

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：86102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592264

研究課題名(和文) 長管骨の長径成長を促進する新規因子の発見と骨再生治療への応用

研究課題名(英文) A finding of new factors to induce overgrowth of tubular bone and an application of bone regeneration

研究代表者

高田 信二郎 (Takata, Shinjiro)

独立行政法人国立病院機構徳島病院(臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：20284292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ラット大腿骨骨幹部骨膜の全周性切除(CPD)は、成長軟骨板における内軟骨性骨化を促進することにより、その長径が過成長に至ることを発見した。

週齢8週の雄Wistarラット72匹を用いた。右大腿骨にはCPDを実施し、左大腿骨はcontrolとした。CPD実施後6週では、CPD側大腿骨の長径は41.0±0.9 mm、対照では39.4±0.7 mmと、CPD側大腿骨は対照側大腿骨に比べてその長径が有意に過剰成長した(p=0.0052)。骨形態計測では、CPD側大腿骨遠位成長軟骨板では対照群に比べて、長径成長速度、骨石灰化速度、骨量、骨梁数が有意に高かった(p<0.05)。

研究成果の概要(英文)：Circumferential periosteal division (CPD) of the diaphysis of the femur stimulates endochondral ossification, producing longitudinal overgrowth in the developing rat.

Seventy-two 8-week-old Wistar rats were used in this study. The periosteum of the diaphysis of the right femur was divided circumferentially (CPD group), while the left femur acted as the control (Control group). Longitudinal lengths in the CPD and Control groups 6 weeks after CPD were 41.0±0.9 and 39.4±0.7 mm (p=0.0052, n=6), respectively. Bone histomorphometry revealed that CPD increased the longitudinal growth rate, mineral apposition rate, bone volume, osteoid volume, trabecular number, and thickness of femur (n=6). The results demonstrated that CPD stimulated endochondral ossification of the growth plate to produce longitudinal overgrowth in the femur of the developing rat. These results suggest that the periosteum plays an important role in regulating endochondral ossification of the growth plate.

研究分野：整形外科学

キーワード：内軟骨性骨化 骨膜 骨形態計測 骨密度 成長軟骨板 大腿骨 動物実験

### 1. 研究開始当初の背景

成長期における長管骨骨折は、その長径が過剰に成長する(過成長)。長径の成長は、成長軟骨板における内軟骨性骨化が司る。長管骨骨折は、内軟骨性骨化の促進因子であるといえる。

1979年、ラット脛骨骨幹部骨膜の全周性切除は、その長径の過成長をもたらすことが初めて報告された(文献<sup>1</sup>)。さらに、その長径の過成長が最大となる骨膜切除部位は、近位成長軟骨板の近傍であることがわかった(文献<sup>2</sup>)。組織学的解析では、長管骨骨幹部骨膜の全周性切除は、成長軟骨板における肥大軟骨細胞数が増加することが明らかになった(文献<sup>3</sup>)。

申請者は、これまで、長管骨の成長や成熟を促進する因子の発見に努めてきた。さらに、前述の先行研究の結果を踏まえ、ラットの大腿骨骨幹部骨膜の全周性切除を行って、その長径を過成長させる実験モデル(長管骨長径過成長モデル)を確立した。

### 2. 研究の目的

本申請研究の目的は、申請者が開発した長管骨長径過成長モデルを用いて、長管骨骨幹部骨膜の全周性切除が内軟骨性骨化に及ぼす影響を、骨形態計測、組織学的に解析することにより、内軟骨性骨化を規定する新たな因子を発見することである。さらに本研究成果を、新たな骨再生治療の開発を実現することを研究目的とした。

### 3. 研究の方法

実験動物は、週齢8週雄Sprague-Dawleyラットを用いる。全身麻酔下、右大腿骨の骨幹部骨膜を、第3転子の遠位端から約8mm遠位の部位まで全周性に切除する(骨膜切除群, CPD group)。左大腿骨は、侵襲を加えない対照とする(対照群, Control group)。

