

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09237

研究課題名（和文）外傷性異所性骨化の病態解明と新規治療法の探索

研究課題名（英文）Pathophysiology of heterotopic ossification and search for novel therapies.

研究代表者

岩本 卓士（Iwamoto, Takuji）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授

研究者番号：10348675

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）：外傷性異所性骨化は、打撲、骨折、脱臼などの外傷後に関節周辺に発生し、関節可動域を制限する深刻な問題である。本研究では、外傷性異所性骨化の病態解明と新規治療法の探索を目的とした。異所性骨化モデルマウスを用い、TNF- $\alpha$ -mTOR経路が外傷性異所性骨化に関与することを示した。TNF- $\alpha$ 欠損マウスやmTOR阻害薬を用いた実験により、TNF- $\alpha$ とmTORシグナルが異所性骨化の発生に重要であることが確認された。これにより、NSAIDsやmTOR阻害薬による予防的治療の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、外傷性異所性骨化の病態メカニズムにおけるTNF- $\alpha$ -mTOR経路の関与を明らかにしたことである。これにより、異所性骨化の発生に関わる分子機序の理解が深まり、新たな治療標的の発見につながった。また、NSAIDsやmTOR阻害薬が有効であることを示したことで、既存薬を用いた新たな治療法の開発が期待される。

社会的意義としては、外傷後の異所性骨化による関節の可動域制限や再発を防止し、患者の生活の質（QOL）を大幅に向上させる可能性がある点である。特に、外傷後早期に効果的な予防治療を提供することで、治療期間の短縮や医療費の削減に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Traumatic heterotopic ossification (HO) occurs around joints after injuries such as contusions or fractures, severely impairing mobility. This study aimed to elucidate the pathophysiology of traumatic HO and explore new treatments. Using a mouse model, we demonstrated the involvement of the TNF- $\alpha$ -mTOR pathway in HO formation. Experiments with TNF- $\alpha$  knockout mice and mTOR inhibitors confirmed that TNF- $\alpha$  and mTOR signaling are crucial for HO development. These findings suggest that NSAIDs and mTOR inhibitors could offer effective preventive treatments. Early intervention with these drugs may improve patient outcomes by preserving joint mobility and reducing recurrence rates. Further clinical trials are needed to confirm these results in humans.

研究分野：整形外科

キーワード：外傷性異所性骨化 炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  mTOR

## 1. 研究開始当初の背景

異所性骨化を来す原疾患としては外傷性、神経性、進行性骨化性線維異形成症、腫瘍性などが報告されており、詳細な発生機序は未だ不明である。その中でも外傷性の異所性骨化は、打撲、骨折、脱臼等の外傷後や、外傷に対する観血的手術の術後に暴力的な徒手整復操作や他動での可動域訓練によって生じることが知られている。また熱傷後、脊髄損傷後などにも生じる。異所性骨化は関節周辺に生じることが多く、重症例では関節可動域が完全に消失し日常生活に大きな障害を与える。治療方法は異所性骨化巣の外科的切除が基本となるが、過去の報告では切除後の再発率が20%と高いことから、異所性骨化に対する治療は難渋することが多く、整形外科領域における未解決な課題となっている。異所性骨化に対する薬物療法の有効性も確実なものではなく、保存療法から手術療法に至るまで有効な治療方法が確立されていないのが現状である。前述のように異所性骨化の機序は明らかとはなっていないが、進行性骨化性線維異形成症の発症においてACVR1/ALK2という遺伝子の変異により、ACVR1/ALK2の活性化を促進し、活性化したACVR1/ALK2は、mammalian target of rapamycin(mTOR) シグナルを刺激することで、筋肉における異所性骨化を促進すると報告されている。また、TNF がPI3K/Akt/mTOR シグナルを活性化することが報告されていることから、TNF -mTOR 経路が異所性骨化に関わると考えられている。しかし、遺伝子変異のない外傷による異所性骨化の際にTNF -mTOR 経路が活性化されるかどうかは明らかでなく、外傷後の異所性骨形成の病態メカニズムも十分に解明されていない。そのため、本研究により外傷性の異所性骨化の病態解明、特に炎症性サイトカインやmTOR シグナルの関与を証明できれば、手術療法だけでなく現在臨床使用されている治療薬による治療介入という選択肢が示されることとなり、異所性骨化による関節強直や軟骨障害で苦しむ患者や再発例で治療に難渋する患者のQOLが大幅に改善することが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、外傷性異所性骨化の病態解明と新規治療法の探索である。具体的には、外傷性異所性骨化モデルマウスを作成し、様々なサイトカイン環境下での骨化病巣の評価を行うことで、炎症性サイトカインの関与を検討し、同定された候補サイトカインをターゲットとした阻害薬の投与により、外傷性異所性骨化の病態解明と新規治療法の探索を目指すものである。外傷性異所性骨化は、整形外科領域において未解決の課題であり、その発生機序を解明することは、新たな治療法の開発に直結する。本研究では、炎症性サイトカインが異所性骨化にどのように関与しているのかを明らかにすることを目的としている。具体的には、TNF- やIL-6、IL-1といった主要な炎症性サイトカインが異所性骨化の形成にどのような影響を与えるのかを解析する。また、これらのサイトカインを標的とした治療薬の開発を通じて、外傷性異所性骨化の発生を予防する新しい治療法を確立することを目指す。

