

[総説]

骨折骨癒合研究の最近の進歩

— 分子細胞生物学の視点から —

中 島 新 山 崎 正 志 高 橋 和 久

(2009年12月2日受付)

要 旨

骨折治癒過程は損傷した骨組織が機械的負荷に耐える強度を回復するための生理反応である。主に炎症期、修復期（仮骨形成期）、リモデリング期の3つのステージから成り、そのステージによって幾種かの異なる細胞群が精巧な制御の下に互いに協調しながら組織修復を行っている。近年、動物実験では骨形態形成因子（bone morphogenetic protein, BMP）など細胞成長因子の局所投与による骨折治癒促進を目指した研究が盛んに行われており、我々も塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor, bFGF）の局所投与による骨折治癒への効果を検討した。bFGFは仮骨を増大する作用があるものの、骨密度や力学強度に影響はなく、骨癒合を促進しなかった。最近、副甲状腺ホルモンの間欠投与による強力な骨形成作用が注目を浴びており、我々はPTH（1-34）の皮下投与による骨折治癒促進効果を検討した。PTHは仮骨の骨密度や力学強度を有意に増加させたが、軟骨分化には影響を及ぼさなかった。さらに、骨癒合遅延と関連の深い病態の一つである糖尿病（diabetes mellitus, DM）において遷延治癒のメカニズムを検討した。DM群ではコントロールに比して仮骨が有意に小さく、II、X型コラーゲン、オステオポンチンの発現が有意に低下していた。将来、細胞成長因子や副甲状腺ホルモンなどの全身または局所投与によって骨折治癒促進が可能になることが期待されるが、同時に効率的な使用方法が求められる。そのためには分子細胞レベルでのメカニズムの解析が重要であることを忘れてはならない。

Key words: 骨折治癒, 分子細胞生物学, 塩基性線維芽細胞増殖因子, 副甲状腺ホルモン, 糖尿病

略語一覧: bFGF: basic fibroblast growth factor

PTH: parathyroid hormone

DM: diabetes mellitus

はじめに

運動器疾患を扱う整形外科において、筋骨格系の外傷は日常診療において最も頻繁に遭遇する疾患である。米国では毎年約3,300万人が筋骨格系の外傷を負うといわれており、これは米国民100人当たり13.8回の頻度にあたる。この中でおよそ

620万件が骨折によるものである[1]。骨折治療の基本は整復と固定であり、手術方法や固定材料の開発など近年の整形外科学および材料工学の進歩によって多くは満足のいく結果を得ることが可能になった。しかしながら今なお5-10%に遷延治癒や偽関節に至る成績不良例が存在することも事実である[2]。

千葉大学大学院医学研究院整形外科学

Arata Nakajima, Masashi Yamazaki and Kazuhisa Takahashi: Recent progress in fracture healing research through molecular and cellular biology.

Department of Orthopedic Surgery, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba 260-8670.

Tel. 043-227-1131. Fax. 043-227-1961. E-mail: a-nakaji@sf7.so-net.ne.jp

Received December 2, 2009.

骨折治癒過程は損傷した骨組織が機械的負荷に耐えうる強度を回復するための複雑な生理反応である。骨が他の組織と大きく異なるのは、損傷を受けてもほとんど瘢痕を残すことなく再生できるという点である。これは治癒過程の異なったステージにおいて必要な細胞群がオートクライン、パラクラインに特定の細胞内情報伝達を行い、細胞分化、基質合成などの一連の生物学的反応が精巧な制御の下に行われているからである。しかしながら、ある病態ではこの一連の生物学的イベントが円滑に進行しないために遷延治癒や偽関節に至ると考えられる。以上のことから、安定した骨折治療法の確立には手術方法や固定材料の開発だけでは不十分であり、細胞生物学、分子生物学の面から治癒過程に出現する一連の生物学的イベントを理解しておくことが重要である。

骨組織が非常に高い再生能力を持つ理由として、基質内に細胞成長因子が豊富に蓄積されていることが考えられる。今から約40年前にUristは移植骨の基質内に骨新生を誘導する因子があることを発見し、bone morphogenetic protein (BMP) と名付けた[3]。その後WozneyらによってBMPファミリーのクローニングが行われ、現在までに少なくとも16種類が同定されている[4]。さらに骨基質にはBMPの他にfibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor- β (TGF- β), insulin-like growth factor (IGF)などの細胞成長因子が豊富に存在することが知られている。これらの細胞成長因子は免疫組織学的手法やin situ hybridizationなどの分子生物学的手法によって骨折治癒過程に発現していることが示されている[5-9]。近年、遺伝子工学の発達によって大量のタンパク精製が可能になると、BMPを中心に細胞成長因子を用いた骨折治癒促進の研究が盛んになった[10]。我々もbasic FGFをラット大腿骨骨幹部骨折に局所投与し、その効果を検討した[2,11]。

