

# 高知大学学位授与記録

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

## 目 次

学位記番号	氏名	学位論文の題目	ページ
甲総医博第148号	牛若 昂志	Peritoneal natural killer cell chemotaxis is decreased in women with pelvic endometriosis  (子宮内膜症女性における腹腔内NK細胞の走化性の低下)	1
甲総医博第149号	和田 紘幸	The effect of postmenopausal osteoporosis on subchondral bone pathology in a rat model of knee osteoarthritis  (閉経後骨粗鬆症がラット変形性膝関節症モデルの軟骨下骨に与える影響)	6

氏名(本籍)	牛若 昂志 (滋賀県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第148号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	令和5年4月18日
学位論文題目	Peritoneal natural killer cell chemotaxis is decreased in women with pelvic endometriosis

(子宮内膜症女性における腹腔内NK細胞の走化性の低下)

発表誌名 American Journal of Reproductive Immunology. 2022 Sep;88(3)

<b>審査委員</b>	主査	教授	村上 一郎
	副査	教授	大畑 雅典
	副査	教授	山本 哲也

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨

# 学位論文要旨

氏名	牛若 昂志
論文題目	<p>Peritoneal natural killer cell chemotaxis is decreased in women with pelvic endometriosis                      (子宮内膜症女性における腹腔内NK細胞の走化性の低下)</p>
<p>(論文要旨)</p> <p><b>【背景・目的】</b>                      子宮内膜症は、「子宮内膜および類似組織が子宮内膜層以外の骨盤内臓器で増殖する」疾患であり、子宮内膜組織が異所性に生着し・増殖し、機能する点から、類腫瘍性疾患と位置付けられている。本邦では増加しており、女性の月経困難、不妊症などの問題を引き起こす。その発症機序としては、Sampsonが提唱した『子宮内膜移植説』と、Mayerが提唱した『体腔上皮化説』の2つの説がある。発生機序の全容はいまだに解明されていないが、逆流経血による子宮内膜細胞の異所性生着・増殖が必須であることから、これを許容する宿主の免疫監視機構の関与が注目されている。子宮内膜症患者ではNK細胞やマクロファージの機能が低下しており、腹腔内の免疫監視機能や処理機能の低下が関与している可能性がある。NK細胞においては、細胞傷害性と遊走能(chemotaxis 走化性)が重要と考えられる。細胞障害の低下に関しては報告されているが、走化性に関しては検討されていない。本研究では、子宮内膜症患者における免疫細胞の走化性を解析することで子宮内膜症の発症機序の解明を目的とした。</p> <p><b>【方法】</b>                      腹腔鏡手術で得られた腹腔液中の免疫担当細胞(NK細胞、マクロファージ、T細胞)を蛍光免疫染色法で同定しそれぞれの走化性をタイムラプス法で検討した。対象は子宮内膜群27名と非内膜症群13名で比較検討した。また、末梢血NK細胞は末梢血抗体ビーズ法により取得した。微小培養した細胞を30秒1コマでタイムラプス撮影し、1細胞あたりの平均移動速度を算出し、走化性(Chemotaxis)とした。走化性と子宮内膜症の有無、重症度(R-ASRM)のスコアとの関係を検討した。</p>	

**【結果】**

腹腔内のマクロファージとT細胞は内膜症群・非内膜症群間で有意な差はなかった。しかし、腹腔内のNK細胞の走化性は子宮内膜症群で有意に低下していた。月経中は両群でNK細胞の走化性が低下した。月経後は非内膜症群でNK細胞の走化性は有意に増加したが、子宮内膜症群は低下したまま推移した。R-ASRMのスコアは走化性とは有意の相関を認めなかった。子宮内膜症では非内膜症に比較し、有意に走化性が低下していた。一方、マクロファージとT細胞では、非内膜症と有意差を認めなかった。末梢血NK細胞も非内膜症と有意差を認めなかった。

