

学位論文題名

マクロファージ遊走阻止因子遺伝子の欠損が
骨折治癒に与える影響

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 骨折治癒のメカニズムに関してはこれまで様々な角度から多くの研究が行われ、ホルモンや力学的環境に加えて種々のサイトカインが関与することが明らかとなってきた。マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor: MIF) は活性化 T リンパ球より分泌されるリンフォカインとして報告された。当初、その機能はマクロファージの遊走を制御して炎症部位にマクロファージを集積し、炎症・免疫反応を惹起する液性因子と考えられたが、その後の研究で MIF は細胞分化や創傷治癒に関与するなど多様な機能を有するサイトカインであることが明らかになってきた。しかし、骨折治癒過程における MIF の役割について詳細に検討した報告はこれまで見られない。近年、共同研究者の Onodera ら (2004) は骨折治癒過程の早期における MIF mRNA の発現増加を報告し、MIF が骨折治癒過程において重要な因子である可能性を示唆した。そこで MIF knock-out マウスを用いて行われた本研究の目的は、マクロファージ遊走阻止因子遺伝子の欠損が骨折治癒に与える影響を明らかにすることであり、それを通して骨折治癒に対する MIF の役割を解明することである。

【対象と方法】 実験には 10 週齢の雄 wild-type マウス 73 匹 (WT 群) と MIF knock-out マウス 73 匹 (MIF KO 群) を使用した。全ての実験は、北海道大学大学院医学研究科動物実験委員会の承認の下に、同研究科動物実験規約に則って行った。全身麻酔下に右下腿前面の皮膚を切開し、脛骨骨幹部中央を露出し、電動鋸を使用して骨幹部中央に横骨折を作製した。次いで脛骨髄腔内にステンレス鋼線を刺入し、髄内釘固定を行った。左脛骨には骨折を作製せずに同様の髄内釘を刺入した。脛骨骨折部の力学的強度の評価には各群 16 匹を使用し、骨折後 42 および 84 日において万能試験機を用いて、脛骨前面を下方にした 3 点曲げ試験を実施した。固定点間距離は 10 mm とし、cross head speed 5 mm/min で脛骨を破断させた。得られた load-elongation curve から仮骨の曲げ stiffness および最大荷重を求め、指標値にはそれらの絶対値および左脛骨に対する右脛骨の割合 (対健側比) を用いた。仮骨面積の測定のためには各群 9 匹を使用し、骨折後 7, 14, 21 および 28 日における骨折部の軟 X 線撮影を実施した。Scion imaging 解析ソフトを使用し、得られた X 線画像から仮骨面積を測定した。組織学的観察には各群 15 匹を使用し、骨折後 3, 7, 21, 42 および 84 日においてヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を行なった。また、各群 12 匹を使用し、骨折後 14 および 28 日に Villanueva bone 染色を実施した。得られた染色像から骨形態計測の各パラメーターについて算出した。骨折部における骨折治癒に関連する諸因子 mRNA の発現量について測定するために、各群 18 匹を使用し、骨折後 0, 3, 7, 14,

21 および 28 日にリアルタイム PCR による解析を行なった。各 mRNA 発現量は GAPDH にて正規化し、その発現量を算出した。骨髄細胞培養のために、各群 3 匹を使用し、培養後 14, 21 および 28 日に von Kossa 染色を実施して、骨髄細胞の石灰化について検討した。統計学的比較には対応のない Student's t-test および一元配置分散分析を行い、post hoc test として Fisher's PSLD test を使用した。有意水準は 5% とした。

【結果】 仮骨面積に関して、MIF KO 群は WT 群より骨折後 14 日において有意に低値を示した。仮骨の構造特性（曲げ stiffness および最大荷重）に関して、MIF KO 群は骨折後 42 日において WT 群より有意に低値を示したが、骨折後 84 日においては両群間に差を認めなかった。組織学的観察において、HE 染色では両群ともに経時的に骨梁構造の復元が観察されたが、両群間に明瞭な差は観察されなかった。しかし Villanueva bone 染色においては、MIF KO 群は類骨幅が広く、線維状骨から層板骨への置換の遅れが観察された。また、骨形態計測において、MIF KO 群では骨量に対する類骨量、類骨面に対する類骨量、類骨幅、および既存骨量に対する新生骨量が有意に増加し、骨石灰化速度の低下および類骨成熟時間の延長が認められた。さらに MIF KO 群では骨面に対する吸収面、骨面に対する破骨細胞面、および骨面に対する破骨細胞数が低値を示した。骨折治癒関連因子の遺伝子発現量に関して、MIF KO 群は MMP-2 が骨折後 21 および 28 日で、MT1-MMP, CtsK および TNAP が骨折後 21 日で WT 群より有意に低値を示した。骨髄細胞の石灰化の程度には 2 群間で差を認めなかった。

【考察】 本研究の力学的試験では、MIF KO 群の仮骨の構造特性は骨折後 42 日で有意に低く、MIF KO 群では骨折治癒が遅れることが示された。しかし骨折後 84 日では両群間に差を認めなかった。この結果は、MIF が骨折治癒過程早期における仮骨の構造特性の向上に寄与し、最終的に到達する骨の構造特性には影響を及ぼさない可能性を示唆した。MIF KO における骨折治癒遅延のメカニズムとして、2 つの可能性が推察された。その第 1 は、骨折後 14 日において MIF KO 群で破骨細胞数が有意に減少したことから、MIF KO 群では骨折部において形成された線維状骨の骨吸収遅延が起こっている可能性である。その第 2 は、MIF KO 群で骨量に対する類骨量が有意に高値を示したこと、骨石灰化速度が有意に低値を示したこと、および軟 X 線画像による仮骨面積が有意に減少したことから、MIF KO 群では類骨の骨組織への置換が阻害されている可能性である。遺伝子発現に関しても、MIF KO 群において MMP-2, MT1-MMP, CtsK および TNAP mRNA が有意に低値を示した。これら因子は骨石灰化に深く関与することが報告されており、これら因子の発現減少が MIF KO マウスにおける類骨の石灰化を遅延させて、類骨の骨組織への置換の阻害に関与した可能性がある。しかし in vitro における骨髄細胞の石灰化には 2 群間で差を認めなかった。したがって、これらの遺伝子発現の意義については今後の検討が必要である。

