

氏名	松本 憲一
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5314号
学位授与の日付	平成28年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Expression and role of sonic hedgehog in the process of fracture healing with aging (加齢に伴う骨折治癒過程におけるソニックヘッジホッグの役割)
論文審査委員	久保田 聡 教授 飯田 征二 教授 佐々木 朗 教授

学位論文内容の要旨

[緒言]

高齢者の骨折はその後の QOL に大きく関与し、その早期回復が求められる。近年、骨折治癒過程において産生されるソニックヘッジホッグ (SHH) は、骨のリモデリングに関与する可能性が報告されている。しかし、高齢者の骨折治癒における SHH の役割については明らかとなっていないのが現状である。そこで、本研究では、加齢に伴う骨折治癒過程における SHH の発現ならびにその役割に関して検討した。

[方法]

動物実験

ICR マウス雄 8 週齢を若年マウス、60 週齢を高年齢マウスとし、第 8 肋骨骨折モデルを作製した。麻酔はネブタールを 10 倍希釈し、マウス腹腔内に 250 μ l 注射した。マウス右側腹部を剃毛し、約 3mm の切開を加え被膜下の肋骨を明示後、鉗にて第 8 肋骨を骨折させた。創部は 4-0 ナイロン糸にて縫合を行った。骨折後 3, 5, 14, 28 日目にマウスを屠殺した。肋骨を摘出し脱灰後、通法に従ってパラフィン包埋し、厚さ 4 μ m の連続切片を作成した。切片はヘマトキシリン・エオジン染色、TRAP/ALP 染色、および免疫組織化学的染色を行い、組織学的検討を行った。

アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色、アリザリン(ALZ) 染色、TRAP 染色

骨芽細胞の単離は若年、ならびに高年齢マウスの大腿骨より単離した。骨芽細胞 24 穴細胞培養用プレート上に播種し 50 μ g/ml ascorbic acid および 10 mM β -glycerophosphate (β -GP) を添加後、アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色は 14 日、アリザリンレッド (ALZ) 染色は 21 日後に染色を行った。破骨細胞は若年、ならびに高年齢マウス大腿骨より単離した骨髄細胞を M-CSF (30 ng/ml), RANKL (30 ng/ml) を加え 48 穴細胞培養用プレート上に 1×10^5 個/well で播種した。2 日おきに培地交換を行い、約 10 日後に酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色にて検討した。

Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

若年、高年齢マウスの骨芽細胞、骨髄細胞より Total RNA を抽出した。Total RNA の抽出には RNeasy Minikit を用いた。遺伝子発現は RT-PCR 法を用いて検討した。

[結果]

SHH は若年マウス骨折後 3 日目の骨折端周囲の骨髄細胞に発現を認めたが、高齢マウスでは SHH 発現は低く、ALP ならびに TRAP 陽性細胞は有意に低下した。一方、骨折後 14 日目では仮骨周囲の骨芽細胞に発現する SHH は若年および高齢マウスで認められ、ALP 陽性骨芽細胞は若年マウスで、TRAP 陽性破骨細胞は高齢マウスで有意な増加を認めた。若年マウスから単離した骨芽細胞は高齢マウス骨芽細胞と比較し、ALP 染色、ALZ 染色は亢進し、SHH 添加で osteocalcin, ALP mRNA の上昇を認めた。一方で破骨細胞を RANKL 存在下で培養すると、高齢マウスでは若年マウスと比較し、SHH による TRAP 陽性細胞ならびに、TRAP, NFATc1 mRNA の発現上昇を認めた。SHH を若年マウス骨芽細胞に添加すると PTH によって抑制された OPG mRNA は上昇し、一方 SHH を高齢マウスに添加すると OPG mRNA 発現は変化を認めなかった。

[考察]