本論では、これまでに我々が行ってきたbFGFによる骨折治癒への効果の他、最近、強力な骨形成作用を持つペプチドとして注目を集めている副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone, PTH) による骨折治癒促進効果、また、遷延治癒、偽関節との関連が深い糖尿病における骨折治癒遷延の

メカニズムを中心に、最近の骨折骨癒合研究について文献的考察を加えて解説する。

I. 骨折の治癒過程

骨折治癒過程は主に炎症期、修復期（仮骨形成期）、リモデリング期の3つのステージから成り、そのステージによって幾種かの異なる細胞群が互いに協調しながら組織修復を行う、複雑な生理反応である。骨折が起これると、まず血腫が形成され、そこにマクロファージ、リンパ球などの炎症性細胞や未分化間葉系細胞の浸潤がおこる。炎症性細胞から放出されるTNF- α 、IL-1、IL-6などの炎症性サイトカインは骨折治癒を正常に開始するために重要な役割を担っている[12,13]。血腫に多量に存在する血小板からはTGF- β 、PDGFなどの成長因子が放出され、細胞増殖や骨折部にリクルートされた未分化間葉系細胞の（軟骨細胞や骨芽細胞への）分化に重要な役割を果たしている。

骨折治癒の基礎研究にとって最も大切なことは、組織学的に再現性よく治癒過程を観察することが可能な骨折モデルの作成である。Bonnarensらはラット大腿骨骨幹部にこの条件を満たす閉鎖性骨折モデルの作成に成功した[14]。この骨折モデルでは炎症期に続いて修復期が骨折後4日頃から始まり、内軟骨性骨化と膜性骨化という2つの骨化過程が共存しながら治癒過程が進んでいく。骨折部近傍では間隙を埋めるように内軟骨性骨化によって軟骨（軟性仮骨）が形成される。軟骨形成と平行して、骨折部から少し離れたところでは骨膜が肥厚し、膜性骨化によって骨膜下に骨組織（硬性仮骨）が形成される。このようにして骨折後2週間までに仮骨の大きさはピークに達する。しかしながら骨折部には軟骨が豊富に介在し、硬性仮骨は未熟な骨（wooven bone）であり正常な層板骨ではない。骨折後10日頃から軟骨は、長管骨における成長板の石灰化とはほぼ同様のメカニズムで石灰化し、血管進入を受ける。肥大化した軟骨細胞はVEGFなどの血管新生因子やMMPなどの軟骨組織の吸収に必要なプロテアーゼを大量に産生するが、最終的にアポトーシスによって細胞死に至る。その後、石灰化軟骨への進入血管は骨芽細胞の前駆細胞をリクルートし、1次海面骨を

形成する。その後、石灰化軟骨が破骨（軟骨）細胞によって吸収されるにしたがって成熟した海面骨組織（2次海面骨）へと構造変化する。骨折後4週頃、軟骨がすべて骨組織に置換され骨癒合に至る。この後2-4週の長い期間をかけて機械的負荷に耐えうる層板構造をもった正常骨組織へとリモデリングし、癒痕を残すことなく骨折前の形態に回復していく。

II. 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) による骨折治癒促進の試み

FGFファミリーは30年以上前に下垂体に存在する分子量17kDaのタンパク (acidic FGF, aFGF; basic FGF, bFGF) として同定された[15]。その後の研究からFGFは下垂体のみならず、全身のほとんどの組織に存在し、多様な生理活性を有していることが明らかになった。現在までに23のサブタイプが報告されており、そのシグナルは4つのFGF受容体 (FGFR1-4) によって細胞内に伝達される。このリガンド-レセプター系は多対多対応をなして広範囲な組織に発現しており、多彩な生物情報を精巧に制御している[16]。FGFの生理作用として個体発生、特に中胚葉、神経外胚葉由来の細胞に対する細胞増殖、血管新生作用が報告されているが、中でもbFGFは細胞増殖、遊走、分化、血管新生に対して強力な作用を有している[17]。bFGFは血管、神経、骨格系の発達に重要な役割を果たしているばかりでなく、創傷治癒や組織修復にも深く関与している。

我々はラット閉鎖性大腿骨骨幹部骨折モデルを用いて、bFGFの骨折治癒への効果を検討した[2,11]。まず、骨折直後にヒト遺伝子組み換え型bFGF100 μ gを骨折部に単回投与し、骨折治癒過程における内軟骨性骨化（軟骨形成）への効果を検討した。bFGF投与群では、コントロール群に比べて早期に大きな軟骨を形成し、in situ hybridizationでは骨折後14日目にII型コラーゲン (COL2A1)、X型コラーゲン (COL10A1) 遺伝子の発現が広範囲にわたり認められた。Northern blotによる定量的解析では、bFGF投与群ではコントロール群に比してCOL2A1とCOL10A1の発現が約2倍に亢進していた。骨折

