

論文内容要旨

Local administration of WP9QY (W9) peptide promotes bone formation in a rat femur delayed-union model

(ラット大腿骨難治性骨折モデルに対する WP9QY ペプチド局所投与は骨折治癒を促進する)

Journal of Bone and Mineral Metabolism, in press.

主指導教員：安達 伸生教授

(医歯薬保健学研究科 整形外科学)

副指導教員：大段 秀樹教授

(医歯薬保健学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：久保 忠彦准教授

(医歯薬保健学研究科 整形外科学)

澤 幹也

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

論文題目

Local administration of WP9QY (W9) peptide promotes bone formation in a rat femur delayed-union model

(ラット大腿骨難治性骨折モデルに対する WP9QY ペプチド局所投与は骨折治癒を促進する)

【目的】

WP9QY ペプチド (W9) は TNF- α 受容体拮抗剤として開発された 9 個のアミノ酸で構成される環状合成ペプチドであるが, RANK-RANKL シグナルへの拮抗作用も有し, 骨吸収を阻害する. 一方で, W9 は骨芽前駆細胞由来の骨形成関連因子の発現を上昇させ, 骨皮質形成を促進することも報告されている. 本研究では, W9 の骨折治療への臨床応用を目指し, ラット大腿骨難治性骨折モデルに対する W9 局所投与の骨修復促進効果を検討した.

【方法】

12 週齢 SD ラットの右大腿骨中央部に骨折部を作成し, 末梢・中枢各 2mm ずつ骨膜を焼灼, 髓内に 1.2mm K-wire を挿入し難治性骨折モデルを作成した. 骨折部に W9 (100 μ l, 1mg) を手術時および以後 1 週ごと投与した群を W9 群, 同時期に同量の PBS のみを投与した群を対照群とした (各 7 匹). 術後 2, 4, 6, 8 週に X 線撮影を行い骨折部周囲の仮骨形成, 架橋の程度をスコアリングした. 術後 8 週で屠殺し, マイクロ CT で骨形態解析後に組織を Toluidine Blue 染色, TRAP 染色にて評価した. また, 骨折部周囲の骨芽細胞数評価のため術後 4 週にて非脱灰標本を作製 (各 4 匹) し Villanueva bone 染色にて評価した. さらに, 術後 2 週時点で骨折部周囲の仮骨を採取し RT-PCR にて骨形成に関連する遺伝子の発現を検討した (各 6 匹).

【結果】

術後 2, 4, 6, 8 週での各群における X 線写真で, PBS 群では焼灼した骨膜周囲の仮骨増生が乏しく多くのラットで仮骨の架橋を認めなかったのに対して, W9 群では焼灼部周囲に仮骨の増生を認め術後 6~8 週にかけて架橋を認める傾向にあった. X 線で骨折部の両皮質に骨性架橋を認めるものを骨癒合と定義すると, 術後 8 週で W9 群 57%, PBS 群 14%に骨癒合を認めた. また, 術後 8 週の X 線スコアは PBS 群と比較し W9 群で有意に高値であった. マイクロ CT による骨形態解析で, 骨折部中枢・末梢各 5mm 範囲の仮骨量 (TV) と仮骨中のミネラル化した骨量 (BV) を計測したところ, TV は両群間で差を認めなかったが, BV/TV は W9 群で有意に高値であった. また, TRAP 染色を用いた評価にて PBS 群と比較し W9 群で 4, 6, 8 週に骨折部周囲の TRAP-positive cell が有意に減少していた. さらに, Villanueva bone 染色を用いた評価にて術後 4 週における骨折部周囲の骨芽細胞数は W9 群で多い傾向にあった. 骨折部周囲より採取した仮骨の RT-PCR は骨形成因子を中心に W9 群で発現が上昇しており, CTGF, Col1A1, OC, BMP4, ALP1 にて両群間で有意差を認めた.

【考察】

これまでに, 難治性骨折治療の方法として PTH 製剤, 自家骨移植や Low intensity Pulsed

Ultrasound 等が報告されているが、使用期間制限、手術侵襲の問題や効果が一定でないという問題点が指摘されており、低侵襲で効果的な新たな骨折治療法の開発が期待される。W9 は 9 つのアミノ酸から形成されており分子量が小さく、分子量の大きい抗体等の薬剤と比較し生体内に及ぼす危険性も少ないことが期待されている。本研究結果から W9 投与群で X 線スコアが有意に高く、仮骨内の骨形成因子の発現が上昇し、マイクロ CT による評価で BV/TV が高値であった。つまり、難治性骨折モデルに対する W9 局所投与は仮骨からの骨成熟を促進させることで、骨折治癒に寄与していると考えられた。一方で、骨折部周囲の破骨細胞数は W9 群で有意に減少しており、有意差はなかったが W9 群で仮骨量が多い傾向にあった。これは W9 の骨吸収阻害作用によるものと考えられたが、骨癒合を阻害する所見は見られなかった。

破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のカップリング機構に関して、W9 は骨吸収には抑制的に働く一方で、骨形成を促進するというユニークな作用をもち、今後のカップリング機構の解明の一端を担うことが期待される。本研究で骨折治癒促進作用も明らかになったことから骨折治療剤としての応用が可能と考える。