

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	澤 幹也
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目			
Local administration of WP9QY (W9) peptide promotes bone formation in a rat femur delayed- union model (ラット大腿骨難治性骨折モデルに対する WP9QY ペプチド局所投与は骨折治癒を促進する)			
論文審査担当者			
主 査	教授	今泉 和則	印
審査委員	教授	青山 裕彦	
審査委員	講師	河合 幹雄	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>WP9QY ペプチド (W9) は TNF-α 受容体拮抗剤として開発された 9 個のアミノ酸で構成される環状合成ペプチドであるが，RANK-RANKL シグナルへの拮抗作用も有し，骨吸収を阻害する．一方で，W9 は骨芽前駆細胞由来の骨形成関連因子の発現を上昇させ，骨皮質形成を促進することも報告されている．本研究では，W9 の骨折治療への臨床応用を目指し，ラット大腿骨難治性骨折モデルに対する W9 局所投与の骨修復促進効果を検討した．</p> <p>12 週齢 SD ラットの右大腿骨中央部に骨折部を作成し，末梢・中枢各 2mm ずつ骨膜を焼灼，髓内に 1.2mm K ワイヤを挿入し難治性骨折モデルを作成した．骨折部に W9 (100μl, 1mg) を手術時および以後 1 週ごと投与した群を W9 群，同時期に同量の PBS のみを投与した群を対照群とした (各 7 匹)．術後 2, 4, 6, 8 週に X 線撮影を行い骨折部周囲の仮骨形成，架橋の程度をスコアリングした．術後 8 週で屠殺し，マイクロ CT で骨形態解析後に組織をトルイジンブルー染色，TRAP 染色にて評価した．また，骨折部周囲の骨芽細胞数評価のため術後 4 週にて非脱灰標本を作製 (各 4 匹) しピラヌエバ骨染色にて評価した．さらに，術後 2 週時点で骨折部周囲の仮骨を採取し RT-PCR にて骨形成に関連する遺伝子の発現を検討した (各 6 匹)．</p> <p>術後 2, 4, 6, 8 週での各群における X 線写真で，PBS 群では焼灼した骨膜周囲の仮骨増生が乏しく多くのラットで仮骨の架橋が見られなかったのに対して，W9 群では焼灼部周囲に仮骨が増生し術後 6~8 週にかけて架橋される傾向にあった．X 線で骨折部の両皮質に骨性架橋が見られるものを骨癒合と定義すると，術後 8 週で</p>			

W9 群 57%, PBS 群 14%が骨癒合していた。また、術後 8 週の X 線スコアは PBS 群と比較し W9 群で有意に高値であった。マイクロ CT による骨形態解析で、骨折部中枢・末梢各 5mm 範囲の仮骨量 (TV) と仮骨中のミネラル化した骨量 (BV) を計測したところ、TV は両群間で有意差はなかったが、BV/TV は W9 群で有意に高値であった。また、TRAP 染色を用いた評価にて PBS 群と比較し W9 群で 4, 6, 8 週に骨折部周囲の TRAP-陽性細胞が有意に減少していた。さらに、ビラヌエバ骨染色を用いた評価にて術後 4 週における骨折部周囲の骨芽細胞数は W9 群で多い傾向にあった。骨折部周囲より採取した仮骨の RT-PCR は骨形成因子を中心に W9 群で発現が上昇しており、CTGF, Col1A1, OC, BMP4, ALP1 では PBS 群に比べ、有意に上昇していた。

これまでに、難治性骨折治療の方法として PTH 製剤、自家骨移植や低出力超音波パルス療法等が報告されているが、使用期間制限、手術侵襲の問題や効果が一定でないという問題点が指摘されており、低侵襲で効果的な新たな骨折治療法の開発が期待される。本研究結果から W9 投与群で X 線スコアが有意に高く、仮骨内の骨形成因子の発現が上昇し、マイクロ CT による評価で BV/TV が高値であった。つまり、難治性骨折モデルに対する W9 局所投与は仮骨からの骨成熟を促進させることで、骨折治癒に寄与していると考えられた。一方で、骨折部周囲の破骨細胞数は W9 群で有意に減少しており、有意差はなかったが W9 群で仮骨量が多い傾向にあった。これは W9 の骨吸収阻害作用によるものと考えられたが、骨癒合を阻害する所見は見られなかった。

破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のカップリング機構に関して、W9 は骨吸収には抑制的に働く一方で、骨形成を促進するというユニークな作用をもち、今後のカップリング機構の解明の一端を担うことが期待される。本研究で骨折治癒促進作用も明らかになったことから骨折治療剤としての応用が可能と考える。

以上の結果から、本論文は W9 をラット大腿骨難治性骨折モデルに局所投与することで骨折後の骨癒合を促進する現象を見出したことから、臨床応用への扉を開くとともに、整形外科学領域研究の発展に資すること大である。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するのに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	澤 幹也
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Local administration of WP9QY (W9) peptide promotes bone formation in a rat femur delayed- union model (ラット大腿骨難治性骨折モデルに対する WP9QY ペプチド局所投与は骨折治癒を促進する)			
最終試験担当者			
主 査	教授	今泉 和則	印
審査委員	教授	青山 裕彦	
審査委員	講師	河合 幹雄	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年11月2日の第71回広島大学研究科発表会（医学）及び平成29年10月31日の本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. W9 が骨折治癒促進に及ぼした影響とその機序 2. W9 の投与経路とその効果 3. W9 投与による骨芽細胞形態への影響 4. 抗 TNF α 作用の骨癒合への影響 5. 本研究の臨床応用 <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			