骨膜切除後2週、4週、6週において麻酔薬の過剰投与によってラットを安楽死させ、両側大腿骨を摘出し、以下の解析を実施する。

骨形態計測では、カルセインとテトラサイクリンの二重標識法を用いた。骨膜切除前、骨膜切除後2週、4週、6週において、成長軟骨板の各軟骨細胞層の形態的变化、二次海綿骨における骨形成と骨吸収の評価、骨長径成長速度、骨石灰化速度等を解析した。

大腿骨骨幹部における外骨膜周囲径、内骨膜周囲径、骨皮質幅、骨密度は、pQCTを用いて評価した。

大腿骨長径の仮成長の機序を明らかにするために、骨膜切除を行った部位にスクリューを刺入固定し、成長のマーカーとした。骨膜の全周性切除を行った大腿骨骨幹部には、直径1mmのスクリュー2本を約8mmの間隔において刺入した。骨膜切除直後から2週毎、大腿

骨の各部位と、2本のスクリューとの間の距離を経時的に測定した。

成長軟骨板における組織学的解析は、HE、Alcian blue、Alkaline phosphatase、TRAPの各染色を行うとともに、免疫染色ではcollagen X、Runx2、Indian hedgehog (IHH)、PTH-rpを抗体として実施した。

### 4. 研究成果

骨膜切除行つて6週間を経過した右大腿骨は、左大腿骨に比べてその長径が過成長した(図1)。

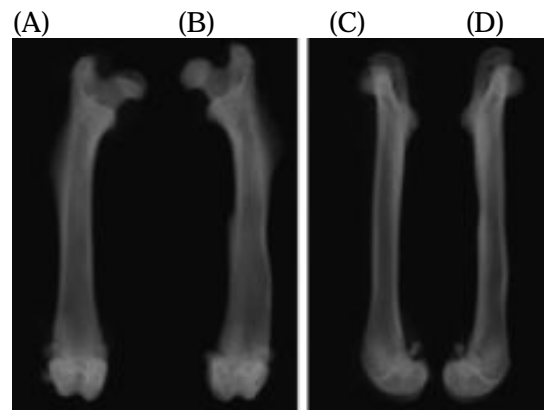


図1. 対照群大腿骨の正面(A)と側面(C)骨膜切除後6週の骨膜切除群大腿骨の正面(B)と側面(D)の軟X線写真像。

右大腿骨骨幹部骨膜の全周性切除後4週の大腿骨長径は、骨膜切除群  $39.4 \pm 1.3$  mm、対照群  $38.5 \pm 0.8$  mm ( $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ) と、骨膜切除群は対照群に比べて有意に延びた。術後6週では、骨膜切除群  $41.0 \pm 0.9$  mm、対照群  $39.4 \pm 0.7$  mm ( $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ) と、骨膜切除群は対照群に比べて有意に長くなった(図2)。

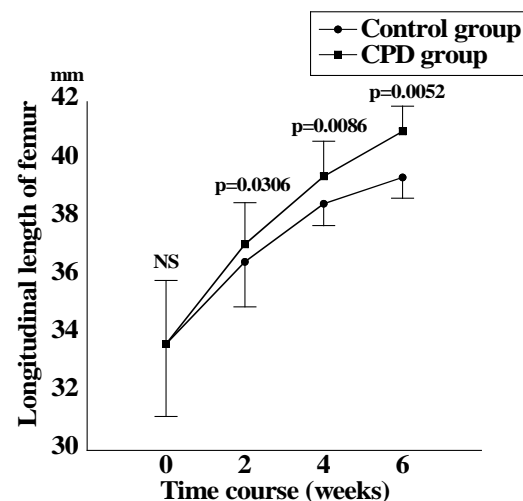


図2. 大腿長径の経時的変化。

遠位スクリューと大腿骨遠位端との間の距

離は、骨膜切除後2週以後、骨膜切除前（ラット週齢8週）に比べて有意に延長し（ $p=0.0008$ ）、以後、その距離はさらに拡大した。この事実から、骨膜切除による長径過成長は、主に遠位成長軟骨板に関わることが明らかになった（図3）。

