

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462291

研究課題名(和文)Pleiotrophinによる力学的骨形態形成の機序解明

研究課題名(英文)Pleiotrophin as an osteocyte-derived osteogenic mediator of mechanical loading: evidence from in vivo and in vitro studies

研究代表者

今井 晋二 (Imai, Shinji)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：90283556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：過去の報告に一致して、Pleiotrophin (PTN) ノックアウトマウスは骨形態上の発達欠損は認めない。しかし、成長に伴って荷重骨に現れる骨の成長が遅延していた。成長PTNノックアウトマウスでは、骨代謝に低回転と骨量減少が認められた。これに運動を負荷しても、本来力学的刺激で見られるはずの骨形成が欠損していた。PTNは骨細胞が産生しており、ヒト破骨細胞や骨吸収には、全く影響を及ぼさない。今回の研究で、PTNは骨細胞由来の力学的骨形成調整因子である可能性が示唆された。PTNを用いた骨粗鬆症や骨再生の治療が可能になる可能性を有する。

研究成果の概要(英文)：In agreement with previous reports, the skeletal structure of the PTN knockout mice developed normally. However, a subtle growth retardation of the weight-bearing bones was observed upon adulthood, suggesting a link to physical activity. Adult PTN deficient mice were characterized by low turnover and osteopenia, as well as resistance to exercise/immobilization-dependent bone remodeling. PTN was localized around osteocytes and their processes in vivo and furthermore, osteocytic PTN expression was upregulated by mechanical loading in vitro. PTN did not have any effect on human osteoclast formation or resorption in vitro. Our results suggest that PTN is an osteocyte-derived factor that can mediate the osteogenic effects of mechanical loading on bone. Thus, PTN could be a novel promising target to enhance bone maintenance and regeneration.

研究分野：整形外科学

キーワード：力学的骨形成調節 骨芽細胞 骨細胞 pleiotrophin

1. 研究開始当初の背景

急速な人口の高齢化に伴い、我が国は他に例を見ない超高齢化社会を迎えています。国民生活調査では要介護・要支援の原因疾患として運動器にかかわる疾患が全体の24%を占め、もっとも直接的な脅威です。

運動負荷により骨・関節の機能を向上させるべきだ、との考えは2011年に改定された日本骨粗鬆症学会の「骨粗鬆症診療ガイドライン」にも反映され「運動による骨量改善」が推奨Aに格上げされています。しかし、その医学的根拠は驚くほど貧弱です。

骨形成を担当する骨芽細胞は、骨組織のあらゆる表面に存在しますが、常に骨形成しているわけではありません。全く休止している細胞から活発に骨を産生している細胞まで幅広い活性を有しますが、その細胞の生涯で一致しているのは、骨形成を終了すると自ら産生した骨器質の中に埋没してしまうことです。骨に埋もれた細胞は骨細胞とその名を変えます。

実際に培養骨芽細胞を力学的に変形させると骨形成が増幅しますが、骨形成の力学的増幅には1~3%の変形を要します。しかし、実際に骨実質を1~3%も変形させると骨折を起こしてしまいます。これが0.5%未満といわれる骨の生理的変形では、骨芽細胞の直接的刺激による力学的骨形成調節機構が説明されえないからです。

2. 研究の目的

骨小腔は細胞外液で満たされ、骨細胞はその中に浮かんだように存在する。通常の運動負荷では0.5%以下といわれる生理的な骨実質の変形でも、骨小腔内には3Paもの波動圧が出現する。すなわち、通常レベルの運動負荷でも骨小腔内では、激しい細胞外液流により骨細胞が変形され、その程度は骨形成の力学的増幅に必要な2~3%の変形を凌駕する。このように骨小腔とその中に隔離された骨細

胞が力学的刺激のアンプリファイヤーとして力学的骨形成調節機構に機能しているのではないかとの考え方が支持されるようになった。波動圧による骨細胞への力学的刺激が骨形成の力学的調節機構を介するとの仮説を実証するには、骨細胞の力学的刺激に反応して、骨芽細胞に伝えられる力学的骨形成調節因子が必要になる。本研究ではPTNが、この骨細胞由来の力学的骨形成調節因子であることを示すことである。

