

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592752

研究課題名(和文) 血漿マイクロRNA発現による骨折治癒遅延の新しい分子治療の解明

研究課題名(英文) Establishment and onset mechanism

研究代表者

原 義明(HARA, YOSHIAKI)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：20386197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：100名近い患者さんから血液検体を採取し、血漿分離した後当悪血保存した。3ヶ月間経過を追跡して骨癒合した群(U群)と癒合しなかった群(NU群)に分けた。両群間の骨癒合サイトカインであるBMP2とTGFB1の受傷時期ごとの血漿中濃度の推移を測定した。その際、2群間でその推移に違いを認め、骨癒合の早期マーカーとなり得る可能性を認めたため、研究の重点をそのことに移行し研究を進めた。データ欠損の無い各群10名の検体を調査し、U群では2つのサイトカインの初期ピーク値がNU群と比較し1週間早くなっていることがわかった。現在、有効な骨癒合の早期マーカーは存在せず、今回の研究は有意義なものであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：A blood sample was obtained from about 100 people patients and saved our vitiated blood after having separated it for plasma. It was divided into the union group (U group) and the non union group (NU group) and performed osteogenesis in pursuit of the course for three months. The change of the plasma concentration every injury time of BMP2 and TGFB1 which were osteogenesis cytokine between both groups was measured.

We shifted to it with the important point of the study and were able to advance in a study on this occasion because the change had a difference between two groups and showed a marker and the likelihood that it could be in an early stage of bone union. The specimen of ten each group without data deficiency was investigated and a peak value compared it with the NU group in the U group for early days of two cytokine and was found to become early for one week. The early marker of effective bone union was not present, and this study was thought to be significant now.

研究分野：救急整形外傷

キーワード：骨折治療 偽関節 骨癒合マーカー TGF- 1 BMP2

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨癒合遅延は骨折の合併症として四肢骨折の5~10%見られ、治療に難渋することが多い。その原因としては、局所の感染(骨髄炎)、骨・軟部組織の欠損、固定力不足などが考えられる。しかし、そのような明らかな誘因がないにもかかわらず骨癒合が進まない症例も存在する。骨折治癒遅延の早期の診断と治療は合併症を防ぎ、骨折患者の臨床経過改善が期待できる。骨再生時、未分化な間葉系細胞を骨芽細胞に分化させることで促進的に働く機能的サイトカインとして TGF- $\beta$  1 と BMP-2 が重要であると考えられており、その低値が骨癒合遅延と関連していることが多くの研究から示されている。

(2) 一方、1990年代に発見された、塩基数20前後のノンコーディングRNAである microRNA は、mRNA のプロモーター部分に結合することで、タンパク発現における制御機構に重要な役割を持っていることが知られており、BMP-2 や TGF- $\beta$ 1 発現を直接抑制する microRNA や、これらのシグナルパスウェイ関連因子をターゲットとした microRNA を同定することは、骨折治癒システムの解明と、遅延治癒に対する早期治療へも応用できると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) TGF- $\beta$  1 と BMP-2 の両方を標的として抑制する特異的な microRNA を同定し、それを制御することで骨癒合遅延の治療効果が高まるとの仮説から臨床研究を行っている。骨癒合遅延患者の血液サンプルを採取し、そこから TGF- $\beta$  1 と BMP-2 の経時的变化を ELISA 法によって測定する。また網羅的な microRNA の解析を行うとともに、microRNA-17/92cluster と miR-140 が、BMP-2 や TGF- $\beta$  1、それらのレセプター、関連因子の Smad s などを同時に抑制すると考えられることに注目して、血液サンプルからこれらを qPCR で測定し、その関連を検討する

こととしている。

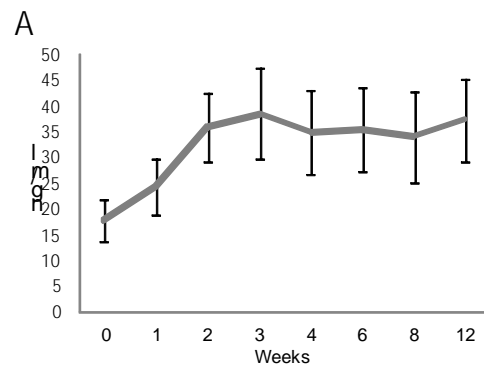
(2) そして、これらの microRNA が早期から骨癒合遅延に陥るバイオマーカーになり得るかの検討と、特定の microRNA をノックアウトすることで、骨癒合が促進されるかどうかの動物実験に発展させていきたいと考えている。