**【考察】**




子宮内膜症婦人では、腹腔内のNK細胞による細胞傷害性だけでなく走化性も著しく低下しており、特に走化性は月経周期を通じて低下している。したがって、腹腔内に入った逆行性月経血中の抗原は、十分に処理されていない可能性がある。このような免疫過程が腹腔内で繰り返されることにより、子宮内膜症が発症し、その後進行する可能性がある。

本研究にはいくつかの限界がある。NK細胞の走化性の原因が解明されておらず、ケモカインの影響、ケモカイン受容体の発現の強弱、NK細胞内のアクチン動態の構成などが考えられる。NK細胞の走化性低下は、NK細胞自身によるものなのか、腹膜環境因子によるものなのかは、結論が出ていない。この問題を証明するために、今後計画している。

**【結語】**

本論文は、子宮内膜症において腹腔内NK細胞の走化性が低下していることを明らかにした最初の報告である。腹腔内の免疫反応の低下と頻繁な逆行性月経の組み合わせにより、子宮内膜細胞は免疫学的監視から逃れ、腹腔内に生着している可能性がある。今後、腹腔内NK細胞走化性の低下に関する研究が進めば、子宮内膜症の病態解明と新たな治療・予防法の開発に貢献することが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	牛若 昂志
審 査 委 員	主 査 氏 名	村上 一郎 
	副 査 氏 名	大畑 雅典 
	副 査 氏 名	山本 哲也 

題 目 Peritoneal natural killer cell chemotaxis is decreased in women with pelvic endometriosis  
(子宮内膜症女性における腹腔内 NK 細胞の走化性の低下)

著 者 Takashi Ushiwaka, Shinpei Yamamoto, Chika Yoshii, Shoko Hashimoto, Tamami Tsuzuki, Kayo Taniguchi, Chiaki Izumiya, Hiroaki Kobayashi, Nagamasa Maeda

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
American Journal of Reproductive Immunology. 2022 Sep;88(3)

### 要 旨

#### 【背景・目的】

子宮内膜症は、「子宮内膜および類似組織が子宮内膜層以外の骨盤内臓器で増殖する」疾患であり、子宮内膜組織が異所性に生着・増殖し、機能する点から、類腫瘍疾患と位置付けられている。近年、本邦では増加しており、女性の月経困難、不妊症、腫瘍発生などの問題を引き起こす事から、喫緊の課題の一つである。発症機序としては、『子宮内膜移植説』および『体腔上皮化説』が提唱されている。発生機序の全容はいまだ解明されていないが、逆流経血による子宮内膜細胞の異所性生着・増殖が関わっている事が示唆される症例も多く、この現象を許容する宿主の免疫監視機構の関与が注目されている。本研究では、子宮内膜症患者に於ける免疫細胞の走化性を解析することで子宮内膜症の発生機序の解明を目的とした。

#### 【方法】

腹腔鏡手術で得られた腹腔液中の免疫担当細胞（NK細胞、マクロファージ、T細胞）を蛍光免疫染色法で同定しそれぞれの走化性をタイムラプス法で検討した。対象は子宮内膜

症群27名で、非内膜症群13名と比較検討した。また、末梢血NK細胞は末梢血より抗体ビーズ法により取得した。微小培養した細胞を30秒1コマでタイムラプス撮影し、1細胞あたりの平均移動速度を算出し、走化性 (Chemotaxis) とした。走化性と子宮内膜症重症度 (R-ASRM) スコアとの関係を検討した。

#### 【結果・考察】

腹腔内のマクロファージとT細胞の走化性は内膜症群・非内膜症群間で有意な差はなかった。しかし、腹腔内のNK細胞の走化性は子宮内膜症群で有意に低下していた。月経中は両群でNK細胞の走化性が低下していた。月経後は非内膜症群でNK細胞の走化性は有意に増加したが、子宮内膜症群では低下したまま推移した。R-ASRMスコアと走化性との間には有意な相関を認めなかった。