3. 研究の方法

インキュベーター内に波動圧発生装置を設置し、波動圧で培養マウス骨細胞を刺激し、PTNタンパク分泌をWestern blottingで検討する。

PTN^{-/-}マウスを作成し、PTN^{-/+}マウスのペアから十分量のinbred PTN^{+/+}マウスとPTN^{-/-}マウスを確保する。Southern blottingでgenotypingをしながら、各20匹程度のinbred個体数を準備する。15代程度inbred化を進め、PTN^{-/-}マウスとPTN^{+/+}マウスの表現型、特に低回転型骨粗鬆症の有無を調べる。

運動負荷試験では、トレッドミルを設置したケージで一定期間飼育することにより運動を負荷する。正常マウスでは運動負荷により健常下肢が長軸方向に成長する。成長の速度は年齢にも依存するので実験動物はinbred化を進めるだけでなく、年齢も厳密に均一化しなければならない。inbred PTN^{+/+}マウス、PTN^{-/-}マウスの各々10匹ずつトレッドミルを設置したケージに飼育し、運動負荷実験期間は1ヶ月とした。統計学的処理を可能にする為、inbred PTN^{+/+}マウスとinbred PTN^{-/-}マウスの各20匹でデータをとった。

4. 研究成果

Pleiotrophin (PTN) ノックアウトマウス

は骨形態上の発達欠損は認めない。しかし、成長に伴って荷重骨に現れる骨の成長が遅延していた。成長PTN ノックアウトマウスでは、骨代謝に低回転と骨量減少が認められた。これに運動を负荷しても、本来力学的刺激で見られるはずの骨形成が欠損していた。PTNは骨細胞が産生しており、ヒト破骨細胞や骨吸収には、全く影響を及ぼさない。今回の研究で、PTNは骨細胞由来の力学的骨形成調整因子である可能性が示唆された。

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14件)

1. Kodama N, Takemura Y, Shioji S, Imai S. Arthrodesis of the ankle using an anterior sliding tibial graft for osteoarthritis secondary to osteonecrosis of the talus: A comparison of vascularized non-vascularised grafts. *Bone Joint J.*98-B:359-364, 2016. 査読有 DOI:10.1302/0301-620X.98B3.36154.
2. Kumagai K, Toyoda F, Staunton CA, Maeda T, Okumura N, Matsuura H, Matsusue Y, Imai S, Barrett-Jolley R. Activation of a chondrocyte volume-sensitive Cl⁻ conductance prior to macroscopic cartilage lesion formation in the rabbit knee anterior cruciate ligament transection osteoarthritis model. *Osteoarthritis Cartilage.*24:1786-1794, 2016. 査読有 DOI:10.1016/j.joca.2016.05.019.
3. Mori K, Nishizawa K, Amano T, Nakamura A, Murakami T, Imai S. Giant balloon-like presacral schwannoma. *Spine J.*16:e255-256, 2016. 査読有 DOI:10.1016/j.spinee.2015.10.051.
4. Maeda T, Toyoda F, Imai S, Tanigawa H, Kumagai K, Matsuura H, Matsusue Y. Lidocaine induces ROCK-dependent membrane blebbing and subsequent cell death in rabbit articular chondrocytes. *J Orthop Res.*34:754-762, 2016. 査読有 DOI:10.1002/jor.23092.
5. Kodama N, Takemura Y, Ueba H, Imai S, Matsusue Y. A new form of surgical treatment for patients with avascular necrosis of the talus and secondary osteoarthritis of the ankle. *Bone Joint J.*97-B:802-808, 2015. 査読有 DOI:10.1302/0301-620X.97B6.34750.
6. Kodama N, Ishida A, Ueba H, Imai S, Matsusue Y. Florid reactive periostitis of the forearm with pronation and supination contracture. *J Orthop Sci.*20:1122-1126, 2015. 査読有 DOI:10.1007/s00776-014-0596-1.
7. Kodama N, Ueba H, Takemura Y, Ishida M, Imai S, Matsusue Y. Joint arthroplasty with osteochondral grafting from the knee for posttraumatic or degenerative hand joint disorders. *J Hand Surg Am.*40:1638-1645, 2015. 査読有 DOI:10.1016/j.jhssa.2015.05.014.
8. Mori K, Nishizawa K, Nakamura A, Ishida M, Imai S. Sudden paraplegia because of dumbbell-shaped metastatic neuroendocrine tumor (carcinoid tumor). *Spine J.*15:e1-3, 2015. 査読有 DOI:10.1016/j.spinee.2015.06.037.
9. Mimura T, Kawasaki T, Itakura S, Hirata T, Fujikawa H, Mori K, Imai S. Prevalence of radiological femoroacetabular impingement in Japanese hip joints: detailed investigation with computed tomography. *J Orthop Sci.*20:649-656, 2015. 査読有 DOI:10.1007/s00776-015-0733-5.
10. Araki S, Imai S, Ishigaki H, Mimura T, Nishizawa K, Ueba H, Kumagai K, Kubo M, Mori K, Ogasawara K, Matsusue Y. Improved quality of cartilage repair by bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of an osteochondral defect in a cynomolgus macaque model. *Acta Orthop.*86:119-126, 2015. 査読有 DOI:10.3109/17453674.2014.958807.
11. Imai S, Uenaka K, Matsusue Y. Idiopathic necrosis of the capitate treated by vascularized bone graft based on the 2,3 intercompartmental supraretinacular artery. *J Hand Surg Eur.*39:322-323, 2014. 査読有 DOI:10.1177/1753193412468396.
12. Shioji S, Imai S, Ando K, Kumagai K, Matsusue Y. Extracellular and intracellular mechanisms of mechanotransduction in three-dimensionally embedded rat chondrocytes. *PLoS One.*9:e114327, 2014.