## 3. 研究の方法

本研究には3つのステップを有する。第1段階として、異所性骨化モデルマウスを作成し、マイクロCTを用いて定量評価を行う。また、性差、外傷後にどの時期から骨化が生じ始めるかの検討を行い、さらに骨化が内軟骨性骨化または膜性骨化のどちらによるものなのかの検討を行う。CTは慶應義塾大学病院共同機器利用研究室の実験動物用3DマイクロX線CTコンピュータ断層撮影装置を用いて行い、得られたCT画像から慶應義塾大学病院共同機器利用研究室の3D画像解析ソフトウェアを使用し異所性骨化部の体積量を測定し、比較検討する。

第2段階として、FOPでは、mTOR シグナルを刺激することで、筋肉における異所性骨化を促進することや、炎症因子であるTNF は、mTORの上流で機能することが報告されていること、さらにはTNF-mTORシグナルが異所性骨化に関与するとの報告があることから、TNF-mTORシグナルがどのように外傷性の異所性骨化に関与するかについての検証を行う。具体的には、TNFのノックアウトマウスに異所性骨化発生条件を加えた上で、骨化病巣の量と性質を評価する。また、免疫組織化学染色において、mTORやTNFの活性化を野生型マウスやTNFノックアウトマウスにおいて異所性骨化発生条件を加えて観察し、蛍光の有無や蛍光がみられた有核細胞の定量化を行い比較・検討する。これらのデータから、異所性骨化の発生に関係する分子経路やサイトカインの候補を同定する。

第3段階として、第2段階までの結果により同定された候補サイトカインやシグナル経路をターゲットとして、臨床応用可能な阻害薬を異所性骨化モデルマウスに投与し、異所性骨化への予防効果を検討する。具体的には、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)やFOPの治療薬にもなっているmTOR阻害薬であるRapamycinを異所性骨化モデルマウスに投与し、異所性骨化抑制効果をマイクロCTによる定量化および組織学的評価により確認することで、異所性骨化への予防効果を検討し新規治療法の候補を探索する。

以上により外傷性異所性骨化の病態解明と新規治療法の候補を探索することを本研究の最終

目標とする。

#### 4. 研究成果

第1段階の研究の予備実験として、我々はマウスのアキレス腱を切断し、間隙を5mmあけることにより(図1) 全例でアキレス腱切断部に異所性骨化が生じることがマイクロCTにより確認された。また、マウスの性別による異所性骨化量に有意差は生じなかった。さらに、経時的な異所性骨化の体積量を調査したところ、切断後1週、2週では骨化が生じておらず3週から骨化が生じはじめ、5週で10週の体積量の50%程度となることが確認された(図2、図3)。CTは慶應義塾大学病院共同機器利用研究室内の実験動物用3DマイクロX線CTコンピュータ断層撮影装置を用いて行い、得られたCT画像から慶應義塾大学病院共同機器利用研究室内の3D画像解析ソフトウェアを使用し異所性骨化部の体積量を測定し、比較検討した。