子宮内膜症婦人では、腹腔内のNK細胞の細胞障害性だけでなく走化性も著しく低下しており、特に走化性は月経周期を通じて低下している。従って、腹腔内に入った逆行性月経血中の抗原は、十分に処理されていない可能性がある。このような免疫寛容の如き現象が繰り返される事により、子宮内膜症が発症し、その後進展する可能性があると思われた。

#### 【結論】

本論文は、子宮内膜症において腹腔内NK細胞の走化性が低下している事を明らかにした最初の論文である。腹腔内の免疫反応の低下と頻繁な逆行性月経の組み合わせにより、子宮内膜細胞は免疫学的監視から逃れ、腹腔内に生着している可能性がある。今後、腹腔内NK細胞走化性の低下に関する研究が進展すれば、子宮内膜症の病態解明と新たな治療・予防法の開発に貢献する事が期待される。

以上のように、本論文は、子宮内膜症において腹腔内NK細胞の走化性が低下している事を明らかにした最初の論文であり、子宮内膜症の病態解明に向けて、発展性を十分に期待できる内容であり、医学的に高い価値を有するものである。

よって、審査委員一同は本論文が高知大学博士 (医学) に相応しい価値あるものと判断した。

氏名(本籍)	和田 紘幸 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第149号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	令和5年5月16日
学位論文題目	The effect of postmenopausal osteoporosis on subchondral bone pathology in a rat model of knee osteoarthritis  (閉経後骨粗鬆症がラット変形性膝関節症モデルの軟骨下骨に与える影響)
発表誌名	Scientific Reports (2023) 13:2926 2023年2月20日

<b>審査委員</b>	主査	教授	村上	一郎
	副査	教授	寺田	典生
	副査	教授	山本	哲也

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨

# 学 位 論 文 要 旨




論文題目	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="539 517 751 618">氏名</td> <td data-bbox="751 517 1433 618">和田 紘幸</td> </tr> <tr> <td colspan="2" data-bbox="539 618 1433 840">The effect of postmenopausal osteoporosis on subchondral bone pathology in a rat model of knee osteoarthritis (閉経後骨粗鬆症がラット変形性膝関節症モデルの軟骨下骨に与える影響)</td> </tr> </table>	氏名	和田 紘幸	The effect of postmenopausal osteoporosis on subchondral bone pathology in a rat model of knee osteoarthritis (閉経後骨粗鬆症がラット変形性膝関節症モデルの軟骨下骨に与える影響)	
氏名	和田 紘幸				
The effect of postmenopausal osteoporosis on subchondral bone pathology in a rat model of knee osteoarthritis (閉経後骨粗鬆症がラット変形性膝関節症モデルの軟骨下骨に与える影響)					
(論文要旨)					
<p><b>【背景】</b>:変形性膝関節症(以下膝OA)は関節軟骨の変性磨耗と共に軟骨下骨硬化、骨嚢胞、骨棘形成などの骨の変化がみられる高齢女性に多い変性疾患である。近年、膝OA患者では軟骨下骨の破骨細胞が上昇すること、無症候性膝OAと比較して、症候性膝OA患者では軟骨下骨の破骨細胞が増加することが報告されており、我々はOAの進行や症状悪化の要因として軟骨下骨の破骨細胞活性に注目してきた。しかし、膝OAと同様に破骨細胞活性が上昇し、高齢女性に多い疾患として骨粗鬆症があるが、骨粗鬆症の合併による膝OAの病態への影響は不明である。本研究の目的は、骨粗鬆症が膝OAに与える影響を特に軟骨下骨の破骨細胞に注目して、骨粗鬆症モデルと膝OAモデルを組み合わせたラットモデルを作製し検討することである。本研究では、骨粗鬆症の合併により軟骨下骨の破骨細胞活性が上昇しOAを進行させるという仮説を設定した。</p> <p><b>【方法】</b>:12週齢の雌のSDラットを用いて皮切のみを加えたShamモデル、両側卵巣切除した骨粗鬆症モデル(OVX)、右膝内側半月板切除したOAモデル(MMx)、OVXとMMxを組み合わせた骨粗鬆症+OAモデル(OVX+MMx)を作成した。モデル作製8週間後に、右膝関節を摘出し、組織学的OA評価(Mankin score)を用いた軟骨評価、OARSI scoreを用いた軟骨・軟骨下骨・滑膜炎評価)、荷重部軟骨下骨の破骨細胞密度、ELISA法による軟骨下骨組織のthe receptor activator of nuclear factor-<math>\kappa</math>B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG)比、軟骨下骨の骨密度を評価した。また疼痛行動評価として、術前から術後8週までのdynamic weight-bearing装置を用いた後肢の荷重患健比、von Frey filamentを用いた機械刺激に対する後肢の応答性を評価した。</p> <p><b>【結果】</b>:OAモデルに骨粗鬆症が加わることで、軟骨石灰化層～軟骨下骨のOA変化が強くなり、荷重部軟骨下骨の破骨細胞密度が上昇し、軟骨下骨の骨密度が低下した。OVX群、MMx群、OVX+MMx群では破骨細胞活性を反映する軟骨下骨のRANKL/OPG比が上昇し、組織学的にも破骨細胞が軟骨石灰化層を侵食しようとする像を認めた。さらにOAモデルにおいて軟骨下骨の破骨細胞密度はOARSI軟骨下骨scoreと有意に関連していた。骨粗鬆症が疼痛行動に与える追加効果は認めなかった。</p> <p><b>【考察】</b>:我々は、膝OAに骨粗鬆症が合併することで軟骨下骨を中心に膝OAが進行することを初めて明らかにした。軟骨下骨の破骨細胞活性が上昇した群では、破骨細胞が軟骨石灰化層を侵食しようとする組織像を認め、軟骨下骨の破骨細胞密度は軟骨下骨のOA進行と関係していた。この結果から、骨粗鬆症の合併により活性化された軟骨下骨の破骨細胞がOAを悪化させている可能性が示唆された。ただし、MMx群と同程度に軟骨下骨の破骨細胞が活性化していたOVX群では、OA変化がほとんど見られず、骨粗鬆症の合併はOAのtriggerではなくacceleratorとして働いていると考える。最近のメタアナリシスでは骨吸収抑制薬は膝OA患者の病期進行を抑制できないと報告されているが、</p>					



