

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791652

研究課題名（和文） PTH による骨折治癒促進効果と末梢血由来骨前駆細胞関与のメカニズムに関する研究

研究課題名（英文） Homing of circulating osteogenic progenitors to fracture healing site by administration of parathyroid hormone

研究代表者

熊谷 研（KUMAGAI KEN）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：10468176

研究成果の概要（和文）：マウス大腿骨骨折モデルに対し副甲状腺ホルモン(PTH)を間欠投与すると、骨癒合が促進し、末梢血由来骨前駆細胞の骨折部へのホーミングが確認された。末梢血由来骨前駆細胞ホーミングのメカニズムとして SDF-1/CXCR4 システムが関与していることが示唆された。このメカニズムを増強することは、骨折治癒過程や骨移植時の骨形成等に対し、治療効率を向上させるポイントになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrated that bone formation was stimulated through the homing of circulating osteogenic cells by the intermittent administration of parathyroid hormone in mouse femur fracture model. The data also suggested that SDF-1/CXCR4 contributed to the homing of the circulating osteogenic cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：PTH, 骨折治癒, 骨前駆細胞, ホーミング

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨折治癒や骨欠損に対する骨再生には、骨を形成するための細胞供給が不可欠である。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、生理的な役割について注目を集めている。

(2) 我々は、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前駆細胞あるいは幹細胞がホーミングのメカニズムを介して骨折修復に関与することを報告している。また、難治性骨折モデルにおいて、低出力超音波刺激による骨折治癒促進作用に末梢血由来骨前駆細胞が

関与すること、人工骨移植において、骨形成に末梢血由来骨前駆細胞のホーミングが関与することを確認している。

(3) 遷延治癒骨折など局所からの細胞供給が制限された病変や、局所からの細胞供給が乏しい環境下での人工骨移植に対しても、ホーミングの作用を増強することで、血管新生とともに末梢血中の骨前駆細胞が標的となる患部に集積し、骨形成を促進する可能性があると考えている。

(4) 本研究では、骨形成作用を有する骨粗鬆症治療薬 PTH 製剤に注目し、研究を計画した。最近の研究では、副甲状腺機能低下症患者

者に PTH 投与を行い、末梢血中の骨前駆細胞が増加し、骨形成率と相関することが報告されている。しかしながら骨折患者に対する PTH 投与と末梢血中骨前駆細胞の動態や骨折治癒に対する役割については不明である。

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、「PTH による骨形成促進作用のメカニズムの一つとして末梢血由来細胞のホーミングがある」という仮説を検証する。

(2) ホーミングのメカニズムに直接作用するケモカイン Stromal Derived Factor-1 (SDF-1) との関連についても調査する。

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。約 3 週間末梢血に 50 : 50 のキメラが形成され、以後安定した状態が保たれる。

(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、骨切り部より長軸方向にそれぞれ 2mm ずつ骨膜を取り除き、髓内固定した。

(3) PTH の投与：骨折後、翌日より PTH を 50 μ g/kg/日投与 (PTH 群)、あるいは生理食塩水のみ投与 (対照群) し、検体採取の前日まで連日で繰り返した。

(4) 骨折部周囲の細胞集積と骨形成の経時的評価：骨折後 2、4 週で検体を摘出し、以下の評価を行った。

①骨形成の評価：単純 X 線にて骨折部周囲の硬性仮骨形成量を評価する。

②末梢血由来骨前駆細胞集積の定量：骨折部の凍結組織切片を作製し、GFP 陽性細胞と骨形成マーカー (ALP) 染色陽性細胞を蛍光顕微鏡画像に取り込み、陽性細胞率を画像解析ソフトにて解析した。

③ホーミング因子の評価：骨折部周囲組織における SDF-1 およびその受容体 CXCR4 の発現について、免疫染色を行って陽性率を確認した。

4. 研究成果

(1) 骨折部周囲の骨形成：対照群に比較して PTH 群で骨形成は促進された。PTH 群では骨折後 4 週において全例骨癒合が確認された。

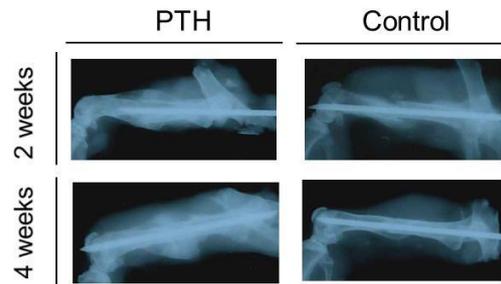


図 1 骨折部の X 線像

(2) 末梢血由来細胞の集積：骨折部周囲において PTH 群および対照群ともに骨折後 2 週より GFP 陽性細胞が確認された。GFP 陽性細胞の領域は骨折後 2 週で対照群の平均 2.3% に対し、PTH 群が平均 6.8% と有意に増加した ($P < 0.05$)。骨折後 4 週では対照群が平均 4.8%、PTH 群が平均 5.9% で両群間に有意差はなかった。

