

氏 名 福永（藤川） ひとみ

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 記 番 号 博士第987号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項

学 位 授 与 年 月 日 令和6年3月21日

学 位 論 文 題 目 Expression of proinflammatory cytokines and proinsulin  
by bone marrow-derived cells for fracture healing in  
long-term diabetic mice  
（長期高血糖骨折モデルマウスの骨癒合過程における骨髄由  
来細胞の炎症性サイトカインとプロインスリンの発現）

審 査 委 員 主査 教授 西 英一郎  
副査 教授 平田 多佳子  
副査 教授 影山 進

## 論文内容要旨

※整理番号	995	(ふりがな) 氏名	ふくながひとみ ふじかわひとみ 福永ひとみ (藤川ひとみ)
博士論文題目	Expression of proinflammatory cytokines and proinsulin by bone marrow-derived cells for fracture healing in long-term diabetic mice (長期高血糖骨折モデルマウスの骨癒合過程における骨髄由来細胞の炎症性サイトカインとプロインスリンの発現)		
<p><b>【研究目的】</b> 糖尿病 (DM) の有病率は増加傾向であるが、DM及びDM性合併症の根本的治療法は確立していない。DM性骨障害は骨折や合併症が生じるリスクが高く、日常生活動作低下の要因となる。我々は先行研究でDMによる末梢神経や肝・腎障害の病態解析を行い、骨髄にproinsulin、TNF-<math>\alpha</math>産生細胞が出現し各臓器細胞と融合し細胞障害が生じる事を報告した。本研究ではDM性骨障害の病態解析を目的に、2か月以上の長期に高血糖を維持したマウスに骨折を作成し、仮骨部の骨芽細胞及び破骨細胞の組織学的変化とproinsulin及びTNF-<math>\alpha</math>の発現の局在を観察し、更にはproinsulin及びTNF-<math>\alpha</math>陽性 (proinsulin<sup>+</sup>、TNF-<math>\alpha</math><sup>+</sup>) 細胞の起源を調べるために、GFP陽性 (GFP<sup>+</sup>) 骨髄細胞移植を行い仮骨部の細胞分布を観察した。</p> <p><b>【対象と方法】</b> 8週齢のC57BL/6J雄マウスにStreptozocin (180 mg/kg) を腹腔内投与し随時血糖値<math>\geq</math>300 mg/dlを8週間維持させた長期高血糖マウス (long-term hyperglycaemia (LT-HG<sup>+</sup>); n=15) とbufferを投与した非高血糖マウス (LT-HG<sup>-</sup>; n=15) を作成し、大腿骨を骨折させた。またC57BL/6J雄マウスに放射線照射 (9 G<math>\times</math>5 min) 後にGFP<sup>+</sup>骨髄細胞 (4<math>\times</math>10<sup>6</sup> cell) を移植し、高血糖暴露させたマウス (GFP<sup>+</sup>/LT-HG<sup>+</sup>; n=5) と非高血糖マウス (GFP<sup>+</sup>/LT-HG<sup>-</sup>; n=5) を作成して大腿骨骨折させた。骨折処置は麻酔下に大腿骨を骨切りして髓内釘 (23G針) を挿入した。骨折処置後、2週、3週時点で仮骨の組織学的評価として、HE染色と免疫染色 (1次抗体; proinsulin、TNF-<math>\alpha</math>) を行った。</p> <p><b>【結果】</b> LT-HG<sup>-</sup>とLT-HG<sup>+</sup>はともに2週で仮骨を形成し、間葉系細胞の集簇、新生血管形成、軟骨化成領域と破骨細胞や骨芽細胞を含む骨梁を認めた。仮骨に占める軟骨化成領域の割合は、LT-HG<sup>-</sup>では2週 24%、3週 3%、LT-HG<sup>+</sup>では2週 27%、3週 8%と、3週にて仮骨吸収が遅延していた。骨芽細胞は、LT-HG<sup>+</sup>では仮骨部の細胞配列が不整で細胞間Gapが開大、集簇細胞数が少ない傾向があった。破骨細胞形態は平均核数がLT-HG<sup>-</sup>は4.2個、LT-HG<sup>+</sup>は2.9個とLT-HG<sup>+</sup>は細胞数の増加を認めず核数が減少していた。免疫染色は、proinsulinの発現がLT-HG<sup>-</sup>では陰性であり、LT-HG<sup>+</sup>では新生血管巣周囲の骨髄由来細胞 (bone marrow-derived cells; BMDCs) が骨折2週、3週で強陽性であった。TNF-<math>\alpha</math>の発現は、両群ともBMDCsでは強陽性、軟骨細胞で弱陽性であり、骨折2週と3週を比較するとLT-HG<sup>-</sup>は陽性細胞数が減少傾向であるのに対し、LT-HG<sup>+</sup>は増加傾向であった。GFP<sup>+</sup>細胞を移植したGFP<sup>+</sup>/HT-LG<sup>-</sup>とGFP<sup>+</sup>/LT-HG<sup>+</sup>の仮骨部には多くのGFP<sup>+</sup>細胞が観察できた。GFP<sup>+</sup>細胞とproinsulin<sup>+</sup>細胞の免疫局在を重ね合わせると、GFP<sup>+</sup>/proinsulin<sup>+</sup>細胞の割合はGFP<sup>+</sup>/LT-HG<sup>-</sup>で1.4%、GFP<sup>+</sup>/LT-HG<sup>+</sup>で15%と有意差を認めた。同様にGFP<sup>+</sup>/TNF-<math>\alpha</math><sup>+</sup>細胞はGFP<sup>+</sup>/HT-LG<sup>-</sup>で35%、GFP<sup>+</sup>/LT-HG<sup>+</sup>で47%であった。</p> <p><b>【考察】</b></p>			