部における細胞増殖能を、抗PCNA抗体を用いた免疫染色にて解析したところ、骨折部近傍の未分化間葉系細胞の細胞増殖が有意に増加していた。しかしながら、内軟骨性骨化の最終段階である軟骨から骨組織への置換は両群において明らかな差は認められなかった。

次に、膜性骨化（骨形成）に及ぼす影響を検討したところ、骨折後1週以内の早期においてbFGF投与群ではコントロール群に比して骨膜下の前骨芽細胞様細胞の細胞増殖が約2倍に増加していた。bFGFが石灰化に及ぼす影響を分子レベルで調べるために、仮骨からRNAを抽出し、経時的にosteopontin mRNAの発現を解析した。しかしながら、骨折後28日までに両群間で有意差は認められず、発現パターンもほぼ同じであった。さらに、骨折後6、8週の時点で、仮骨の骨密度、力学強度、ねじり強度についても解析を行ったが、骨密度、力学強度については両群間に有意差は認められず、8週時点でのねじり強度はbFGF投与群でむしろ有意な低下を認めた。以上の結果から、閉鎖性長管骨骨折においてbFGF単回投与は仮骨を増大する作用があるものの、骨癒合は促進しないと結論した。

しかしながら我々とは全く逆の結果を報告する論文も見られる。複数のグループから、長管骨骨幹部骨折に対してbFGFを骨折部に単回投与することによって仮骨の増大と力学強度の有意な増加を認めたとの報告がある[18-22]。このような骨折治癒に対するbFGFの効果の差異は主に骨折モデルの違いから生じるものと考えられる。すなわち、我々の骨折モデルは完全な閉鎖性骨折であるために骨折部にリクルートされる未分化間葉系細胞の多くは軟骨細胞分化に向かう。一方、他のグループでは骨切りモデルが用いられており、この場合、骨折部近傍の未分化間葉系細胞が骨折部から大量に流出すると考えられる。従って、局所に投与されたbFGFは骨膜に存在する前骨芽細胞に選択的に作用することになる。また、我々の骨折モデルでは骨折部の固定性が比較的弱いことも軟骨形成を助長し、骨折治癒促進に対して逆効果となった可能性も考えられる。これまでの研究成果からbFGFの局所投与が将来の骨折治療に応用される可能性はあるものの、骨折の状態や固定性な

などを十分に考慮した上で慎重に使用されるべきと考える。

Ⅲ. 副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone, PTH) による骨折治癒促進効果

内因性の副甲状腺ホルモン (PTH) は骨や腎尿細管から Ca^{2+} を吸収し血中の Ca バランスを調節する重要な働きを担っている。一方、外因性の PTH はその投与方法によって骨組織に対して全く異なる作用をもつことが明らかにされている [23-28]。即ち、持続的に投与した場合には骨に対して異化作用を示すが、間欠的に投与した場合には同化作用を呈する。遺伝子組み換え型ペプチドとしては full length の PTH (1-84) と N 末端の 34 アミノ酸から成る PTH (1-34) が中心であるが、その生理作用は同じであると考えられている。最近の研究から、骨折治癒過程において PTH (1-34) の間欠投与は仮骨形成を促進し、力学強度を著明に増加させることが明らかとなった [29,30]。Andreassen らはラット大腿骨骨幹部骨折モデルを用い、骨折後 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の 2 つの用量で PTH (1-34) を連日皮下投与し、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群において、より大きな仮骨形成と強度をもった仮骨が得られたと報告した [29]。米国で行われた骨粗鬆症患者に対する大規模臨床試験においても、20-40 $\mu\text{g}/\text{day}$ の低用量の PTH (1-34) 皮下投与によって平均 21 ヶ月後に骨密度の増加が得られたと報告された [31]。米国では 2002 年にヒト組み換え型副甲状腺ホルモン [rhPTH (1-34); 一般名: teriparatide, 商品名: Forteo[®]] が重症骨粗鬆症患者への投与が承認されており、今後、強力な骨形成作用をもつ薬剤として広く骨粗鬆症患者に使用されていくことが予想される。さらにこの薬剤は、将来的に骨折治癒促進の新しい治療戦略として臨床応用の可能性も秘めている。動物実験では 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ という高用量において著明な骨折治癒促進効果が示されたが [29]、この用量はかなりの高用量であり現実的ではない。臨床応用を視野に入れた、より低用量での効果を検討することが必要であった。