膝 OA 患者の中でも軟骨下骨の破骨細胞活性が特に高い閉経後骨粗鬆症を合併している症例を対象を絞れば、破骨細胞を抑制する骨吸収抑制薬が OA 進行を抑制できる可能性がある。今後、どの骨吸収抑制薬をどのタイミングで、どのような方法で投与するのが OA 進行抑制に効果的なのか検討を進める必要がある。

**【結論】**：ラット膝 OA モデルにおいて、骨粗鬆症の合併は軟骨下骨の破骨細胞活性を上昇させ、軟骨骨石灰化層、軟骨下骨を中心に OA の病態を悪化させた。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	和田 紘幸
審査委員	主査氏名	村上 一郎 
	副査氏名	寺田 典生 
	副査氏名	山本 哲也 

題 目 The effect of postmenopausal osteoporosis on subchondral bone pathology in a rat model of knee osteoarthritis  
( 閉経後骨粗鬆症がラット変形性膝関節症モデルの軟骨下骨に与える影響 )

著 者 Hiroyuki Wada, Koji Aso, Masashi Izumi, Masahiko Ikeuchi

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
Scientific Reports (2023) 13:2926  
2023年2月20日

### 要 旨

#### 【背景・目的】

変形性膝関節症(以下膝OA)は関節軟骨の変性磨耗と共に軟骨下骨硬化、骨嚢胞、骨棘形成などの骨の変化がみられる高齢女性に多い変性疾患である。近年、膝OA患者では軟骨下骨の破骨細胞活性が上昇すること、無症候性膝OAと比較して症候性膝OA患者では軟骨下骨の破骨細胞が増加することが報告されており、我々はOAの進行や症状悪化の要因として軟骨下骨の破骨細胞活性に注目してきた。しかし、膝OAと同様に破骨細胞活性が上昇し、高齢女性に多い疾患として骨粗鬆症があるが、骨粗鬆症の合併による膝OAの病態への影響は不明である。そこで、骨粗鬆症の合併により軟骨下骨の破骨細胞活性が上昇しOAを進行させるという仮説の下、骨粗鬆症が膝OAに与える影響を特に軟骨下骨の破骨細胞に注目して、骨粗鬆症モデルと膝OAモデルを組み合わせたラットモデルを作製し検討した。