これまでの我々の報告では、骨折治癒過程において SHH が及ぼす影響は確認されたが、高齢マウスの骨折治癒遅延における SHH の影響の大きさに関してはまだ報告されていない。本研究では、高齢マウスの骨折初期における前骨芽細胞の分化、増殖能の低下による骨芽細胞数の低下が骨折治癒遅延に関連している可能性を報告した。ヘッジホッグシグナルは *in vivo* において未分化間葉系細胞や骨芽細胞を刺激し、骨芽細胞の Runx2 を上昇させることで、骨芽細胞分化を促進させることが報告されているが、我々の報告では若年マウス由来骨芽細胞に対して、SHH は ALP, osteocalcin, Runx2 の発現も上昇させることによって骨芽細胞分化を促進することが明らかとなった。しかし、高齢マウス由来骨芽細胞では骨芽細胞分化初期の遺伝子に SHH の影響は認められなかった。また、若年マウスの SHH と PTH 同時添加における OPG mRNA の発現のレスキューは、SHH が PTH 刺激による骨芽細胞を介した破骨細胞形成を抑制することが示唆された。PTH による高齢マウスにおける骨芽細胞を介した破骨細胞形成の上昇は、SHH が OPG mRNA の発現を上昇させないことによるものである可能性が示唆された。これらのことより、骨折治癒過程において、加齢が SHH の反応性に影響を与え、PTH は骨芽細胞における OPG の発現を抑制することにより治癒の遅延が生じることが示唆された。また、骨芽細胞を介した破骨細胞形成に加え、SHH は直接的に高齢マウスにおける破骨細胞形成、ならびに骨吸収を刺激する可能性が示唆された。加齢による骨折治癒遅延は骨形成と骨吸収の不均衡によるものであり、それは SHH シグナルが一因と考えられた。

[結論]

骨折初期においては、SHH の発現の上昇、ならびに骨芽細胞の増加が若年マウスの骨形成を上昇させているのに対し、高齢マウスでは SHH の低下、骨芽細胞数の低下が骨形成を低下させることが示唆された。仮骨形成期においては、若年マウスでは SHH が骨芽細胞に作用し骨形成を上昇させ、また OPG の発現により破骨細胞形成を減少させる一方、高齢マウスでは SHH は破骨細胞により有意に作用し、骨吸収を増大させる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

高齢者の骨折はその後の Quality of Life (QOL)に大きく関与するため、その早期回復が求められる。近年、骨折治癒過程において骨髄細胞より産生される Sonic Hedgehog (SHH)が、骨のリモデリングに関与する可能性について報告されているが、高齢者の骨折治癒過程における SHH の役割については明らかになっていないのが現状である。そこで本研究では、骨折治癒過程における SHH の発現、並びに役割に対する加齢の影響について検討した。ICR マウス雄 5 週齢を若年マウス、60 週齢を高齢マウスとし、第 8 肋骨骨折モデルを作製して組織学的検討を行った。骨折初期では、若年マウスと比較し高齢マウスでは SHH の発現は低く、骨芽細胞数は有意に低下した。仮骨形成期では、骨芽細胞数は若年マウスで、破骨細胞数は高齢マウスで有意に多かった。また、若年マウスと高齢マウスより骨芽細胞、破骨細胞を単離し *in vitro* における検討を行った。若年マウス由来骨芽細胞は高齢マウス由来骨芽細胞と比較し、骨芽細胞形成能、石灰化能は亢進し、SHH 添加で骨芽細胞分化マーカーの上昇を認めた。一方、高齢マウス由来破骨細胞では若年マウス由来破骨細胞と比較し破骨細胞形成能、骨吸収能は高かった。SHH を若年マウス由来骨芽細胞に添加すると Parathyroid hormone (PTH)によって抑制された Osteoprotegerin (OPG) mRNA の発現は上昇するが、SHH を高齢マウス由来骨芽細胞に添加すると OPG mRNA の発現は変化しなかった。本研究では、高齢マウスの骨折初期における SHH の発現と骨芽細胞数の低下が、骨折治癒遅延に関連している可能性を見出した。SHH は骨芽細胞の Runt-related transcription factor 2 (Runx2)を上昇させることが報告されているが、本研究では若年マウス由来骨芽細胞に対して、SHH は Alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin の発現を高齢マウス由来骨芽細胞と比べて上昇させることによって骨芽細胞分化を促進することが明らかとなった。また若年マウスにおける、SHH の PTH 同時添加による OPG の発現維持は、SHH が PTH 刺激による骨芽細胞を介した破骨細胞形成を抑制することを示唆する一方で、高齢マウスの SHH と PTH 同時添加における破骨細胞形成の上昇は、SHH が OPG の発現を上昇させないことによるものである可能性が示唆された。これらのことより、加齢による骨折治癒遅延は骨形成と骨吸収の不均衡によるものであり、それは SHH が一因と考えられた。

本学位論文の内容は、これまで明らかでなかった高齢者の骨折治癒における SHH の役割を明らかとした新知見を含んでいる。また、今後の新規骨折治療開発についての発展性も期待できる。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。