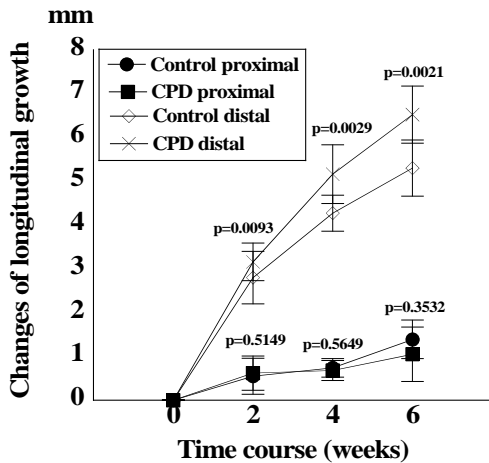


図3. スクリューと大腿骨遠位端あるいは近位端との間の距離の経時的変化。

pQCT法で求めた外骨膜周囲径は、2群において有意な差がなかった。一方、内骨膜周囲径では、骨膜切除群 $6.661 \pm 0.498$  mm、対照群 $8.249 \pm 0.709$  mmと、骨膜切除群は対照群に比べて有意に小さかった（ $p=0.0003$ ）。骨幹部骨密度は、骨膜切除群 $961.5 \pm 32.3$  mg/cm<sup>3</sup>、対照群 $766.1 \pm 44.1$  mg/cm<sup>3</sup>と、骨膜切除群は対照群に比べて骨幹部骨密度が高かった（ $p < 0.0001$ ）。骨幹部骨皮質幅は、骨膜切除群 $0.999 \pm 0.069$  mm、対照群 $0.711 \pm 0.041$  mmと、骨膜切除は対照群に比べて、骨皮質が増幅した（ $p=0.0008$ ）。pQCTで描出した骨膜切除群大腿骨と対照群大腿骨の形態の相違を図4に示す。

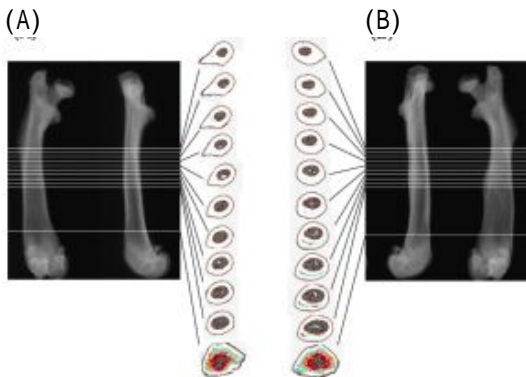


図4. pQCTによる対照群大腿骨(A)と骨膜切除群大腿骨(B)の形態の相違。

骨膜切除後6週を経過した大腿骨遠位成長軟骨板は、骨膜切除前（週齢8週）の大腿骨遠

位成長軟骨板にはおよばないものの、対照群に比べて増幅していた。骨幹部における海綿骨分布は、骨膜切除群は対照群に比べて密度が高く分布していた。また、骨幹部における皮質骨幅は、骨膜切除群は対照群に比べて肥厚していた（図5）。

