggested that LIPUS induced homing of circulating osteogenic progenitors to the osteotomy site for possible contribution to new bone formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨折治癒，低出力超音波，末梢血由来細胞，ホーミング，骨形成促進効果

1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性骨折と総称される遷延治癒骨折や偽関節では、局所において膜性骨化および軟骨性骨化に関与する細胞の供給は制限されていると考えられる。近年、前駆細胞も含めた骨芽細胞系の細胞が骨組織や骨髄内のみならず、末梢血中にも存在することが示唆され、新しい細胞供給源として、その生理的な役割について注目を集めている。

(2) 本研究分担者である熊谷らは、骨折治癒の新しいメカニズムとして、末梢血中に生理学的に存在する骨芽細胞系の細胞が骨折修復に関与することを報告している。

(3) 低出力超音波 (LIPUS) による骨折治癒促進機転の詳細は少しずつ解明されてきているが、未だ不明な点が多い。LIPUS が骨折治癒を促進するメカニズムに関するこれま

での報告は、細胞培養実験における細胞分化・増殖の促進や動物実験における局所作用に関するものが主なものである。骨折治癒過程の経時的変化という点においては、各相において様々な細胞反応が促進されると報告されているが、LIPUS による骨折治癒促進効果と末梢血由来細胞関与についての報告はない。

(4) 臨床の場合において、安全かつ比較的簡便な方法で骨組織を修復させる手段として LIPUS が実用化されている。

2. 研究の目的

(1) 骨折治癒過程における末梢血由来細胞関与のメカニズムは我々がこれまでに示した最新の知見であるが、この点に焦点を絞り、「LIPUS が末梢血由来細胞の骨折部へのホーミングを増大し、骨折治癒を促進する」という仮説を検証する。

(2) 局所の細胞供給が制限されていると考えられる難治性骨折モデルにおいて LIPUS による末梢血由来細胞のホーミング効果を評価する。

(3) 骨折治癒促進効果のメカニズムとして、ホーミングの関与による LIPUS の応用を検討する。

3. 研究の方法

(1) 末梢循環中に存在する細胞のトラッキング：末梢血由来の細胞を同定するため、Green Fluorescence Protein(GFP) をマーカーとして用い、野生株マウスの末梢血において GFP 陽性細胞のキメラを作製した。具体的には GFP トランスジェニックマウスと野生株マウスとを体側で結合させ末梢循環を共有する parabiosis を作製した。

(2) 骨折遷延治癒モデルの作製：末梢血において GFP 陽性細胞のキメラを形成した parabiosis ペアの野生株マウス大腿骨を骨幹部で骨切りし、骨切り部より両端の関節包までそれぞれ骨膜を取り除き、髓内固定した。

(3) 低出力超音波 (LIPUS) 照射による骨折部への物理的刺激：骨折作製後、翌日より連日で麻酔下に骨折部へ 1 日 20 分間の低出力超音波照射を行った (LIPUS 群)。超音波照射を行わないものを対照群とした。2 週および 4 週で検体を採取し、組織標本作製した。HE 染色を行い骨折部の形態を観察した。アルカリフォスファターゼ染色により、骨形成の活性と GFP 陽性骨前駆細胞の骨折部へのホーミングを評価した。

4. 研究成果

(1) parabiosis 術後より末梢循環の共有を開始し、約 2-3 週間でパートナー間の末梢血由来 GFP 陽性細胞率はほぼ同等に達した。骨折は parabiosis 後 3 週で作製され、その後も安定した状態で末梢血のキメラは維持された。(図 1)

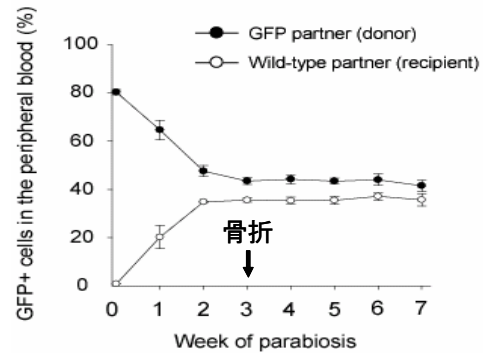


図 1 parabiosis における末梢血キメラの形成

(2) LIPUS 群、対照群ともに骨折部周囲の仮骨形成は不良であった。骨外部 (髓外) では骨膜による骨形成は認められなかった。超音波群では骨折部の近くで髓内に骨形成が観察された。この部位においてアルカリフォスファターゼの活性も観察された。対照群では髓内での骨形成は観察されなかった。(図 2)