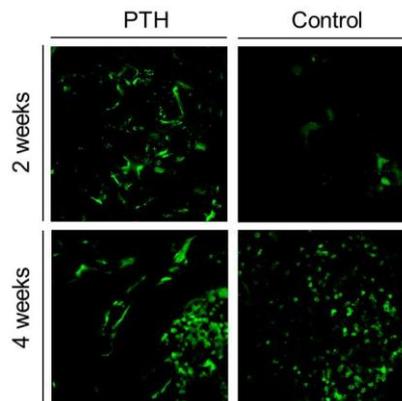


図 2 骨折部周囲の GFP 陽性細胞

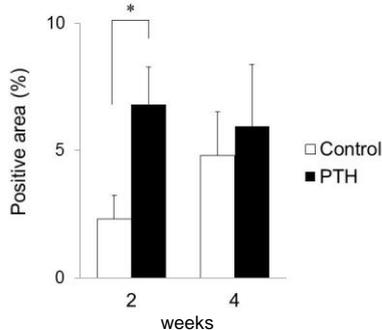


図 3 骨折部周囲の SDF-1 陽性領域
* $P < 0.05$

(3) 骨折部周囲組織における SDF-1/CXCR4 の発現:免疫染色による SDF-1 の発現を示す領域は、骨折後 2 週では対照群の平均 4.1%に対し、PTH 群が平均 11.2%と有意に増加し ($P < 0.05$)、骨折後 4 週では対照群の平均 2.6%に対し、PTH 群が平均 7.4%と有意に増加した ($P < 0.05$)。CXCR4 の発現を示す領域は、骨折後 2 週では対照群の平均 3.5%に対し、PTH 群が平均 11.6%と有意に増加し ($P < 0.05$)、骨折後 4 週では対照群の平均 2.8%に対し、PTH 群が平均 7.2%と有意に増加した ($P < 0.05$)。

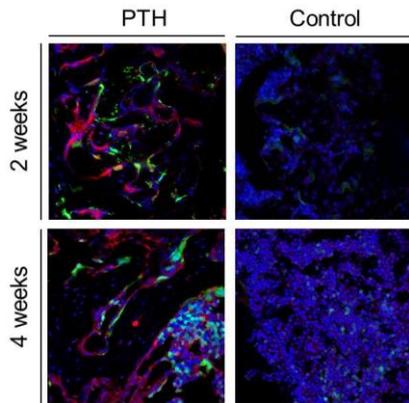


図 4 骨折部周囲の SDF-1 の発現 (赤)

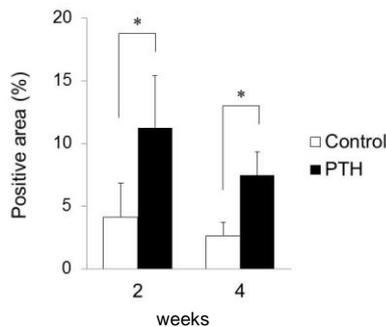


図 5 骨折部周囲の SDF-1 陽性領域
* $P < 0.05$

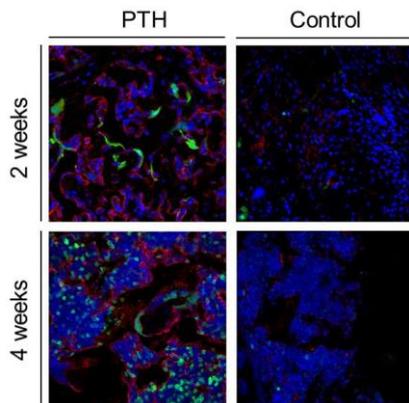


図 6 骨折部周囲の CXCR4 の発現 (赤)

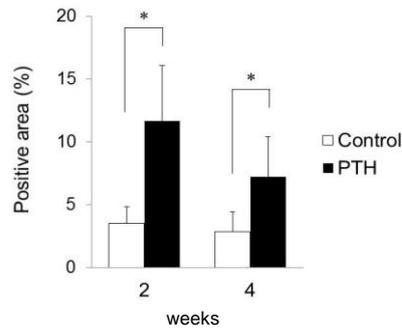


図 7 骨折部周囲の CXCR4 陽性領域
* $P < 0.05$

(4) まとめ: 以上の結果より、①PTH の間欠投与により、末梢血由来細胞のホーミングが増強され、骨形成が促進されること、②末梢血由来骨前駆細胞ホーミングのメカニズムとして SDF-1/CXCR4 システムが関与していることが示唆された。このメカニズムを増強することは、骨折治癒過程や骨移植時の骨形成等に対し、治療効率を向上させるポイントになると考えられる。