そこで我々はより現実的な用量を想定し、投与

量を 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とし、ラット閉鎖性大腿骨骨幹部骨折モデルを用いて、その骨折治癒促進効果を分子レベルで解析した [32]。PTH 投与群ではコントロール群に比べて治癒過程早期から後期まで X 線学的に仮骨形成が著明であり (図 1)、骨折後 4、6 週において仮骨の骨塩量、骨密度、力学強度はいずれも有意な増加を認めた。抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色による細胞増殖能評価では、骨折後 2 日目の早期において骨膜下の前骨芽細胞の有意な増殖を認めた。仮骨リモデリングに重要な破骨細胞への影響を調べるために酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色を行い、仮骨内の破骨細胞数を比較した。その結果、骨折後 7 日目において PTH 投与群ではコントロール群に比して有意な増加を認めた。さらに、主要な骨基質タンパクである I 型コラーゲン、オステオネクチン、オステオカルシンの発現量を遺伝子レベルで解析するために仮骨から RNA を抽出し、Northern blot にて経時的な発現量の変化を調べた。その結果、骨折後 4-21 日のいずれの時点においても PTH 群で有意な発現量の増加を認めた。これまでに PTH による骨へ

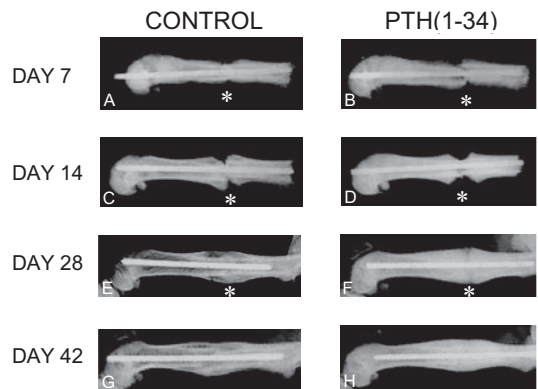


図 1 ラット閉鎖性大腿骨骨幹部骨折に対する PTH (1-34) の治癒促進効果。コントロール群 (A, C, E, G) と PTH 投与群 (B, D, F, H) の X 線写真を示す。骨折部の安定化のために、髓腔内には鋼線が挿入されている。PTH 投与群ではコントロール群に比べて骨折後 7 日目において仮骨形成促進が明らかであり (B)、14 日目においてその差はさらに著明となる (D)。骨折後 28、42 日目において、コントロール群では仮骨のリモデリングが認められるが (E, G)、PTH 投与群では引き続き骨形成が見られる (F, H)。米印は骨折部を示す。

のアナボリック効果はinsulin-like growth factor (IGF-I) を介する作用であることが報告されているため[26,33], 骨折治癒過程におけるIGF-Iの発現をin situ hybridization, Northern blotにより検討した。IGF-I mRNAは骨膜下の骨芽細胞様細胞や骨梁周囲の成熟骨芽細胞に発現が認められ、PTH群においてより強いシグナルが観察された。Northern blotでは骨折後4-7日においてPTH群において有意な発現の増加を認めた。

PTHのhomologueである副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)は胎児や長管骨の発生過程において軟骨の肥大化を抑制することが知られているため[34,35], 骨折治癒過程においても軟骨の肥大化を抑制し、内軟骨性骨化を遅延させる可能性が考えられた。このため我々はPTHの骨折治癒過程における軟骨形成への効果を検討した[36]。骨折後14日目においてPTH群ではコントロール群に比して軟骨面積の有意な増加を認めた。抗PCNA抗体を用いた免疫染色による細胞増殖能評価では、骨折後4-7日目の早期において骨折部近傍の未分化間葉系細胞の有意な増殖を認めたが、軟骨細胞では明らかな差はなかった。In situ hybridizationでも骨折後4日目においてIGF-I mRNAは骨折部近傍の未分化間葉系細胞に

Mechanisms of enhancement of fracture healing by PTH(1-34)
- Intramembranous ossification -

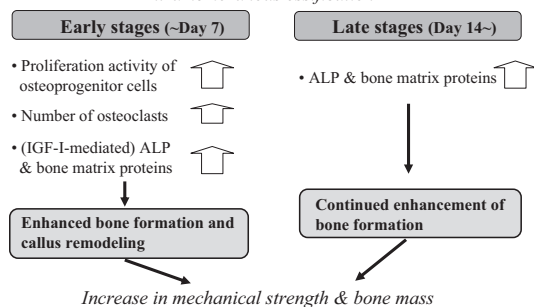


図2-A PTH(1-34)による骨折治癒促進のメカニズム(膜性骨化)。PTH投与は、骨折後7日目までの早期において、骨膜下の前骨芽細胞の増殖と骨梁周囲の破骨細胞の増加を促す。またIGF-Iを介してアルカリホスファターゼ(ALP)の発現や骨基質タンパクの産生を増加させる。これらの結果、骨形成とリモデリングが促進される。14日以降の後期においても引き続きALPの発現や骨基質タンパクの産生を増加させる。最終的に仮骨の骨密度、力学強度は増加する。

Mechanisms of enhancement of fracture healing by PTH(1-34)
- Endochondral ossification -