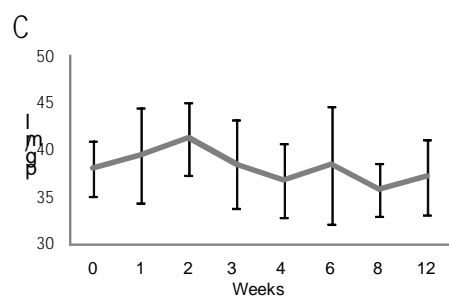
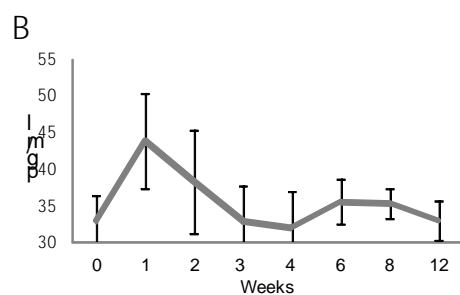
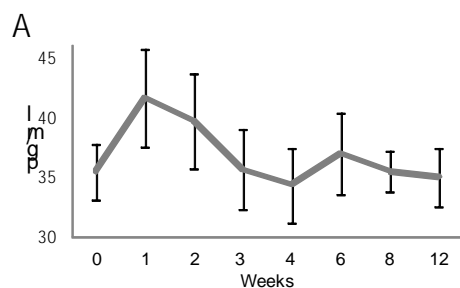
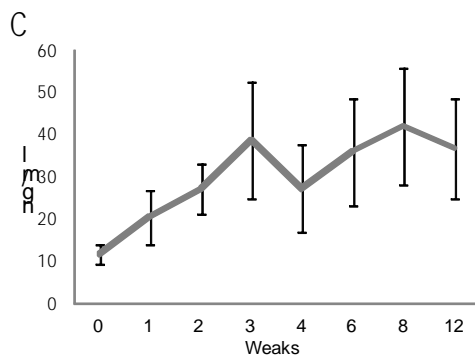
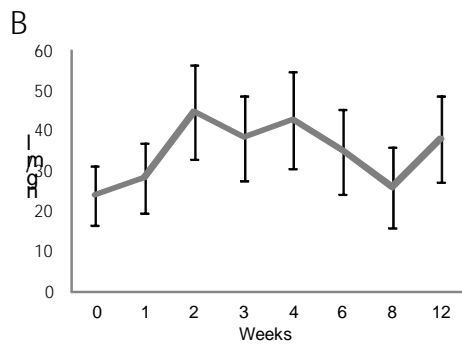
## 3. 研究の方法

骨折患者より採取した血漿サンプルから ELISA 法によって TGF- $\beta$  1、BMP-2 血中濃度の経時的变化を解析して、骨癒合群(U群)と癒合遅延群(NU群)の各群で比較する。次に qPCR 法で microRNA (以下 miR) -17/92cluster、miR-140 の定量解析を行う。そして、これらのデータを参考に2つのサイトカインに関連する miR の変化を検討する。次のステップでは in vitro での動物実験によりターゲットの miR をノックダウンさせることで骨癒合の変化を再現させることができるかを確認する。

## 4. 研究成果

100名近い患者さんから血液検体を採取し、血漿分離した後当悪血保存した。3ヶ月間経過を追跡してU群と癒合しなかったNU群に分けた。データのそろった各群10検体を研究対象症例とした。まず両群間の骨癒合サイトカインである BMP2 と TGF $\beta$ 1 の受傷時期ごとの血漿中濃度の推移を測定した。





その際、2 群間でその推移に違いを認め、骨癒合の早期マーカーとなり得る可能性を認めたため、研究の重点をそのことに移行し研

究を進めた。データ欠損の無い各群 10 名の検体を調査し、U 群では 2 つのサイトカインの初期ピーク値が NU 群と比較し 1 週間早くなっていることがわかった。現在、有効な骨融合の早期マーカーは存在せず、今回の研究は有意義なものであると考えられた。

#### 参考文献

1. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88:873-884. 2003.

2. Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury* 38(Suppl 1):S11-S25. 2007.

3. Raggatt LJ, Wulschleger ME, Alexander KA, et al. Fracture healing via periosteal callus formation requires macrophages for both initiation and progression of early endochondral ossification. *Am J Pathol* 184:3192-3204, 2014.

4. Volpin G, Cohen M, Assaf M, Meir T, Katz R, Pollack S. Cytokine levels (IL-4, IL-6, IL-8 and TGFβ) as potential biomarkers of systemic inflammatory response in trauma patients. *Int Orthop* 38:1303-1309, 2014.

5. Szczesny G, Deszczyński J. The bone union process: pathophysiology and clinical issues. Factors conditioning the occurrence of bone union on the molecular level. *Ortop Traumatol Rehabil* 2:21-30, 2000.

6. Balooch G, Balooch M, Nalla RK, et al. TGF-beta regulates the mechanical properties and composition of bone matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18813-18818, 2005.

