

氏 名	笠原俊幸
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博士第637号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成23年 3月10日
学位論文題目	Malfunction of Bone Marrow Derived Osteoclasts and the Delay of Bone Fracture Healing in Diabetic Mice. (糖尿病マウスにおける骨髄由来破骨細胞の機能障害と骨折治癒遅延)
審査委員	主査 教授 前川 聡 副査 教授 竹内 義博 副査 教授 岡田 裕作

論文内容要旨

※整理番号	642	氏名	笠原 俊幸
学位論文題目	Malfunction of Bone Marrow Derived Osteoclasts and the Delay of Bone Fracture Healing in Diabetic Mice. (糖尿病マウスにおける骨髄由来破骨細胞の機能障害と骨折治癒遅延)		
<p>【研究の目的】糖尿病の合併症として、骨折の癒合遅延・偽関節が増加し重大な問題となっている。また近年、急性の臓器傷害時に未分化な骨髄由来細胞が出現し、治癒過程に重要な役割を持つことが報告されている。糖尿病における骨折時にどのような細胞が出現するのか、それらの働きがどのように変化しているのかは重要な検討課題である。そこで今回我々は、streptozotocin (STZ) による糖尿病マウスで骨折モデルを作成し治癒過程を観察することにより骨折治癒障害の原因を検討した。</p> <p>【方法】C57BL/6 マウスに放射線照射を行ない GFP マウスの骨髄細胞を移植した。移植後4週で、半数のマウスにはSTZを投与し糖尿病モデル群を作成。残りの半数には溶媒のみを投与しコントロール群を作成した。投与後2週間でマウスの大腿骨骨折を作成し、術後1, 2, 3, 5週で単純X線写真を撮影し仮骨の大きさを測定した。組織標本作製し、トルイジンブルー染色を行い、骨折部における軟骨量の変化を評価した。骨形態計測による骨形成能と骨吸収能の評価及び各細胞の数や形態学的な評価をおこなった。抗osteocalcin抗体、抗RANK抗体による蛍光免疫染色を行い、GFPと共に観察し、骨髄移行細胞が骨折治癒にどのように関与しているかを評価した。マウス頭蓋骨より作成した皮質骨プレート上で、両群の骨髄から取り出した破骨細胞を培養し、走査型電子顕微鏡を用いて骨吸収窩の面積を測定した。新鮮凍結切片を作成し、レーザーキャプチャーを用いて骨折部に存在するGFP陽性の破骨/骨芽細胞を採取し、mRNAを抽出し、定量的PCRにて遺伝子の発現量を評価した。</p> <p>【結果】X線写真にて術後2週目より骨折部周囲に仮骨形成がみられたが、STZ群では有意に仮骨面積が小さかった。5週目には両群とも同程度まで減少した。仮骨中に軟骨の占める面積を計測したところ、術後2週では両群に有意な差を認めなかったが、術後3週ではSTZ群において有意に軟骨の割合が多く、新生骨の割合が少なかった。</p>			

- (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。

た。骨形態計測では STZ 群での吸収パラメーターが有意に低下していたが、形成パラメーターや石灰化面積に差を認めなかった。破骨細胞のサイズは術後 2 週、3 週とも STZ 群で小さかった。免疫染色を使った検討では抗 RANK 抗体陽性である破骨細胞のうち、GFP が陽性であり移植骨髄由来であることを示すものが 80% 程度見られたが、抗 Osteocalcin 陽性である骨芽細胞のうち、GFP が陽性のものは 20% 程度にとどまっている。これは放射線照射に耐えた局所の幹細胞（骨膜上にある休止期の骨芽細胞など）が骨折という外的な因子に反応し増殖したためと考えられる。骨吸収窩の面積を測定したところ STZ 群で有意に小さかった。新鮮凍結切片より採取した遺伝子の定量的 PCR を用いた検討では、破骨細胞の成熟度や骨芽細胞機能の遺伝子発現に差を認めなかったが、破骨細胞の融合に必須の遺伝子である DC-STAMP の発現量は STZ 群で有意に低下していた

【考察】骨折の治癒において軟骨の果たす役割は重要である。骨折部において軟骨細胞は急速に増加し、軟骨仮骨を形成することにより早期の安定性を確保する。その後軟骨は吸収され骨性仮骨となり強固な固定を得る。さらにリモデリングにより通常の骨へと置換され骨癒合を得る。今回の実験で、X 線写真上 STZ 群での仮骨形成の遅延を認めたが、組織標本を観察すると軟骨量が最大となる術後 2 週目での軟骨面積は両群で違いがなかった。しかし 3 週目になると STZ 群での軟骨組織の残存が有意に多かった。また骨形態計測では STZ 群での有意な吸収系パラメーターの低下があったが、骨形成系のパラメーターには差がなかった。このことより STZ 群では軟骨の吸収が阻害された結果、骨癒合が遅延したものと考えられる。過去の報告では糖尿病モデルにおいて骨芽細胞機能が低下したとの報告が散見される。この研究では骨芽細胞機能の低下は見られなかったが、STZ 投与後 2 週間で骨折を作成しており、糖尿病の罹病期間と骨芽細胞機能の関連については今後の調査が必要であると思われる。破骨細胞は融合・多核化することで生存性の向上と機能強化を得る。今回の実験では骨形態計測・骨吸収窩測定の結果より STZ 群において破骨細胞の小型化と機能障害が生じており、破骨細胞の融合異常が原因であると考えられる。PCR の結果でも破骨細胞の融合に必須のタンパクである DC-STAMP が減少しており、この推論を裏付けるものである。

【結論】STZ モデルマウスを使用し、糖尿病における破骨細胞機能異常のメカニズムについて考察した。STZ 群では破骨細胞は小さく、吸収能力の低下があり、破骨細胞の融合障害と機能低下を示すものである。STZ 群で DC-STAMP の遺伝子発現量が低下しており、融合障害に影響している可能性がある。骨折治癒に関する破骨細胞は骨髄由来の物が多数を占め、その前駆細胞へのさらなる調査が糖尿病による破骨細胞の機能障害の原因解明につながるかもしれない。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	642	氏名	笠原 俊幸
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>近年、糖尿病は世界中で増加しており、その合併症としての骨粗鬆症、骨折リスクの上昇、骨折治癒障害は患者のQOLを著しく低下させ問題となっている。糖尿病において破骨細胞機能がどのような影響をうけるか、また、糖尿病合併症において骨髄の幹細胞レベルでの異常が影響すると考えられているが、骨折治癒に関してどのような影響を来たすかについては検討されていない。本研究は、GFPマウスより骨髄移植を行ったSTZ糖尿病マウスを用いて骨折治癒が障害されるか否か、また障害されるならどの過程が障害されているか検討し、以下の点を明らかにした。</p> <p>糖尿病マウスにおいて、</p> <ul style="list-style-type: none"> X線を用いた評価で骨折治癒は遅延すること。 内軟骨骨化において軟骨組織の吸収が遅延すること。 骨形態計測において骨吸収機能が低下したが、骨形成機能や石灰化は障害されないこと。 破骨細胞はサイズが小さく骨吸収機能が障害されていたこと。 破骨細胞は80%近くが骨髄移行細胞であったが、骨芽細胞は20%程度であったこと。 糖尿病マウス骨髄より移行した破骨細胞は、融合に必要なDC-STAMP発現が低下したこと。 <p>本論文は、上記のように糖尿病に合併する骨折治癒障害に新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け、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 554 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 23 年 1 月 31 日)</p>			