

論文の内容の要旨

論文題目 ヘッジホッグ作動薬による骨折治癒促進効果の検討

氏名 柏木 美樹

骨組織は、身体の支持組織として非常に重要な臓器のひとつである。骨折は、我々の生活の質（quality of life, QOL）を低下させ、社会の経済的損失にも大きく関わり、その予防と早期回復が強く求められる。

骨折治癒の過程は、多数の細胞種やシグナル因子が関わり、胎生期の骨発生と類似する点が多い。このため、骨発生の知見を参考にして骨折治癒のメカニズムを検証していくことが有用な方法のひとつと考えられる。骨折治癒の過程は、炎症期、仮骨形成期、リモデリング期の3期からなり、仮骨形成過程では、胎生期の骨発生と同様に、膜性骨化と軟骨内骨化の2つの骨化様式がみられる。本研究で着目したヘッジホッグ（Hedgehog, Hh）は、骨発生において、軟骨内骨化のマスターレギュレーターとしてはたらき、骨折治癒の仮骨形成過程においても、同様のはたらきがあると考えられる。

Hhには、ソニックヘッジホッグ（Shh）、デザートヘッジホッグ（Dhh）、インディアンヘッジホッグ（Ihh）の3つのホモログが存在するが、これらのうち、Ihhは、骨発生における軟骨内骨化の過程で、前肥大軟骨細胞および肥大軟骨細胞に特異的に強い発現がみられ、間葉系前駆細胞から骨芽細胞への分化決定にはたらく。Ihhが細胞膜上の受容体Patchedに結合することで、Smoothened（Smo）の抑制が解除されてシグナルが伝達され、転写因子であるGliを介して標的遺伝子の転写が調節される。骨芽細胞は、間葉系前駆細胞からRunx2陽性骨芽細胞前駆細胞、Runx2陽性Osterix/Sp7陽性骨芽細胞前駆細胞、成熟骨芽細胞の順に分化が進行していく。この分化の過程の中で、Ihhは骨芽細胞分化の初期、すなわちRunx2陽性骨芽細胞前駆細胞への分化誘導にはたらくと考えられている。また、これまでの成人モデルにおける骨の恒常性や骨治癒についての先行研究から、ヘッジホッグ作動薬であるSmoothened agonist（SAG）が骨治癒を促進する可能性が報告されている。

以上の背景を踏まえて、骨折治癒過程早期のHhシグナルの活性化が治癒を促進するの

ではないかという仮説を立てた。本研究では、マウス骨折モデルを用いて、骨折治癒過程早期に SAG の単回局所投与を行い、その治癒促進効果について検証した。さらに、骨折治癒過程における Hh シグナルの作動メカニズムについての洞察を得た。

8 週齢オス C57BL/6J を用いて、Vehicle 投与群 (n=7)、SAG 投与群 (n=7) に分け、左側脛骨に骨折を作製した。術後 1 日目に骨折部周囲に Vehicle (精製水) または 100 μ M SAG をそれぞれ 10 μ l 投与し、術後 14 日目に左側脛骨を採取した。

3 次元マイクロ CT を用いて仮骨の放射線学的解析を行った結果、SAG 投与群では、仮骨サイズが増加し、仮骨の直径および体積の有意な増加が認められた。また、骨密度の高い領域と骨密度の低い領域に分けて骨量・骨塩量・骨密度を計測した結果、両領域ともに、計測したすべての評価項目で有意な増加が認められた。

仮骨は、軟性仮骨と硬性仮骨より構成される。そこで、軟性仮骨と硬性仮骨それぞれについて組織学的解析を行った。軟性仮骨の形態学的解析では、Hematoxylin Eosin/ Alcian blue 染色を行い、Vehicle 群と比較して、SAG 投与群で軟骨組織の増大が認められた。しかし、軟骨組織を形成する細胞構成については、両群間で明らかな差が認められず、細胞密度についても有意な差は認められなかった。次に、軟性仮骨のサイズ増大に関して、細胞増殖に着目し、細胞増殖マーカーである PCNA を用いて免疫染色を行った。PCNA 陽性細胞数を計測したところ、SAG 投与群において、有意な増加が認められた。また、軟性仮骨を構成する軟骨細胞の割合についても、軟骨細胞マーカーである SOX9 を用いて免疫染色を行い、SAG 投与群で SOX9 陽性細胞の有意な増加を認めた。以上より、軟性仮骨では、SAG の局所投与により軟骨細胞数が増加し、細胞密度を保ったまま、仮骨のサイズが増大する可能性が示唆された。

一方、硬性仮骨でも、骨芽細胞分化マーカーである SP7 を用いて免疫染色を行った結果、SAG 投与群で骨芽細胞の割合が有意に増加した。さらに、Masson's trichrome 染色による組織学的解析においても、SAG 投与群で新生骨量の増大が認められた。硬性仮骨では、SAG の局所投与により、骨芽細胞への分化が促進され、その結果、仮骨内の新生骨が増加する可能性が示唆された。

以上より、骨折治癒過程早期の SAG 単回局所投与により、仮骨形成期における軟性仮骨および硬性仮骨の増大が生じることが示された。軟性仮骨の増大は、軟骨細胞の増殖により引き起こされる。一方、硬性仮骨の増大は、SAG が直接骨芽細胞前駆細胞に作用して骨芽細胞分化が誘導される、もしくは増殖した軟骨細胞を骨芽細胞に分化転換誘導した結果、骨芽細胞が増殖する、あるいはその両方により引き起こされると考えられる。さらに、Ihh は骨形成初期において重要な役割を果たすことが先行研究により報告されており、本研究においても、骨折治癒過程早期の SAG 単回投与のみで有意な促進効果を引き出すことができた。

本研究で用いた低分子化合物による骨折治癒促進は、簡便かつ低侵襲であり、難治性骨折などの骨折治癒に対する有効な治療法となる可能性があると考えられる。