#### 【方法】

12週齢の雌のSDラットを用いて皮切のみを加えたShamモデル、両側卵巣切除した骨粗鬆症モデル(OVX)、右膝内側半月板切除したOAモデル(MMx)、OVXとMMxを組み合わせた骨粗鬆症+OAモデル

ル (OVX+MMx) を作製した。モデル作製8週間後に、右膝関節を摘出し、組織学的OA評価 (Mankin scoreを用いた軟骨評価、OARSI scoreを用いた軟骨・軟骨下骨・滑膜炎評価)、荷重部軟骨下骨の破骨細胞密度、ELISA法による軟骨下骨組織のthe receptor activator of nuclear factor- $\kappa$  B ligand(RANKL)/osteoprotegerin(OPG)比、軟骨下骨の骨密度を評価した。また疼痛行動評価として、術前から術後8週までのdynamic weight-bearing装置を用いた後肢の荷重患健比、von Frey filamentを用いた機械刺激に対する後肢の応答性を評価した。

#### 【結果・考察】

OAモデルに骨粗鬆症が加わることで、軟骨石灰化層～軟骨下骨のOA変化が強くなり、荷重部軟骨下骨の破骨細胞密度が上昇するとともに、軟骨下骨の骨密度が低下した。OVX群、MMx群、OVX+MMx群では破骨細胞活性を反映する軟骨下骨のRANKL/OPG比が上昇し、組織学的にも破骨細胞が軟骨石灰化層を侵食しようとする像を認めた。さらにOAモデルにおいて軟骨下骨の破骨細胞密度はOARSI軟骨下骨scoreと有意に相関していた。しかしながら、骨粗鬆症が疼痛行動に与える追加効果は認めなかった。

本研究は、膝OAに骨粗鬆症が合併することで軟骨下骨を中心に膝OAが進行することを初めて明らかにしたものである。軟骨下骨の破骨細胞活性が上昇した群では、破骨細胞が軟骨石灰化層を侵食しようとする組織像を認め、軟骨下骨の破骨細胞密度は軟骨下骨のOA進行と関係していた。これらの結果から、骨粗鬆症の合併により活性化した軟骨下骨の破骨細胞がOAを悪化させている可能性が示唆された。ただし、MMx群と同程度に軟骨下骨の破骨細胞が活性化していたOVX群ではOA変化はほとんど見られず、骨粗鬆症の合併はOAのtriggerではなくacceleratorとして働いていると考えられる。最近のメタアナリシスでは骨吸収抑制薬は膝OA患者の病期進行を抑制できないと報告されているが、膝OA患者の中でも軟骨下骨の破骨細胞活性が特に高い閉経後骨粗鬆症を合併している症例に対象を絞れば、破骨細胞を抑制する骨吸収抑制薬がOA進行を抑制できる可能性がある。今後、どの骨吸収抑制薬をどのタイミングで、どのような方法で投与するのがOA進行抑制に効果的なのか検討を進める必要がある。

#### 【結論】

ラット膝OAモデルにおいて、骨粗鬆症の合併は軟骨下骨の破骨細胞活性を上昇させ、軟骨石灰化層、軟骨下骨を中心にOAの病態を悪化させた。

以上のように、本論文は膝OAに骨粗鬆症が合併することで軟骨下骨を中心に膝OAが進行することを初めて明らかにした報告であり、医学的に高い価値を有するものである。

よって、審査委員一同は本論文が高知大学博士 (医学) に相応しい価値あるものと判断した。