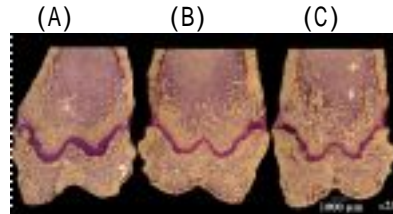


図5. 大腿骨遠位部清澄軟骨板と骨幹部における形態の相違。(A)骨膜切除前(週齢8週)、(B)対照群、(C)骨膜切除群

$\mu$ CTを用いた海綿骨構造解析では、骨膜切除群は対照群に比べて、大腿骨骨幹部における海綿骨数、皮質骨幅の増加を見出した（図6）。

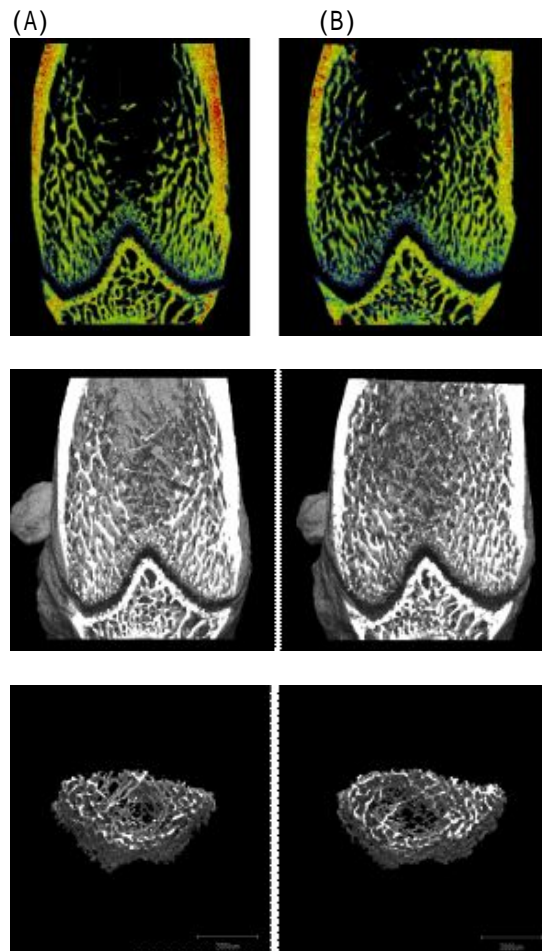


図6.  $\mu$ CTを用いた海綿骨構造解析。(A)対照群、(B)骨膜切除群

骨形態計測法では、術後4週の長径成長速度は、骨膜切除群 $92.3 \pm 5.3$   $\mu$ m/day、対照群

54.4 ± 4.6 μm/day (p<0.001, n=6) 術後 6 週では骨膜切除群 41.1 ± 3.4 μm/day、対照群 27.6 ± 5.1 μm/day (p<0.01, n=6) と、骨膜切除群は対照群に比べて成長速度が高かった(図 7)。

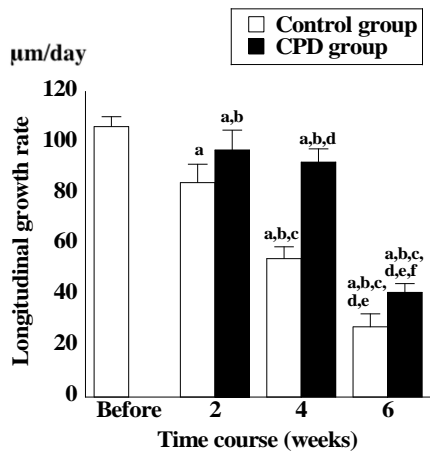


図 7. 長径成長速度の経時的変化.

石灰化速度(MAR)は、骨膜切除後2週、4週、6週の内いずれもが、骨膜切除群は対照群に比べて有意に高かった(図 8)。

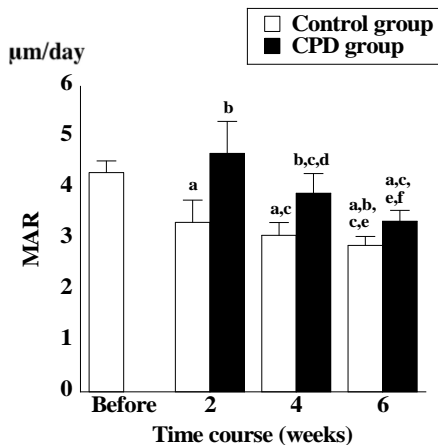


図 8. 石灰化速度の経時的変化.

