

## 審査の結果の要旨

氏名 下赤 隆

本研究は IGF-I およびインスリンの受容体キナーゼ基質であるインスリン受容体基質-1 (Insulin receptor substrate-1: IRS-1) の骨折治癒への役割を明らかにするため、内軟骨性骨化のモデルシステムを確立し、そのシステムを用いて、IRS-1 ノックアウトマウスと野生型マウスとを比較解析することを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. マウスでの骨折モデルを確立した。このモデルで、骨折部の X 線像を経時的に観察すると、1 週間後から仮骨の形成が認められ、2、3 週までに骨折部に旺盛な仮骨の架橋形成が起こり骨癒合が見られた。仮骨の大きさは、3 週間後がピークで、その後リモデリングによって小さくなる事が示された。

2. このモデルを用いて IRS-1 ノックアウトマウスと野生型マウスでの骨折治癒を比較検討した。骨折後 3 週での X 線像では、野生型マウスでは 15 例全例に大きな仮骨を伴って骨癒合が見られたが、ノックアウトマウスではそのほとんどは骨癒合がみられず偽関節を呈し、15 例中 4 例においてのみ骨癒合がみられたが、形成された仮骨は野生型に比べ大きさが小さく仮骨の骨塩量も低下している事が示された。

3. 組織学的には、骨折後 1 週では、野生型マウスでは骨折部周囲に旺盛な組織反応がみられ間葉系細胞が数多く集まっていたが、ノックアウトマウスの骨折部では全体的に組織反応が小さく出現する間葉系細胞の数も少なかった。骨折後 3 週では野生型マウスでは外骨膜部に旺盛な骨形成がみられたが、ノックアウトマウスでの骨折周囲での骨形成は少なく骨折間部には線維組織が介在し偽関節の状態だった。X 型コラーゲンの免疫染色では、野生型マウスでの軟骨様組織では局在が見られないのに対し、ノックアウトマウスでは局在がみられ肥大化軟骨細胞用の像を呈していた。TUNEL 染色にてアポトーシスをみると、野生型マウスの軟骨形成部では TUNEL 陽性細胞がほとんど見られなかったのに対しノックアウトマウスでは TUNEL 陽性細胞が見られた。すなわちノックアウトマウスの骨折部周囲の軟骨形成は、骨折治癒早期に軟骨細胞の増殖の障害がみられ、分化やアポトーシスが進行している事が示された。

4. マウスの成長板よりコラゲナーゼ処理で軟骨細胞を単離する方法を確立した。単離した軟骨細胞の純度を確認するために、大腸菌由来の  $\beta$ -ガラクトシダーゼを 1 型コ

ラーゲンまたは2型コラーゲンのプロモーターに組み込まれたマウス(Coll1 マウス、Col2 マウス)の成長板から単離した軟骨細胞を X-gal 染色により観察したところ、Coll1 マウスでは X-gal 染色で染まらず、Col2 マウスでは青く染まった。すなわち、この方法で採取した細胞が、軟骨細胞としての純度が高いことが示された。

5. この方法を用いてノックアウトマウスと野生型マウスから単離した軟骨細胞の増殖能を評価するために MTT アッセイとサイトカイン刺激下でのチミジンの取り込み実験をおこなったところ、ノックアウトマウス由来の軟骨細胞は IGF-I やインスリンの刺激に対する反応性が低下していた。次に単離した軟骨細胞の基質合成能を評価するのに Alcian Blue 染色を行ったところ、野生型マウスでは IGF-I や Insulin の刺激に対して基質合成が亢進していたが、ノックアウトマウスでは IGF-I や Insulin 刺激には反応しなかった。

以上、本論文はマウスでの内軟骨性骨化を観察できるモデルシステムを確立し、このシステムを用いて IRS-1 ノックアウトマウスと野生型マウスで比較検討することにより IRS-1 シグナルの骨折治癒への関与を明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、骨折治癒初期の細胞増殖に IRS-1 シグナルが重要である事の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。