



Title	Immunolocalization of osteocyte-derived molecules during bone fracture healing of mouse ribs [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	柳, 铸晟
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第11264号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/56242">http://hdl.handle.net/2115/56242</a>
Rights(URL)	<a href="http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Zhusheng_Liu_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

# 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(歯学) 氏名 柳 鏗晟

主査 教授 網塚憲生  
審査担当者 副査 教授 進藤正信  
副査 教授 土門卓文

## 学位論文題名

Histochemical localization of Osteocyte-derived factors during rib fracture healing in mice  
(マウス肋骨骨折の治癒過程における骨細胞産生因子の組織学的検索)

骨折は、骨に外力が加わり、骨の構造的な連続性が破断された状態であることから、周囲の筋肉、血管、骨膜および結合組織の破壊は無論のこと、皮質骨に埋め込まれた骨細胞・骨細管系の細胞性ネットワークも破断され、機能障害が生じることが考えられる。一方、皮質骨において、骨細胞は規則的に配列した細胞性ネットワークを形成しており、骨細胞同士あるいは骨膜の骨芽細胞とギャップ結合を介した連結性を保っていることから、これら骨細胞と骨芽細胞はグループを形成して機能していると考えられている。従って、骨折により骨細胞性のネットワークが破断すると、骨細胞だけでなく骨膜の骨芽細胞にも影響が及ぶことが推測される。本学位研究では、マウス肋骨骨折モデルを作成し、その骨折治癒過程において、骨折面からどのような位置の骨外膜から軟骨あるいは骨形成が誘導されるか、また、軟骨・骨が形成された皮質骨における骨細胞の状態、さらには骨細胞が産生する因子の局在分布に注目し組織化学的に検索した。

本実験では、北海道大学動物実験に関する規定に基づき行われた。生後8週齢雄性ICR系マウスを用い、Liらの方法(Micro Res Tech, 2004)に基づいて、麻酔下でマウスの第8番肋骨をハサミにて切断した肋骨骨折モデルを作成した。術後2、4、7日(骨折治癒初期 各群n=6)および2、3、4週(治癒後期 各群n=6)でマウスを灌流固定し、通法に従ってパラフィン切片を作製した。組織解析として、H-E染色、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase)の酵素組織化学のほか、アルカリフォスファターゼ(ALP: alkaline phosphatase)、スクレロスチン、dentin matrix protein (DMP)1、fibroblast growth factor (FGF)23の免疫組織化学を行った。さらに、骨折部に近い皮質骨(close region:骨折面から500 $\mu$ mまで)と離れた皮質骨(distant region:骨折面から500~1000 $\mu$ mの領域)における骨小腔内の骨細胞の有無、および、スクレロスチン、DMP1、FGF23を産生する骨細胞の割合について、統計解析をWelchのT検定で行った。

骨折2日後では、ALP陽性を示す骨膜は肥厚し、骨折面に近い皮質骨(close region)に多数の空の骨小腔が観察された。骨折4日後では、骨折面に近いclose regionにおける骨膜はALP陽性反応をほとんど示さず、すこし離れた領域(distant region)の骨膜はALP陽性反応を示しており、その皮質骨では骨細胞を含む多数の骨小腔が認められた。骨折後7日では、骨折面に近いclose regionの骨表面から軟骨組織が、また、その軟骨組織に隣接しながらも離れたdistant regionでは、骨表面から直接、

線維性骨が形成されていた。

そこで、close regionとdistant regionにおける空の骨小腔と骨細胞を有する骨小腔の割合を統計解析したところ、骨折面に近いclose regionでは空の骨小腔が多く、遠いdistant regionでは骨細胞を有する骨小腔が多いことが明らかとなった。また、close regionでは軟骨形成が、distant regionでは線維性骨の形成が誘導される傾向が認められたことから、これらの領域におけるスクレロスチン、DMP1、FGF23陽性を示す骨細胞について、組織化学的に解析した。その結果、骨折治癒初期、すなわち、骨折2、4、7日後において、骨折面に近いclose regionの皮質骨において骨細胞を有する骨小腔はわずかであり、それら骨細胞においてFGF23やスクレロスチン陽性を示すものは少数しか見られなかった。骨折面から遠いdistant regionでは、多くの骨小腔は骨細胞を有しており、それらのほとんどがDMP1、スクレロスチンおよびFGF23陽性反応を示した。骨細胞を有する骨小腔においてDMP1、スクレロスチンおよびFGF23陽性反応を示す割合をclose regionとdistant regionで統計解析を行うと、骨折2～7日において、distant regionはclose regionに比べて、スクレロスチンおよびFGF23陽性反応を示す骨細胞の割合が有意に高いことが確認された。これらの結果から、骨折に近い部位では、骨細胞が傷害されるため多数の空の骨小腔が生じること、また、骨細胞が残存したとしてもFGF23やスクレロスチン産生が低下することが強く示唆された。一方、骨折面に近いclose regionでは軟骨が、離れたdistal regionでは線維性骨が形成していたことから、骨細胞の生存の有無に加えて、骨細胞によるスクレロスチンやFGF23産生は軟骨または線維性骨の形成の指標となる可能性が示唆された。

一方、骨折後2～4週の治癒後期では、軟骨内骨化によって軟骨から骨へ、また骨改造によって幼弱な線維性骨から緻密骨へと変化する事、また、軟骨・線維性骨といった仮骨の周囲に新しい皮質骨が形成することが強く示唆された。また、依然として、骨折面に近いclose regionに空の骨小腔、遠いdistant regionには骨細胞を含む骨小腔が観察された。以上から、骨折に伴う皮質骨からの軟骨および線維性骨の形成は、本動物モデルでは骨折後7日以内の段階で決定すると推察された。

以上の研究から、骨折により形成される軟骨および線維性骨は、骨折治癒の初期において皮質骨に存在する骨細胞の影響を受けており、スクレロスチンやFGF23はその指標となる可能性が示唆された。

引き続き論文内容及び関連事項について、以下の項目を中止に質疑応答がなされた。

- (1) 骨折治癒の過程で生じる軟骨および線維性骨とALPの関連性と機能について
- (2) 骨小腔内の骨細胞が消失する機序とその過程について
- (3) 骨折治癒におけるFGF23陽性細胞の分布とFGF23の作用について
- (4) 骨折時における軟骨形成のメカニズムについて
- (5) 骨折治癒後期において空の骨小腔を有する皮質骨の改変について

この結果は、全身性疾患における歯科医学、特に骨折の治癒過程をはじめとする骨代謝学を鑑みたときに、重要な基礎科学的情報を提供しており、学術的にも高く評価されると考えられた。また、上記の質疑応答に対して、申請者は豊富な知識・学識と深い学術的洞察が養われていることが確認された。

審査担当者全員は、学位申請者が博士(歯学)の学位を授与するに値するものと認めた。