二次海綿骨では、骨膜切除群の類骨幅は、対照群に比べて広がった。また、カルセインとテトラサイクリンを用いた二重標識の幅は、骨膜切除群は対照群に比べて広がった(図 9)。

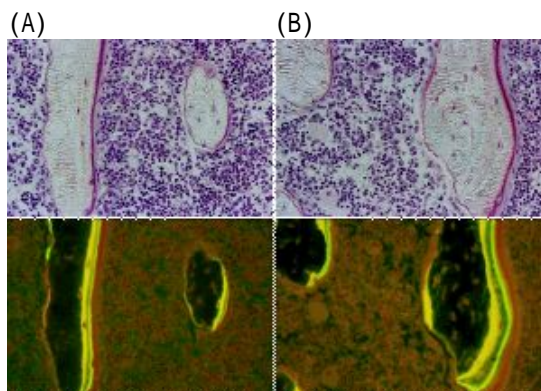


図 9. 類骨幅と二重標識幅の比較. (A)対照群、(B)骨膜切除群

二次海綿骨では、骨膜切除群は対照群に比べて、破骨細胞数が多く、旺盛な骨吸収を行っていた(図 10)。

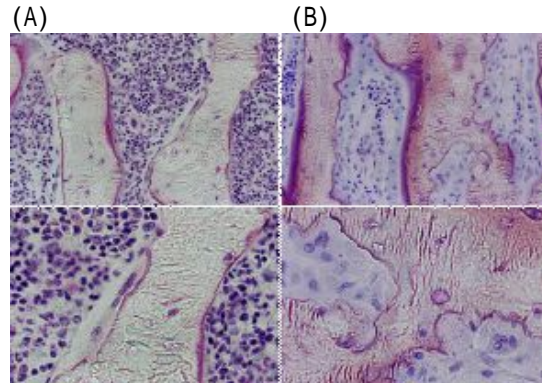


図 10. 二次海綿骨における骨吸収. (A)対照群、(B)骨膜切除群.

成長軟骨板における HE 染色では、骨膜切除群は対照群に比べ、骨膜切除後2週、4週、6週の内いずれにおいても、肥大軟骨細胞数の増加による成長軟骨板の増幅がみられた(図 11)。さらに、骨芽細胞数の増加、破骨細胞数の減少、免疫染色 (Runx2, IHH, PTH-rp) において肥大軟骨細胞における陽性細胞率の増加を確認した(図 12)。

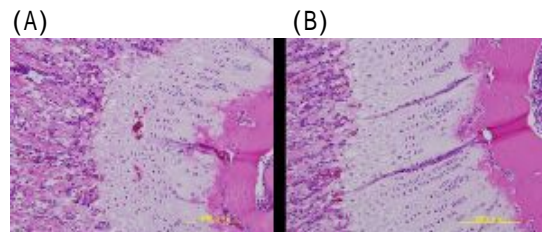


図 11. 大腿骨遠位成長軟骨板(HE 染色). (A)対照群、(B)骨膜切除群

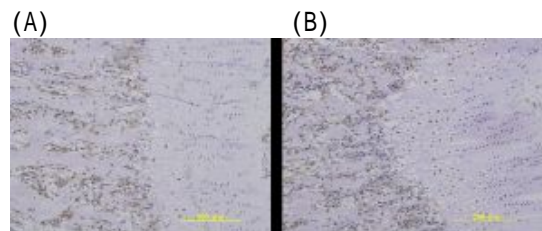


図 12. 大腿骨遠位成長軟骨板における Runx2 抗体陽性細胞数の比較.

(A)対照群、(B)骨膜切除群

成長期ラット大腿骨骨幹部の全周性骨膜切除は、長径の過成長と、骨幹部の骨密度増加と、骨皮質の肥厚をもたらした。この事実は、長管骨骨幹部の骨膜切除は、成長軟骨板における内軟骨性骨化を活性化すると同時に、骨幹部における骨形成を促進す



る刺激となることを意味した。本研究結果は、小児における先天的あるいは後天的な長管骨成長障害や骨萎縮に対する、新たな治療法の開発に寄与すると確信する。

#### 引用文献

- 1 Warrell E, Taylor JF: The role of periosteal tension in the growth of long bones. J Anat 128:179-184, 1979.
- 2 Lynch MC, Taylor JF: Periosteal division and longitudinal growth in the tibia of the rat. J Bone Joint Surg Br: 69(5): 812-816, 1987.
- 3 Taylor JF, Warrell E, Evans RA: The response of the rat tibial growth plates to distal periosteal division. J Anat 151:221-231, 1987.

