

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18030

研究課題名(和文)人為的体内時計の調節を利用した新たな骨折治療法の開発

研究課題名(英文) Nobel strategy and elucidation in fracture healing using Modulating Circadian rhythm

研究代表者

野口 貴志 (NOGUCHI, TAKASHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50736642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体の持つ体内時計(概日リズム)は時計遺伝子によって制御されている。血圧変化、ホルモン分泌や行動など、概日リズムが反映する。骨折治癒過程でも時計遺伝子の関与が示されている。本研究では、骨癒合遅延モデルとして糖尿病マウスに骨折を作成した。糖尿病では時計遺伝子の発現が変化するが、メラトニン投与により人為的な概日リズム調節を試みて、骨癒合を促進するか正常群含め比較検討した。結果、正常、糖尿病群、メラトニン投与群で骨折部の時計遺伝子の発現に変化が見られた。しかし、 $\mu$ CT、組織学的評価では、骨癒合遅延はメラトニン投与で改善せず、糖尿病に関連する骨癒合遅延は、糖尿病の治療が重要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は、罹病者数が非常に多い疾患であり、それに関連した有害事象も多い。今回の研究成果は、改めて糖尿病の治療の重要性を示すものであり、骨代謝に対しても糖尿病は多大な影響力を持つ。メラトニン投与により時計遺伝子の発現変化が示されたことは、薬剤投与が時計遺伝子を変動できる可能性を示しており、他の概日リズムによる生体反応への介入に応用できるかもしれない。

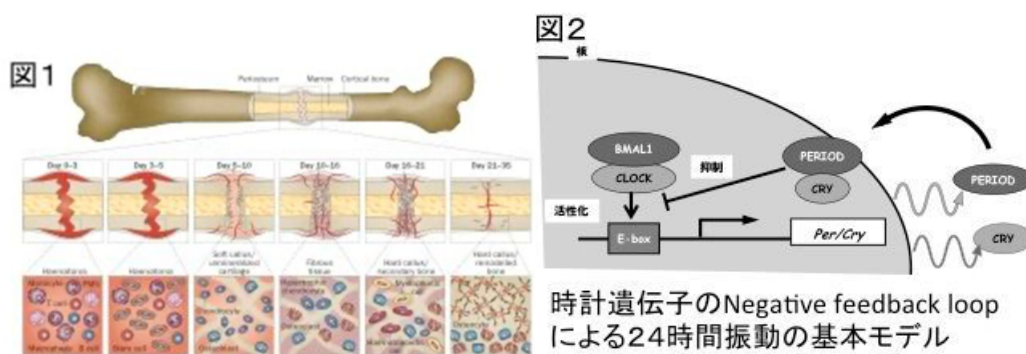
研究成果の概要(英文)：The biological clock (circadian rhythm) is controlled by clock genes. Changes in blood pressure, hormone secretion, and behavior reflect circadian rhythms. Clock genes have also been shown to be involved in the process of bone fracture healing. In this study, fractures were created in diabetic mice as a model of delayed bone healing. We attempted to artificially regulate circadian rhythms by administering melatonin, and compared the results with those of the normal group to see if it would promote bone healing. The results showed that the expression of clock genes at the fracture site was altered in the normal, diabetic, and melatonin-treated groups. However,  $\mu$ CT and histological evaluation showed that delayed bone healing was not improved by only melatonin administration, suggesting that treatment of diabetes mellitus is important for diabetes-related delayed bone healing.

研究分野：整形外科

キーワード：骨折 概日リズム 糖尿病 メラトニン

## 1. 研究開始当初の背景

近年の日本社会は高齢化が著しく、大腿骨近位部骨折は年間 15 万件以上発生する高頻度の疾病である。骨折が生じた場合、図 1 のように一定期間かけて仮骨が形成され、骨癒合が獲得される。この過程が障害されると骨癒合不全や偽関節となる。骨癒合がどのように進行するかを解明することは、骨癒合不全、偽関節の病態解明と骨癒合促進法の開発につながる。研究代表者は、骨癒合と時計遺伝子に関連性を見出し、報告した。時計遺伝子とは、生体の体内時計を調節する遺伝子で、Negative Feedback による調節機構がある。時計遺伝子の発現と代謝は相互に影響していると考えられている。



## 2. 研究の目的

人為的な時計遺伝子の調整が骨癒合を促進し、骨折治療において従来とは別の新治療戦略となりうることを示すこと。

## 3. 研究の方法

本実験は、京都大学医学部動物実験委員会の承認を得て行った。

### (1) 使用動物 C57/BL6J マウス 6-8 週齢 オス

マウスを 1 コントロール群(正常)、2 糖尿病(無治療)群、3 糖尿病(メラトニン投与体内時計調整)群の 3 群に無作為に分けた。さらに、4 糖尿病(メラトニン高用量投与)群を作成した。時計遺伝子の発現は骨折後 10 日で行い、1 から 3 群を使用した。また、骨折部の評価は 1 から 4 群で行った。

### (2) 骨折モデルの作成

過去の報告に準じた脛骨骨幹部骨折を作成する手術を行う(Bragdon et al. Curr Prot Mouse Biol. 2016)。骨折部の安定化と転位防止に髓内に軟鋼線を挿入する。

### (3) 糖尿病の誘導方法

高脂肪食を手術前 14 日前から給餌する。高脂肪食については手術の段階で通常食へ戻した。さらに高脂肪食開始時にストレプトゾシン(30mg/kg)を注射して高血糖状態を誘発した。

### (4) 体内時計の調整

3 群にはメラトニン 10mg/kg/day を、高用量群には 60mg/kg/day を日に一度、時間を決めて皮下注射する。その他の群の個体には同様に生理食塩水を投与する。(骨折手術 3 日前から 7 日目で終了する)