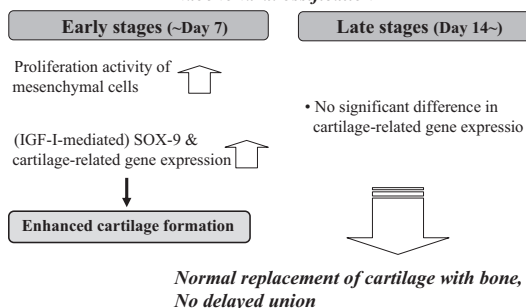


図2-B PTH(1-34)による骨折治癒促進のメカニズム(内軟骨性骨化)。PTH投与は、骨折後7日目までの早期において、骨折部近傍の未分化間葉系細胞の増殖とIGF-Iを介したSOX-9および軟骨関連遺伝子の発現を増加させる。これらの結果、軟骨形成は促進される。14日以降の後期では、軟骨関連遺伝子の発現は影響を受けない。最終的に正常な軟骨から骨への置換が行われ、骨癒合は遅延しない。

強い発現を認めたが、軟骨細胞では明らかな差はなかった。Northern blotでは骨折後4日目において軟骨分化の重要な転写因子であるSox-9の発現がPTH群で有意に増加しており、同時期におけるII型コラーゲンの発現も増加していた。しかしながら、骨折後14日目以降は両群間においてII型コラーゲン、X型コラーゲン、オステオポンチン、Sox-9の発現に有意差は認められなかった。以上の結果から、PTH間欠投与によって速やかに膜性骨化が刺激され、早期に機械的負荷に耐えうる骨組織に回復させることが可能であるが、内軟骨性骨化には影響を及ぼさないことが明らかになった(図2-A, -B)。

IV. 糖尿病における骨折治癒遷延のメカニズム

糖尿病と骨折後の癒合不全、偽関節との関連はこれまでに数多く報告されている[37-41]。また、実験的に作成した糖尿病モデルにおいても同様に多くの報告がある[42-47]。しかしながら、そのほとんどは骨折治癒過程における膜性骨化への影響であり、内軟骨性骨化に対する影響については不明であった。また癒合不全に至りやすいメカニズムを分子レベルで解析した論文も少なかった。そこで我々は実験的にI型糖尿病ラットを作成、

閉鎖性大腿骨骨幹部骨折を作成し、特に内軟骨性骨化への影響に着目して分子レベルでの解析を行った[48]。X線学的評価では骨折後4週においてDM群ではコントロール群に比して有意に骨癒合率の低下を認めたと、6週では両群間で有意差は認めなかった。Toluidine blue染色による軟骨面積の計測では、骨折後4週までいずれの時期においてもDM群で有意に低下していた。抗PCNA抗体を用いた免疫染色による細胞増殖能評価では、骨折部近傍の未分化間葉系細胞、軟骨細胞においてともに骨折後4、7日目の早期においてDM群で有意な低下を認めた。さらに、主要な軟骨基質であるII型コラーゲンや軟骨肥大化の指標となるX型コラーゲン、オステオポンチンの発現をNorthern blotにて検討したところ、骨折後4週までいずれの時点においてもDM群で低下していた。以上のことから、DMでは未分化間葉系細胞の増殖と主にII型コラーゲンの産生が低下するために小さい仮骨を形成することが示された。さらに内軟骨性骨化の最終分化段階である軟骨細胞の肥大化や石灰化が遅延することで、遷延治癒または偽関節に至りやすくなるメカニズムが考えられた。

DMの病態であるインスリン欠乏または抵抗性がいかなる機序によって骨癒合不全に至るのであるか? Shimoakaらはインスリン・シグナルに重要な共通の基質であるinsulin receptor substrate-1 (IRS-1) のノックアウトマウスの脛骨骨折モデルを作成し、野生型との治癒過程を比較検討した[49]。その結果、IRS-1ノックアウトマウスでは仮骨形成が著明に減少しており、骨癒合の遅延、偽関節の発生が多く認められた。組織学的には骨折部近傍の未分化間葉系細胞の増殖が抑制され、修復期の膜性骨化が抑制されるとともに、内軟骨性骨化においても十分な軟骨細胞の増殖がないまま分化が進行してアポトーシスに至るため、骨癒合が遅延する所見が得られた。これらの事実は正常な骨折治癒にはIRS-1を介したインスリン・シグナルが必須であることを示している。事実、DMモデルに認められた骨折治癒の遅延は、インスリンの全身あるいは局所投与によって正常に回復されることが報告されている[45,50-52]。DMによる骨折治癒遅延のメカニ