【結論】 本研究は、脛骨の骨折治癒における MIF 遺伝子欠損の影響について調査し、骨折治癒過程早期において、骨折治癒が遅れることを示した。この骨折治癒の遅れは仮骨組織内の類骨石灰化の遅れによる影響が大きいことが推察された。本研究結果は、骨折治癒のメカニズムに関して新たな知見を提示した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	久下	裕司
副査	教授	三輪	聡一
副査	教授	鏡	邦芳
副査	教授	安田	和則

学位論文題名

マクロファージ遊走阻止因子遺伝子の欠損が 骨折治癒に与える影響

骨折治癒のメカニズムは、いまだ不明な点が多い。マクロファージ遊走阻止因子（以下、MIF）はマクロファージの遊走を制御して炎症部位にマクロファージを集積し、炎症・免疫反応を惹起する液性因子と考えられていたが、その後の研究でMIFは細胞分化や創傷治癒に関与するなど多様な機能を有するサイトカインであることが明らかになってきた。しかし、骨折治癒過程におけるMIFの役割について詳細に検討した報告はこれまで見られない。そこで申請者はMIF遺伝子の欠損が骨折治癒に与える影響を明らかにすることを目的として本研究を行った。

実験には10週齢の雄wild-typeマウス73匹(WT群)とMIF knock-outマウス73匹(MIF KO群)を使用した。各動物において、一側の脛骨骨幹部中央に横骨折を作製した後に髓内釘固定を行い、他側の脛骨には骨折を作製せずに髓内釘固定を行ってコントロールとした。力学的評価には各群16匹を使用し、骨折後42および84日に3点曲げ試験を実施し、仮骨の曲げstiffnessおよび最大荷重を算出した。仮骨面積の測定のためには各群9匹を使用して、骨折後7、14、21および28日における骨折部の軟X線撮影を実施し、得られたX線画像から仮骨面積を測定した。組織学的観察には各群15匹を使用し、骨折後3、7、21、42および84日においてHE染色を行なった。また、各群12匹を使用し、骨折後14および28日にVillanueva bone染色を実施した。得られた染色像から骨形態計測の各パラメータについて算出した。骨折治癒に関連する諸因子のmRNAの発現量について測定するために、各群18匹を使用し、骨折後0、3、7、14、21および28日にリアルタイムRT-PCRによる解析を行なった。骨髓細胞培養のために、各群3匹を使用し、培養後14、21および28日にvon Kossa染色を実施して骨髓細胞の石灰化能について検討した。統計学的比較にはStudent's t-test および一元配置分散分析を行い、有意水準は5%とした。

結果： 仮骨の曲げstiffness および最大荷重に関して、MIF KO群は骨折後42日においてWT群より有意に低値を示したが、骨折後84日においては両群間に差を認めなかった。仮骨面積に関して、MIF KO群はWT群より骨折後14日において有意に低値を示した。組

織学的観察において、HE 染色では両群間に明瞭な差は観察されなかったが、Villanueva bone 染色に関しては MIF KO 群で類骨幅が広く、線維状骨から層板骨への置換の遅れが観察された。また、骨形態計測において、MIF KO 群では類骨量、類骨幅、および新生骨量が有意に増加し、骨石灰化速度の低下および類骨成熟時間の延長が認められた。さらに、吸収面および破骨細胞数が有意に低値を示した。骨折治癒関連因子の遺伝子発現量に関しては、MIF KO 群で MMP-2 が骨折後 21 および 28 日で、MT1-MMP、CtsK および TNAP が骨折後 21 日で WT 群より有意に低値を示した。しかし骨髄細胞の石灰化の程度には 2 群間で差を認めなかった。

これらの結果は、MIF 遺伝子の欠損が骨折治癒過程の早期における治癒の遅延をもたらすことを示した。この骨折治癒の遅延は、骨折部において形成された線維状骨の骨吸収遅延や仮骨組織内の類骨石灰化の遅延が原因であることが示唆された。本研究結果は、骨折治癒のメカニズムに関して新たな知見を提示した。

口頭発表の後、副査の三輪教授から MMPs、CtsK および TNAP の産生細胞、遺伝子発現減少と破骨細胞数減少の関連性、仮骨の構造特性が 42 日で差があり 84 日で差が無い理由、等について質問があった。鑑教授からは、重要な複数の遺伝子発現が骨折後 21 日で低下してすぐ増加する理由、骨折治癒における MIF の役割を今後さらに解明するための方法、等について質問があった。次に主査の久下教授から遺伝子発現で差を認める時期と骨形態計測で差を認める時期の差異、タンパク発現レベルの評価、細胞培養研究における工夫、等について質問があった。最後に副査の安田教授より、骨における MIF の研究の国際的動向、MIF を臨床的治療に応用できる可能性、等について質問があった。いずれの質問に対しても申請者は、自己の研究結果と文献的考察に基づいて概ね妥当な回答を行った。

本研究は MIF の骨折治癒に対する影響について検討した初めての研究であり、MIF は骨折治癒早期において重要な役割を担っている可能性を示し、骨折治癒のメカニズムに関しあられたな知見を提示した。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。