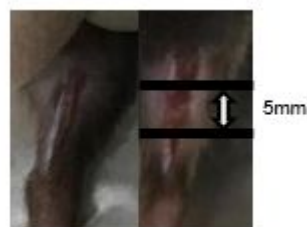


図1 マウスのアキレス腱切断方法

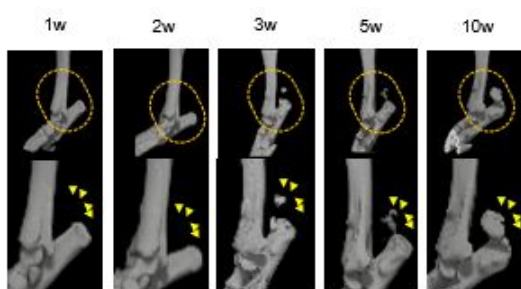


図2 異所性骨化の経時変化(マクロ)

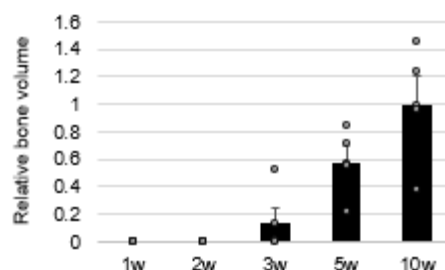


図3 異所性骨化部体積の経時変化

次いで第2段階として、異所性骨化の発生に関係する分子経路やサイトカインの候補を同定するための検証を行った。野生型マウスのアキレス腱切断部位におけるTNFの発現を切断後1週において、免疫組織化学染色で解析した。その結果、アキレス腱切断部位でTNF抗体の蛍光が確認された。また、CD68陽性マクロファージ細胞でTNF抗体の蛍光が確認でき、CD3陽性T細胞やCD20陽性B細胞ではTNF抗体の蛍光は確認されなかった(図4)。そのため、TNFを発現する炎症細胞が腱切断部位に移動することが示唆された。実際、リン酸化(活性化)されたmTOR(pmTOR)抗体陽性細胞の存在する部位やその周囲でTNF抗体の蛍光が確認できた。in vitroにおいて、NIH3T3線維芽細胞でTNF刺激を亢進させた細胞においてmTORタンパクが検出され誘導されたことからTNFシグナルによる刺激でmTORがリン酸化されると考えられた。よってTNF-mTORシグナル経路が遺伝子変異のない、外傷性の異所性骨化にも関与することが示唆された。次にTNF欠損(TNF KO)マウスにおいて、アキレス腱切断を行い、異所性骨化の体積量をマイクロCTで評価した。結果はTNF KOマウスでは野生型マウスに比べて術後10週での異所性骨化体積量が有意に減少していた(図5)。これらの結果から、外傷性の異所性骨化マウスモデルにおいて、TNFシグナルが異所性骨化の形成に必要であると考えられた。

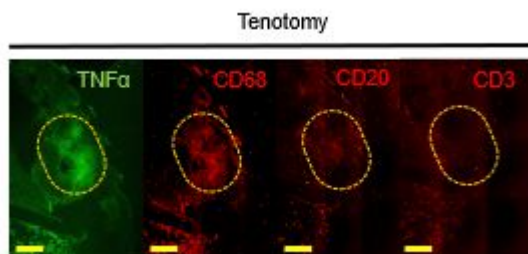


図4 アキレス腱切断部の免疫組織化学染色

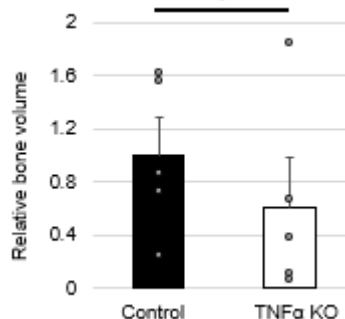


図5 TNF KOマウスの異所性骨化部体積

第3段階として、第2段階でTNF-mTOR経路が異所性骨化に関与し、TNF KOマウスにおいてアキレス腱切断部位での異所性骨化が有意に抑制されることが判明したことから、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)やFOPの治療薬にもなっているmTOR阻害薬であるRapamycinを異所性骨化モデルマウスに投与し、異所性骨化の体積量をマイクロCTにより評価した。野生型マウスにセレコキシブ、ロキソプロフェン、ラパマイシンを週5日、アキレス腱切断後から10週間