ズムはインスリン・シグナルの異常の他、Dlx5, Runx2, c-fos, c-junなど骨芽細胞分化を制御する転写因子の発現低下[53]、内軟骨性骨化の過程で軟骨細胞が十分に肥大化する前に破骨(軟骨)細胞によって軟骨基質が吸収され[54]、その際にTNF- α の過剰発現が関与する[55]などのメカニズムが考えられている。

V. 今後の展望—骨折治癒促進法の確立を目指して—

骨折治療法の習得は整形外科医の最も基本的事項であるが、未だ確立されたものとは言い難い。冒頭に述べたように、骨折治癒過程は炎症期、修復期(仮骨形成期)、リモデリング期の3つのステージが順に出現し、内軟骨性骨化と膜性骨化という2つの異なる骨化過程が存在する。さらに、そのステージ、場所によって幾種かの異なる細胞群が共存している。これらを考えると、ある一種の薬剤(ペプチド)の投与で骨折治癒過程の全てのステージを促進することは極めて困難である。骨折治癒促進の難しさは正にこの点にあるといっても過言ではない。

このような中で、現在最も可能性のある治癒促進法はBMPなどの細胞成長因子を骨折局所に投与する方法であろう。しかしながら、安全かつ効率的に作用させるためにはdrug delivery system (DDS)の開発が不可欠である。DDSとして合成担体(多孔性 β -tricalcium phosphate, hydroxyapatiteなど)が開発されており、既に骨欠損モデルでその有用性が報告されている[56,57]。また、生物種によって細胞成長因子に対する感受性が大きく異なる点も臨床応用への弊害となっている。特にヒトや霊長類のBMPに対する感受性は、げっ歯類に比べて極端に低いいため、骨形成誘発には高用量のペプチドが必要であり、コスト面から骨再生医療材料としての汎用性が妨げられている。これらの問題を解決するためには、BMP単独ではなくその効果を増強する分子の併用や生産コストの低減が求められる。

我々が研究を進めてきたPTH (1-34)の全身投与も臨床応用に近い治癒促進法であると考えている。特に本剤は骨粗鬆治療薬として既に臨床で使

用されている（本邦では臨床治験中）点が強みである。PTH (1-34) が本邦で骨粗鬆治療薬として使用認可が下りれば、次は骨折治療への適応を目指した臨床治験が始まる日もそう速くはないであろう。全身投与に当たっては有害事象が問題となり、事実、ラットでは2年間の投与で骨肉腫が発生したことが報告され[58]、我が国でのPTH臨床治験は過去に一度中止せざるを得ない状況になった経緯がある。その後の報告から骨肉腫の発生は投与期間と量によることが報告され[59]、霊長類（カニタイザル）での報告では、2年間の投与後3年経過観察を行ったが骨肉腫の発生はなかったと報告された[60]。我々の実験では屠殺時まで連日PTH (1-34) の皮下投与を行ったが、臨床応用に当たっては開始時期をいつにするか、投与はいつまで行うのか、などに関して十分な検討が必要であろう。PTH受容体（特にPTH1R）は骨、軟骨細胞に広く発現しており、同じ細胞でも骨折治癒過程のステージによって異なった細胞応答を示す。PTHを効率的に骨折治療に応用していくためには、同時に分子細胞レベルでのメカニズムの解析が極めて重要であることを忘れてはならない。

謝 辞

本論は中島文毅、小笠原 明、後藤憲一郎、清水純人、仲澤徹郎先生ら千葉大学整形外科骨代謝グループの研究成果を基に執筆させていただきました。ここに感謝申し上げます。

SUMMARY

Fracture healing is a complex physiologic process in which bone heals for the purpose of transferring mechanical loads. It consists of three different phases including inflammation, regeneration (callus formation), and remodeling where several types of cells participate in the healing process under the control of specific paracrine and autocrine intracellular signaling pathways. Recently, basic research aiming at enhancement of fracture healing by a local injection of growth factors such as bone morphogenetic proteins (BMPs) has been conducted, and we also investigated the effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) on rat fracture healing. bFGF increased the callus size but had no effect on bone mineral density (BMD) or mechanical strength of the callus. Increasing

evidence has shown that intermittent treatment of parathyroid hormone (1-34) [PTH (1-34)] strongly stimulates bone formation, and we also verified the effect of a systemic injection of PTH (1-34) on rat fracture healing. PTH (1-34) significantly increased BMD and mechanical strength of the callus but had no effect on replacement of cartilage with bone, which is an important biological event for bone union. Furthermore, we analyzed mechanisms of delayed bone healing in rats complicated with diabetes mellitus (DM). In DM group, the callus size was significantly smaller than controls, and expression of type II-, type X-collagen, and osteopontin was significantly diminished. In the near future, fracture healing could be accelerated by clinical interventions of growth factors and/or PTH (1-34). We should note that molecular and cellular biological studies for the mechanism of bone healing are indispensable to effectively use these peptides in the future treatment of skeletal injuries.