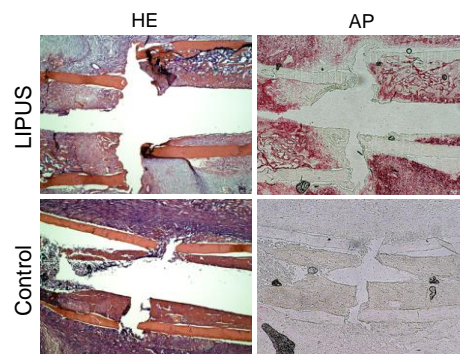


図 2 骨折後 2 週における骨折部周囲の組織像

(3) 骨折部の髓内を中心からの距離 0-0.5mm (中心部) と 0.5-1.0mm (周辺部) の領域に分けてアルカリフォスファターゼ活性を示す面積を計測した結果、中心部では骨折後 2 週、4 週において、周辺部では骨折後 2 週で LIPUS 群の方が対照群より有意に大きかった。(図 3)

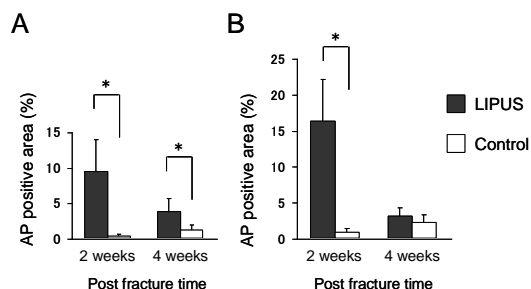


図3 アルカリフォスファターゼ活性を示す領域
A: 中心部 B: 周辺部

(4) LIPUS 群では骨折部において GFP 陽性細胞が多数観察されたが、これらは同時にアルカリフォスファターゼ活性も示した。(図4)

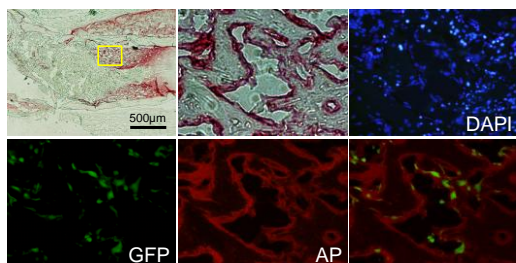


図4 LIPUS 群の骨折部における組織像

(5) 本研究により、低出力超音波治療で骨膜除去を伴うマウス大腿骨骨折モデルの髄内での骨形成が促進されることが示唆された。本研究結果はまた、低出力超音波治療が骨前駆細胞の骨折部へのホーミングを促進することも示した。骨折において局所の骨前駆細胞供給が制限される場合、骨形成は制限される。低出力超音波刺激により、骨前駆細胞のホーミングが促進され、細胞供給不足を代償した可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

1. Yamazaki Y, Kanno H, Maeda K, Yoshida T, Kobayashi N, Kubo A, Yamaguchi Y, Saito T. Engrafted VHL peptide-delivered bone marrow stromal cells promote spinal cord repair in rats. *Neuroreport*. 2010;21(4):287-92. (査読有り)
2. Ito R, Kanno H, Takahashi A, Matsumoto R, Kobayashi N, Yoshida T, Saito T. Efficient growth inhibition of human osteosarcoma cells using a peptide

derived from the MDM-2-binding site of p53. *Protein Pept Lett*. 2010;17(5):610-5. (査読有り)

3. Umemoto Y, Oka T, Inoue T, Saito T. Imaging of a rat osteoarthritis model using (18)F-fluoride positron emission tomography. *Ann Nucl Med*. 2010 [Epub ahead of print] (査読有り)
4. Takeuchi R, Umemoto Y, Aratake M, Bito H, Saito I, Kumagai K, Sasaki Y, Akamatsu Y, Ishikawa H, Koshino T, Saito T. A mid term comparison of open wedge high tibial osteotomy vs unicompartmental knee arthroplasty for medial compartment osteoarthritis of the knee. *J Orthop Surg Res*. 2010;5(1):65. (査読有り)
5. Takeuchi R, Bito H, Akamatsu Y, Shiraishi T, Morishita S, Koshino T, Saito T. In vitro stability of open wedge high tibial osteotomy with synthetic bone graft. *Knee*. 2010;17(3):217-20. (査読有り)
6. Bito H, Takeuchi R, Kumagai K, Aratake M, Saito I, Hayashi R, Sasaki Y, Saito T. Opening wedge high tibial osteotomy affects both the lateral patellar tilt and patellar height. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010;18(7):955-60. (査読有り)
7. Maeda K, Kanno H, Yamazaki Y, Kubo A, Sato F, Yamaguchi Y, Saito T. Transplantation of Von Hippel-Lindau peptide delivered neural stem cells promotes recovery in the injured rat spinal cord. *Neuroreport*. 2009;20(17):1559-63. (査読有り)
8. Akamatsu Y, Mitsugi N, Taki N, Takeuchi R, Saito T. Relationship between low bone mineral density and varus deformity in postmenopausal women with knee osteoarthritis. *J Rheumatol*. 2009;36(3):592-7. (査読有り)
9. Bito H, Takeuchi R, Kumagai K, Aratake M, Saito I, Hayashi R, Sasaki Y, Aota Y, Saito T. A predictive factor for acquiring an ideal lower limb realignment after opening-wedge high tibial osteotomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2009;17(4):382-9. (査読有り)
10. Takeuchi R, Aratake M, Bito H, Saito I, Kumagai K, Hayashi R, Sasaki Y, Akamatsu Y, Ishikawa H, Amakado E, Aota Y, Saito T. Clinical results and radiographical evaluation of opening wedge high tibial osteotomy for