査読有

DOI:10.1371/journal.pone.0114327.

13.Oda K, Mori K, Imai S, Uenaka K, Matsusue Y. Comparison of repair between cartilage and osteocartilage defects in rabbits using similarly manipulated scaffold-free cartilage-like constructs. J Orthop Sci.19:637-645, 2014. 査読有
DOI:10.1007/s00776-014-0574-7.

14.Kodama N, Takemura N, Ueba H, Imai S, Matsusue Y. Ultrasound-assisted closed reduction of distal radius fractures. J Hand Surg Am.39:1287-1294, 2014. 査読有
DOI:10.1016/j.jhsa.2014.02.031.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 今井晋二 (招待講演). 肩挙上困難の治療と運動器リハビリテーション. 第 2 回京都市リハビリテーション医学研究会学術集会. 京都市. 2016.2.7.

2. 今井晋二. 運動療法の基本と実際 - 診断と治療方針 -. 第 53 回日本リハビリテーション医学会学術集会. 京都市. 2016.6.9 ~ 11.

3. Maeda T, Imai S, Toyoda F, Tanigawa H, Kumagai K, Matsusue Y. Lidocaine induces rock-dependent membrane blebbing and cell death in rabbit articular chondrocyte. OARSI2015 World Congress, Washington, USA, 2015.4.30 ~ 5.3.

4. 今井晋二、中島亮、川崎拓、平田知大. 第 52 回日本リハビリテーション医学会学術集会. 新潟市. 2015.5.28 ~ 30.

5. 今井晋二 (招待講演). 肩腱板断裂とインピンジメント症候群 - 診断と治療の実際. 福井県臨床整形外科医会学術集会. 福井市. 2015.11.26.

6. 前田勉、今井晋二、豊田太、熊谷康佑、森幹士、松浦博、松末吉隆. Lidocaine はウサギ軟骨細胞に Rho-kinase 依存症の membrane blebbing を起こす. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会. 鹿児島市. 2014.10.9 ~ 10.

7. 今井晋二 (招待講演). 骨粗鬆症とロコモティブシンドローム. 第 20 回教養学習会. 大津市. 2014.10.23.

8. 今井晋二 (招待講演). 五十肩と腱板断裂. 第 33 回滋賀医科大学公開講座. 草津市. 2014.11.12.

〔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

今井 晋二 (IMAI SHINJI)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 90283556

(2) 研究分担者

松末 吉隆 (MATSUSUE YOSHITAKA)
滋賀医科大学・医学部・副学長
研究者番号 : 30209548

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()