7. Lind M, Schumacker B, Soballe K, Keller J, Melsen F, Bunger C. Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand* 64:553-556, 1993.
8. Gazit D, Zilberman Y, Turgeman G, Zhou S, Kahn A. Recombinant TGF-beta1 stimulates bone marrow osteoprogenitor cell activity and bone matrix synthesis in osteopenic, old male mice. *J Cell Biochem* 73:379-389, 1999.
9. Blumenfeld I, Srouji S, Lanir Y, Laufer D, Livne E. Enhancement of bone defect healing in old rats by TGF-beta and IGF-1. *Exp Gerontol* 37:553-565, 2002.
10. Schmidmaier G, Wildemann B, Heeger J, Gäbelein T, Flyvbjerg A, Bail HJ, Raschke M. Improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1. *Bone* 31:165-172, 2002.
11. Sarahrudi K, Thomas A, Mousavi M, Kaiser G, et al. Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1) levels in human fracture healing. *Injury* 42:833-837, 2011.
12. Kaiser G, Thomas A, Köttstorfer J, Kecht M, Sarahrudi K. Is the expression of transforming growth factor-beta1 after fracture of long bones solely influenced by the healing process? *Int Orthop* 36:2173-179, 2012.
13. Schwabe P, Simon P, Kronbach Z, Schmidmaier G, Wildemann B. A pilot study investigating the histology and growth factor content of human non-union tissue. *Int Orthop* 38:2623-2629, 2014.
14. Zimmermann G, Henle P, Küsswetter M, et al. TGF-beta1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone* 36:779-785, 2005.
15. Lissenberg-Thunnissen SN, de Gorter DJ, Sier CF, Schipper IB. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int Orthop* 35:1271-1280, 2011.
16. Gouttenoire J, Bougault C, Aubert-Foucher E, et al. BMP-2 and TGF-beta1 differentially control expression of type II procollagen and alpha 10 and alpha 11 integrins in mouse chondrocytes. *Eur J Cell Biol* 89:307-314, 2010.
17. Jones AL. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in fracture care. *J Orthop Trauma* 19:23-25, 2005.
18. Aro HT, Govender S, Patel AD, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2: A randomized trial in open tibial fractures treated with reamed nail fixation. *J Bone Joint Surg Am* 93:801-808, 2011.
19. Szczęśny G, Olszewski WL, Zagozda M, et al. Genetic factors responsible for long bone fractures non-union. *Arch Orthop Trauma Surg* 131:275-281, 2011.
20. Tzioupis C, Giannoudis PV. Prevalence of long bone nonunions. *Injury* 38:S3-S9, 2007.
21. Kanakaris NK, Giannoudis PV. The health economics of the treatment of long-bone non-unions. *Injury* 38:S77-S84, 2007.
22. Kwong FN, Hoyland JA, Freemont AJ, Evans CH. Altered relative expression of BMPs and BMP inhibitors in cartilaginous areas of human fractures progressing towards nonunion. *J Orthop Res* 27:752-757, 2009.

23. van Baardewijk LJ, van der Ende J, Lissenberg-Thunnissen S, et al. Circulating bone morphogenetic protein levels and delayed fracture healing. Int Orthop 37:523-527, 2013.

24. de Gorter DJ, van Dinther M, Korchynski O, ten Dijke P. Biphasic effects of transforming growth factor  $\beta$  on bone morphogenetic protein-induced osteoblast differentiation. J Bone Miner Res 26:1178-1187, 2011.

25. Sheu TJ, Zhou W, Fan J et al. Decreased BMP2 signal in GIT1 knockout mice slow bone healing. Mol Cell Biochem 397:67-74, 2014.

26. Ehnert S, Zhao J, Pscherer S, et al. Transforming growth factor  $\beta$ 1 inhibits bone morphogenic protein (BMP)-2 and BMP-7 signaling via upregulation of Ski-related novel protein N (SnoN): possible mechanism for the failure of BMP therapy? BMC Med 10:101, 2012.

27. Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. ANZ J Surg 77:626-31, 2007.

28. Ghodadra N, Singh K. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the treatment of bone fractures. Biologics 2:345-54, 2008.

#### 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0件)

〔学会発表〕(計1件)

第40回 日本骨折治療学会総会(熊本県熊本市:ホテル日航熊本:平成26年6月27-28日)で報告  
演題「骨癒合過程におけるTGF- $\beta$ ファミリーの血漿中の濃度測定の意義」

発表者: 原 義明

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

原 義明 (YOSHIAKI HARA)

日本医科大学医学部 助教

研究者番号: 20386197

##### (2) 研究分担者

ムハンマド・ガジザデ (M. GHAZIZADE)

日本医科大学 付置研究所 准教授

研究者番号: 30190979

##### (3) 分担研究者

清水 一 (HAJIME SHIMIZU)

日本医科大学 付置研究所 その他

研究者番号: 60398873

##### (4) 研究分担者

益子 邦洋 (KUNIHIRO MASHIKO)

日本医科大学医学部 教授

研究者番号: 70165695