### (5) 評価のタイミングと方法

骨折後 10 日と 28 日に屠殺して標本を採取する。

#### 骨折後 10 日のサンプル

遺伝子発現評価のための組織採取: 心臓 骨折部化骨

各群 骨折後 10 日において時計遺伝子の発現の評価のために、タイムポイントを定め、時間通りに屠殺しサンプルを採取した。朝 8 時を開始 (0 時間目)として、6 時間ごと、24 時間後までの 5 つのタイムポイントとした(0、6、12、18、24 時間)。採取した標本は直ちに液体窒素処理で冷凍保存し、後日 RNA を抽出した。RNA は逆転写ののち qPCR にて、時計遺伝子(Per1,2, Bmal1)の発現を評価した。

#### 骨折後 21 日のサンプル

各群の骨折モデルから骨折後 21 日で脛骨を採取し(各群 n = 6)、骨癒合を評価する目的で、 $\mu$ CT による形態学的評価、さらに組織学的評価(safranin O 染色、免疫組織化学 (RANKL, PPAR ))により各群の骨癒合と骨代謝を評価した。

#### 4 . 研究成果

骨折後 10 日の化骨及び心臓を採取し、時計遺伝子の発現を qPCR にて評価した。Per1, Per2, Bmal1 の時計遺伝子は、糖尿病モデルにおいてコントロール群よりも有意に発現が上昇した ( $p < 0.05$ )。メラトニン投与によりさらに発現が増大することがあった (図 3)。コントロールより骨癒合遅延群における時計遺伝子の発現上昇は、リン酸制限が骨癒合遅延を示した報告者の以前の研究でも見られた現象であった。

骨折後 21 日の骨折部は、いずれも良好な骨癒合傾向を示した。しかし、高用量メラトニン投与群では骨化の遅れた部分を認めた。 $\mu$ CT による骨癒合評価では、BV/TV という数値でコントロール群が有意に良好であった ( $p < 0.05$ ) (図 4)。骨折部の RANKL 免疫染色では、コントロール群に比較し、糖尿病、糖尿病メラトニン投与群、高用量メラトニン投与群といずれもが有意に陽性細胞が少なかった ( $p < 0.05$ )。PPAR の発現は、糖尿病モデルの骨折部において増加傾向であり、BV/TV の低下の一因と思われた。

以上の結果より、糖尿病により骨折骨癒合は RANKL 発現の低下など骨代謝が低下し、遅延する。化骨形成はされるが PPAR の発現上昇により骨化が遅延している可能性がある。糖尿病マウスに対してメラトニン投与をすると、骨折部や心臓で時計遺伝子の変化は生じるが、その投与量を増やしても骨癒合が促進される効果は乏しい。糖尿病に誘引される骨癒合遅延は、薬剤による体内時計の変化だけでは治療抵抗性で、良い骨癒合のためには、糖尿病の治療が適切に行われることが最も重要であると考えられる。

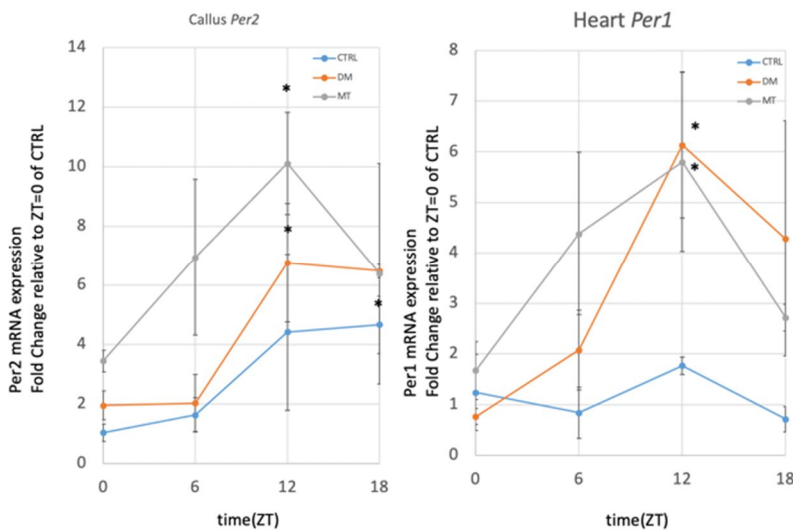


図 3

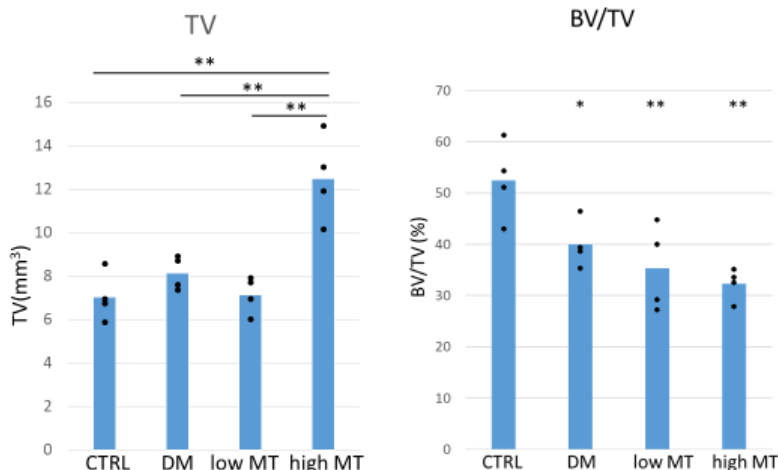


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 吉元孝一 野口貴志 安藤麻紀 坂本大地 岩井輝修 池口良輔 松田秀一
2. 発表標題 糖尿病モデルマウスにおける薬剤による時計遺伝子調節と骨癒合への影響
3. 学会等名 第38回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------