- spontaneous osteonecrosis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009; 17(4):361-8. (査読有り)
11. Takeuchi R, Ishikawa H, Aratake M, Bito H, Saito I, Kumagai K, Akamatsu Y, Saito T. Medial opening wedge high tibial osteotomy with early full weight bearing. *Arthroscopy.* 2009; 25(1):46-53. (査読有り)
 12. Kobayashi N, Inaba Y, Choe H, Aoki C, Ike H, Ishida T, Iwamoto N, Yukizawa Y, Saito T. Simultaneous intraoperative detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* and pan-bacterial infection during revision surgery: use of simple DNA release by ultrasonication and real-time polymerase chain reaction. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(12):2896-902. (査読有り)
 13. Kobayashi N, Inaba Y, Choe H, Iwamoto N, Ishida T, Yukizawa Y, Aoki C, Ike H, Saito T. Rapid and sensitive detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* periprosthetic infections using real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;64(2):172-6. (査読有り)
 14. Aratake M, Yoshifumi T, Takahashi A, Takeuchi R, Inoue T, Saito T. Evaluation of lesion in a spontaneous osteonecrosis of the knee using 18F-fluoride positron emission tomography. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009;17(1):53-9. (査読有り)
 15. Yamashita T, Aota Y, Kushida K, Murayama H, Hiruma T, Takeyama M, Iwamura Y, Saito T. Changes in physical function after palliative surgery for metastatic spinal tumor: association of the revised Tokunishi score with neurologic recovery. *Spine.* 2008;33(21):2341-6. (査読有り)
 16. Takeuchi R, Saito T, Koshino T. Clinical results of a valgus high tibial osteotomy for the treatment of osteoarthritis of the knee and the ipsilateral ankle. *Knee.* 2008;15(3):196-200. (査読有り)
 17. Kumagai K, Vasanthi A, Drazba JA, Butler RS, Muschler GF. Circulating cells with osteogenic potential are physiologically mobilized into the fracture healing site in the parabiotic mice model. *J Orthop Res.* 2008; 26(2):165-75. (査読有り)
 18. Patterson TE, Kumagai K, Griffith L, Muschler GF. Cellular strategies for enhancement of fracture repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2008; 90 Suppl 1:111-9. (査読有り)
- [学会発表] (計 5 件)
1. Kumagai K, Takeuchi R, Ishikawa H, Yamaguchi Y, Fujisawa T, Kuniya T, Takagawa S, Saito T. Bone formation and homing of circulating connective tissue progenitors at fracture site were enhanced by low-intensity pulsed ultrasound. 7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies, Kyoto, October 16-20, 2010
 2. Kumagai K, Takeuchi R, Ishikawa H, Saito I, Yamaguchi Y, Chiba N, Takagawa S, Saito T. Recruitment of recipient derived osteogenic connective tissue progenitors to β -tricalcium phosphate scaffold combined with bone marrow cells. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, New Orleans, March 6-9, 2010
 3. 熊谷研, 竹内良平, 荒武正人, 齋藤泉, 尾藤晴彦, 林陸, 佐々木洋平, 齋藤知行. 骨膜除去骨折モデルへの低出力超音波刺激による骨形成促進と末梢血由来骨前駆細胞の関与. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会, 横浜, 2009 年 11 月 5-6 日.
 4. Kumagai K, Takeuchi R, Ishikawa H, Saito I, Yamaguchi Y, Chiba N, Takagawa S, Saito T. Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Intramedullary Bone Formation and Homing of Circulating Connective Tissue Progenitors in Fracture with Periosteal Stripping. 31st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, CO, September 11-15, 2009
 5. Kumagai K, Takeuchi R, Aratake M, Saito I, Bito H, Sasaki Y, Saito T. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates intramedullary bone formation and homing of circulating connective tissue progenitors at fracture site with periosteal stripping in mice. 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Las Vegas, NV, February 22-26, 2009
6. 研究組織
(1) 研究代表者
齋藤 知行 (SAITO TOMOYUKI)

横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：30170517

(2) 研究分担者

熊谷 研 (KUMAGAI KEN)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：10468176

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

George F Muschler
Cleveland Clinic, Orthopaedic Research
Center, Director (USA)