文 献

- 1) Praemer A, Furner S, Price OP. Musculoskeletal conditions in the United States. Rosemont, IL. Am Orthop Surg 1992; 85-91.
- 2) Nakajima F, Nakajima A, Ogasawara A, et al. Effects of a single percutaneous injection of basic fibroblast growth factor on the healing of a closed femoral shaft fracture in the rat. Calcif Tissue Int 2007; 81: 132-8.
- 3) Urist MR. Bone. Formation by autoinduction. Science 1965; 150: 893-9.
- 4) Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. Science 1988; 242: 1528-34.
- 5) Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. Proc Soc Exp Biol Med 1998; 200: 165-70.
- 6) Bostrom MPG, Lane JM, Berberian WS, et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. J Orthop Res 1995; 13: 357-67.
- 7) Ishidou Y, Kitajima I, Obama H, et al. Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. J Bone Miner Res 1995; 10: 1651-9.
- 8) Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, et al. Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. Bone 1998; 22: 605-12.
- 9) Nakajima A, Nakajima F, Shimizu S, et al. Spatial and temporal gene expression of fibroblast growth factor type I receptor (FGFR1) during fracture healing in the rat. Bone 2001; 29: 458-66.
- 10) Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. J Bone Joint Surg Am 2002; 84-A: 1032-44.

- 11) Nakajima F, Ogasawara A, Goto K, et al. Spatial and temporal gene expression in chondrogenesis during fracture healing and the effects of basic fibroblast growth factor. *J Orthop Res* 2001; 19: 935-44.
- 12) Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, et al. Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor- α signaling. *Cell Tissues Organs* 2001; 169: 285-94.
- 13) Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF- α signaling: the role of TNF- α in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 1584-92.
- 14) Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 1984; 2: 97-101.
- 15) Gospodarowicz D, Handley HH. Stimulation of division of Y1 adrenal cells by a growth factor isolated from bovine pituitary glands. *Endocrinology* 1975; 97: 102-7.
- 16) Thomas KA. Fibroblast growth factors. *FASEB J* 1996; 1: 434-40.
- 17) Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, et al. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 1987; 8: 95-114.
- 18) Kawaguchi H, Kurokawa T, Hanada K, et al. Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 1994; 135: 774-81.
- 19) Nakamura T, Hara Y, Tagawa M, et al. Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 942-9.
- 20) Radomsky ML, Thompson AY, Spiro RC, et al. Potential role of fibroblast growth factor in enhancement of fracture healing. *Clin Orthop* 1998; 355: S283-93.
- 21) Radomsky ML, Aufdemorte TB, Swain LD, et al. Novel formulation of fibroblast growth factor-2 in a hyaluron gel accelerates fracture healing in nonhuman primates. *J Orthop Res* 1999; 17: 607-14.
- 22) Kawaguchi H, Nakamura K, Tabata Y, et al. Acceleration of fracture healing in nonhuman primates by fibroblast growth factor-2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 875-80.
- 23) Hock JM, Gera I, Fonseca J, et al. Human parathyroid hormone (1-34) increases bone mass in ovariectomized and orchidectomized rats. *Endocrinology* 1988; 122: 2899-904.
- 24) Canalis E, Centrella M, Burch W, et al. Insulin-like growth factor mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J Clin Invest* 1989; 83: 60-5.
- 25) Liu CC, Kalu DN, Sallerno E, et al. Preexisting bone loss associated with ovariectomy in rats is reversed by parathyroid hormone. *J Bone Miner Res* 1991; 6: 1071-80.
- 26) Watson P, Lazowski D, Han V, et al. Parathyroid hormone restores bone mass and enhances osteoblast insulin-like growth factor I gene expression in ovariectomized rats. *Bone* 1995; 16: 357-65.
- 27) Whitefield JF, Morley P, Ross V, et al. Restoration of severely depleted femoral trabecular bone in ovariectomized rats by parathyroid hormone (1-34). *Calcif Tissue Int* 1995; 56: 227-31.
- 28) Iahizuya T, Yokose S, Hori M, et al. Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. *J Clin Invest* 1997; 99: 2691-70.
- 29) Andreassen TT, Ejersted C, Oxulund H. Intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 960-8.
- 30) Holzer G, Majeska RJ, Lundy MW, et al. Parathyroid hormone enhances fracture healing: A preliminary report. *Clin Orthop* 1999; 366: 258-63.
- 31) Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001; 344: 1437-41.
- 32) Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, et al. Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). *J Bone Miner Res* 2002; 17: 2038-47.
- 33) Miyakoshi N, Kasukawa Y, Linkhart TA, et al. Evidence that anabolic effects of PTH on bone require IGF-I in growing mice. *Endocrinology* 2001; 142: 4349-56.
- 34) Amizuka N, Warshawsky H, Henderson JE, et al. Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *J Cell Biol* 1994; 126: 1611-23.
- 35) Vortkamp A, Lee K, Lanske B, et al. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996; 273: 613-22.
- 36) Nakazawa T, Nakajima A, Shiomi K, et al. Effects of low-dose, intermittent treatment with recombinant human parathyroid hormone (1-34) on chondrogenesis in a model of experimental fracture healing. *Bone* 2005; 37: 711-9.
- 37) Cozen L. Does diabetes delay fracture healing? *Clin Orthop* 1972; 82: 134-40.
- 38) Loder RT. The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures. *Clin Orthop* 1988; 232: 210-6.
- 39) Stuart MJ, Morrey BF. Arthrodesis of the diabetic neuropathic ankle joint. *Clin Orthop* 1990; 253: 209-11.