高血糖条件下では、骨髄細胞の増殖能低下とアポトーシス・脂肪分化亢進による骨芽細胞の分化障害が生じ、骨芽細胞自体の成熟・石灰化障害も生じることで骨形成は低下すると指摘されている。本研究では、骨芽細胞の配列が不整で、細胞間ギャップが大きく、凝集細胞数が少ない傾向にあり、これまでの報告と同様に高血糖曝露が骨髄細胞障害を惹起し、骨芽細胞への分化・成熟障害により形態異常を誘導したと考えられる。これに対して、骨吸収の亢進/低下に関してはいまだ不明な点が多い。我々の先行研究では破骨細胞融合遺伝子の発現低下や吸収窩が小さいことを報告し、更に本研究では破骨細胞の細胞数が増加せず核数が減少したことから、長期高血糖曝露で骨髄細胞が障害され、破骨細胞の分化・機能障害により骨吸収も低下すると考えられた。高血糖曝露により全身性に誘導されたproinsulin<sup>+</sup>細胞は細胞融合してTNF- $\alpha$ を発現し各組織に細胞障害を生じる。またDMにより増強されたTNF- $\alpha$ は、骨折後の間葉系細胞の集簇低下や増殖障害、骨芽細胞分化障害を惹起するとも報告されている。骨折後の仮骨部にはGFP<sup>+</sup>細胞が集簇しており、骨折治癒過程に骨髄由来細胞の誘導が重要と考えられる。更に長期高血糖群の仮骨にはproinsulin<sup>+</sup>、TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>細胞が多く含まれており、骨組織でも同様の病態で組織障害が生じ、骨折治癒過程が遅延する要因と考えられた。

**【結論】**

長期高血糖曝露下で骨髄由来のproinsulin<sup>+</sup>及びTNF- $\alpha$ <sup>+</sup>細胞が全身性に誘導され、骨折後の骨形成・骨吸収機能がともに障害されて骨機能の低下を来すことが示唆された。

- 備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

## 博士論文審査の結果の要旨

整理番号	995	氏名	福永ひとみ (藤川ひとみ)
論文審査委員	主査	西 英一郎	
	副査	平田 多佳子	
	副査	影山 進	
<p>(博士論文審査の結果の要旨)</p> <p>本論文では、糖尿病性骨障害の病態解析を目的とし、長期高血糖維持マウスにおける仮骨部の組織学的変化および proinsulin、TNF-<math>\alpha</math> 陽性細胞について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 高血糖を8週間維持させたマウス (LT-HG<sup>+</sup>)、および対照非高血糖マウス (LT-HG<sup>-</sup>) に骨折処置を行い、2、3 週後に仮骨部組織を検討したところ、LT-HG<sup>+</sup>にて仮骨に占める軟骨化成領域の割合は低下していた。</li> <li>2) LT-HG<sup>+</sup>の仮骨部における骨芽細胞は、細胞配列が不整で細胞間ギャップが開大し、集簇細胞数が少ない傾向を認めた。</li> <li>3) LT-HG<sup>+</sup>の仮骨部における破骨細胞は、核数が少ない傾向を認めた。</li> <li>4) 仮骨部の免疫組織染色にて、proinsulin の発現は、LT-HG<sup>-</sup>では認めなかったが、LT-HG<sup>+</sup>では強陽性であった。</li> <li>5) 仮骨部の免疫組織染色にて、TNF-<math>\alpha</math> の発現は、LT-HG<sup>-</sup>、LT-HG<sup>+</sup>ともに陽性であった。</li> <li>6) 仮骨部の免疫組織染色にて、骨髄由来 proinsulin 陽性細胞の割合は、LT-HG<sup>+</sup>で LT-HG<sup>-</sup>と比較して有意に上昇していたが、TNF-<math>\alpha</math> 陽性細胞の割合に有意差はなかった。</li> </ol> <p>本論文は、糖尿病性骨障害の発症機構について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 590字)</p> <p style="text-align: right;">(令和6年 2月 20日)</p>			