#### 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3件)

- 1 高橋光彦、江西哲也、佐藤紀、東野恒作、高田信二郎、加藤真介、安井夏生：兎下腿骨延長における高齢と幼若個体間での骨格筋適応の違い。Jpn J Rehabil Med 50:43-47, 2013.
- 2 高田信二郎：活性型ビタミンD<sub>3</sub>製剤を併用したビスホスホネート製剤の効果。骨粗鬆症治療。連載 EBM 講座。11(3):52-56, 2012.
- 3 久岡白陽花、上田由佳、前田香代子、西川幸治、坂東左知子、林修司、竹内秀和、仁木敏之、楠瀬賢也、山口浩司、富田紀子、岩瀬俊、竹谷善雄、山田博胤、添木武、若槻哲三、高田信二郎、赤池雅史、安井夏生、佐田政隆：(若手優秀演題セッション)尿中アルブミン排泄量に及ぼす心臓リハビリテーションの効果 心臓リハビリテーション 2012; 17: 159-161.

[学会発表](計5件)

- 1 Takata S: Circumferential periosteal division of diaphysis of rat femur stimulate endochondral ossification of growth plate. ASBMR 34<sup>th</sup> Annual Meeting, Minneapolis, Minnesota, USA, September 12-15, 2012.
- 2 Takata S: Longitudinal overgrowth following circumferential periosteal removal of femur of developing rat. ASBMR 35<sup>th</sup> Annual Meeting, Baltimore, Maryland, USA, October 4-7, 2013.
- 3 Takata S: Mechanism of Longitudinal Overgrowth of Femur of Developing Rat Following Circumferential Periosteal Division. ASBMR 36<sup>th</sup> Annual Meeting, Houston, Texas, USA, September 12-15, 2014.
- 4 高田信二郎、江西哲也、佐藤紀、高橋光彦、安井夏生：長管骨骨膜切除がもたらす長径

過成長の機序解明。第66回国立病院総合医学会、平成24年11月17日、神戸市。

- 5 高田信二郎、宮崎達志、高橋光彦、佐藤紀、江西哲也：ラット大腿骨骨幹部骨膜の全周性切除がもたらす長径過成長の機序解明。第50回日本リハビリテーション医学会学術集会、平成25年6月13日、東京都

[図書](計2件)

- 1 高田信二郎：糖尿病で骨折をしやすい部位がありますか？、ファーマナビゲーター糖尿病と骨代謝編、松本俊夫、杉本利嗣編集、メディカルレビュー社、東京、p276-283, 2015.
- 2 高田信二郎：骨粗鬆症(骨粗鬆症性脊椎圧迫骨折)とは？。腰痛診療ガイド、菊池臣一監修、紺野慎一編集、日本医事新報社、

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]なし。

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

高田信二郎 (TAKATA, Shinjiro)  
独立行政法人国立病院機構徳島病院・整形  
外科・リハビリテーション科・外科系診療  
部長  
研究者番号：20284292

##### (2)研究分担者

安井 夏生 (YASUI, Natsuo)  
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究  
部・教授  
研究者番号：00157984

佐藤 紀 (SATO, Nori)

徳島大学・大学病院・その他  
研究者番号：00448333

高橋 光彦 (TAKAHASHI, Mitsuhiro)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究  
部・講師

研究者番号：10372715

江西 哲也 (ENISHI, Tetsuya)

徳島大学・大学病院・助教  
研究者番号：20467806

##### (3)連携研究者 なし。