- 40) Papa J, Myerson M, Girard P. Salvage, with arthrodesis, in intractable diabetic neuropathic arthroplasty on the foot and ankle. *J Bone Joint Surg Am* 1993; 75: 1056-66.
 - 41) Tisdell CL, Marcus RE, Heiple KG. Triple arthrodesis for diabetic peritalar neuroarthropathy. *Foot and Ankle Int* 1995; 16: 332-8.
 - 42) Spanheimer RG. Correlation between decreased collagen production in diabetic animals and in cells exposed to diabetic serum: response to insulin. *Matrix* 1992; 12: 101-7.
 - 43) Topping RE, Bolander ME, Balian G. Type X collagen in fracture callus and the effects of experimental diabetes. *Clin Orthop* 1994; 308: 220-8.
 - 44) Funk JR, Hale JE, Carmines D, et al. Biomechanical evaluation of early fracture healing in normal and diabetic rats. *J Orthop Res* 2000; 18: 126-32.
 - 45) Beam HA, Parsons JR, Lin SS. The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus. *J Orthop Res* 2002; 20: 1210-6.
 - 46) Follak N, Klotting I, Wolf E, et al. Delayed remodeling in the early period of fracture healing in spontaneously diabetic BB/OK rats depending on the diabetic metabolic state. *Histol Histopathol* 2004; 19: 473-86.
 - 47) Follak N, Klotting I, Merk H. Influence of diabetic metabolic state on fracture healing in spontaneously diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev* 2005; 21: 288-96.
 - 48) Ogasawara A, Nakajima A, Nakajima F, et al. Molecular basis for affected cartilage formation and bone union in fracture healing of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Bone* 2008; 43: 832-9.
 - 49) Shimoaka T, Kamekura S, Chikuda H, et al. Impairment of bone healing by insulin receptor substrate-1 deficiency. *J Biol Chem* 2004; 279: 15314-22.
 - 50) Hough A, Avioli LV, Bergfeld MA, et al. Correction of abnormal bone and mineral metabolism in chronic streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat by insulin therapy. *Endocrinology* 1981; 108: 2228-34.
 - 51) Macey LR, Kana SM, Jingushi S, et al. Defects of early fracture-healing in experimental diabetes. *J Bone Joint Surg Am* 1989; 71: 722-33.
 - 52) Kayal RA, Alblowi J, McKenzie E, et al. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment. *Bone* 2009; 44: 357-63.
 - 53) Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, et al. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology* 2003; 144: 346-52.
 - 54) Kayal RA, Tsatsas D, Bauer MA, et al. Diminished bone formation during diabetic fracture healing is related to the premature resorption of cartilage associated with increased osteoclast activity. *J Bone Miner Res* 2007; 22: 560-8.
 - 55) Alblowi J, Kayal RA, Siqueria M, et al. High levels of tumor necrosis factor-alpha contribute to accelerated loss of cartilage in diabetic fracture healing. *Am J Pathol* 2009; 175: 1574-85.
 - 56) Hoshino M, Egi T, Terai H, et al. Regenerative repair of long intercalated rib defects using porous cylinders of beta-tricalcium phosphate: an experimental study in a canine model. *Plast Reconstr Surg* 2007; 119: 1431-9.
 - 57) Hoshino M, Egi T, Terai H, et al. Repair of long intercalated rib defects in dogs using recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered by a synthetic polymer and beta-tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res* 2009; 90: 514-21.
 - 58) Vahle JL, Sato M, Long GG, et al. Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone (1-34) for 2 years and relevance to human safety. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 312-21.
 - 59) Vahle JL, Long GG, Sandusky G, et al. Bone neoplasms in F344 rats given teriparatide [rhPTH (1-34)] are dependent on duration of treatment and dose. *Toxicol Pathol* 2004; 32: 426-38.
 - 60) Vahle JL, Zuehlke U, Schmidt A, et al. Lack of bone neoplasms and persistence of bone efficacy in cynomolgus macaques after long-term treatment with teriparatide [rhPTH (1-34)]. *J Bone Miner Res* 2008; 23: 2033-9.
-