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 6 件)

- ① Kumagai K, Sakai K, Kusayama Y, Akamatsu Y, Sakamaki K, Morita S, Sasaki T, Saito T, Sakai T. The extent of degeneration of cruciate ligament is associated with chondrogenic differentiation in patients with osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012; 20(11): 1258-67. (査読有り)
- ② Kumagai K, Takeuchi R, Ishikawa H, Yamaguchi Y, Fujisawa T, Kuniya T, Takagawa S, Muschler GF, Saito T. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates fracture healing by stimulation of recruitment of both local and circulating osteogenic progenitors. *J Orthop Res.* 2012; 30(9): 1516-21. (査読有り)
- ③ 熊谷研, 齋藤知行: 誌上シンポジウム 高位脛骨骨切り術の適応と限界 Opening wedge 法. *臨床整形外科,* 2012; 47(12): 1171-1175. (査読無し)
- ④ 齋藤知行, 熊谷研: 専門医のための疾患・外傷診療ガイド 変形性膝関節症 (特発性骨壊死を含む). *関節外科 10 月増刊号,* 2012; 31: 266-271. (査読無し)
- ⑤ 熊谷研, 齋藤知行: 整形外科疾患の保

存療法 手術入院までどんな治療を受けてきたのか? (第12回) 大腿骨顆部骨壊死症. 整形外科看護, 16(1): 67-71, 2011. (査読無し)

- ⑥ 齋藤知行, 熊谷研, 藤原豊, 草山喜洋, 赤松泰: 変形性膝関節症に対する人工骨を用いた小侵襲 opening wedge high tibial osteotomy. 整形外科, 62(8): 893-897, 2011. (査読無し)

〔学会発表〕(計6件)

- ① 熊谷研, 稲葉裕, 松尾光祐, 針金健吾, 雪澤洋平, 草山喜洋, 長岡亜紀子, 藤崎真理, 齋藤知行: 生物学的製剤投与下関節リウマチ患者骨組織における TNF- α および IL-6 発現の免疫組織学的評価. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋国際会議場(愛知県), 2012年10月26-27日.
- ② Kumagai K, Akamatsu Y, Kobayashi H, Kusayama Y, Ishigatsubo R, Muramatsu S, Koshino T, Saito T. Histological abnormality of subchondral structure in spontaneous osteonecrosis of the knee. 7th Congress of the Asia Pacific Knee Society (APKS), New Delhi, India, October 3-6, 2012.
- ③ 熊谷研, 赤松泰, 藤原豊, 草山喜洋, 大澤克成, 渡邊太, 齋藤知行: クリテイカルパスによる Opening wedge HTO 術後療法期間の短縮. 第4回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県), 2012年7月19-21日.
- ④ Kumagai K, Kusayama Y, Inaba Y, Matsuo K, Harigane K, Yukizawa Y, Kubota A, Muramatsu S, Nagaoka A, Fujisaki M, Saito T. Effect of total knee arthroplasty with capsulotomy on disease activity in rheumatoid arthritis patients treated with biological therapy. The 22nd Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium, Nikko Senhime Monogatari Inn, Tochigi, Japan, June 7-9, 2012.
- ⑤ 熊谷研, 稲葉裕, 松尾光祐, 藤原豊, 雪澤洋平, 草山喜洋, 鈴木宙, 富岡政光, 長岡亜紀子, 藤崎真理, 齋藤知行: 中等度以上の疾患活動性を有する生物学的製剤投与関節リウマチ患者に対する滑膜切除を併用した人工膝関節置換術が疾患活動性に及ぼす影響. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会, グランドプリンスホテル新高輪(東京都), 2012年4月26-29日.
- ⑥ Kumagai K, Takeuchi R, Ishikawa H, Yamaguchi Y, Fujisawa T, Kuniya T,

Koshino T, Saito T. Abnormal subchondral structure and osteocyte viability in spontaneous osteonecrosis of the knee. 8th Biennial ISAKOS Congress, Rio de Janeiro, Brazil, May 15-19, 2011.

〔図書〕(計3件)

- ① 熊谷研, 齋藤知行: 変形性膝関節症による痛み; 治療の実際. 運動器の痛みプライマリケア 膝・大腿部の痛み, 南江堂, 227-233, 2012.
- ② 齋藤知行, 石川博之, 熊谷研: IV章 局所的合併症—下肢 12. 膝関節骨切り術. 整形外科 治療と手術の合併症, 金原出版, 351-354, 2011
- ③ 齋藤知行, 熊谷研: 変形性膝関節症, リウマチ膝の手術 高位脛骨骨切り術. 整形外科手術イラストレイテッド 膝関節の手術, 中山書店, 217-224, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号:

(3) 研究協力者

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