継続して投与した。その結果、コントロール群と比較し、腱切断後の異所形成骨化部の体積は、セレコキシブ、ロキソプロフェン、ラパマイシン投与により有意に減少していた（図6、7）。また、アキレス腱切断後に各薬剤を1週間毎日投与し、その後は投与しなかった場合でも、異所性骨化部の体積は有意に減少したため、外傷後早期に炎症を抑制することが異所性骨化の抑制に重要であると考えられた。

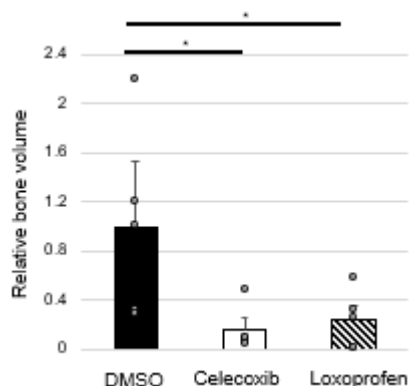


図6 NSAIDs投与マウスの異所性骨化部体積

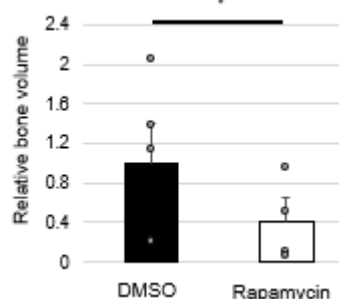


図7 ラパマイシン投与マウスの異所性骨化部体積

最後に、この外傷性異所性骨化モデルマウスにおいて TNF シグナルが mTOR の上流にあるかどうかを調べるために、野生型マウスでアキレス腱切断を行い、切断後1週で、コントロール群とラパマイシン投与(mTOR を阻害)マウスでの TNF 発現を免疫組織化学染色で評価した。その結果、コントロール群とラパマイシン投与群では、腱切断部位に TNF の蛍光が認められた細胞数に有意差はなかった。次に、TNF KO マウスと野生型マウスにアキレス腱切断を行い、切断後1週に pmTOR 抗体で免疫組織化学染色を行った。その結果、アキレス腱切断部位での pmTOR 抗体の蛍光細胞数が TNF KO マウスで有意に減少しており、mTOR の活性化が TNF KO マウスで有意に抑制されることが判明した。また、野生型マウスでアキレス腱切断後、セレコキシブまたはロキソプロフェンを1週間投与し、切断後1週間に pmTOR 抗体で免疫組織化学染色を行ったところ、pmTOR 抗体の蛍光細胞数がセレコキシブとロキソプロフェン投与群でコントロール群よりいずれも有意に減少しており、NSAIDs 投与でも mTOR が有意に抑制されることが判明した。

以上の結果から外傷性の異所性骨化には、TNF や他の炎症因子による mTOR の活性化が必要であり、TNF -mTOR シグナル経路が関与していると考えられた。今後は最終的にマウスだけでなく、人においても、NSAIDs やラパマイシン投与が外傷性の異所性骨化に対して予防効果が認められるのかどうかにつき臨床試験などで検討できるよう、さらなる実験や検証を重ねていくといった課題が存在すると考えられた。

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 0件）

1. 著者名 Kushima Yu, Sato Yuiko, Kobayashi Tami, Fukuma Yuko, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Iwamoto Takuji, Miyamoto Takeshi	4. 巻 41
2. 論文標題 TNF $\alpha$ -dependent mTOR activity is required for tenotomy-induced ectopic ossification in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 583 ~ 591
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-023-01437-8	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久島雄宇 佐藤結子 小林多美 松本守雄 中村雅也 岩本卓士 宮本健史
2. 発表標題 マウスのアキレス腱切断後に生じる異所性骨化にはTNF $\alpha$ を介したmTORシグナルの活性化が必要である
3. 学会等名 第8回 日本骨免疫学会
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
研究分担者	宮本 健史  (Miyamoto Takeshi)  (70383768)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授    (17401)	

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