

生理的骨改造時における破骨細胞の アポトーシスに関する免疫組織化学的研究

学位論文内容の要旨

【緒言】

細胞はアポトーシスとネクローシスという二つの様式で細胞死することが知られている。アポトーシスは細胞の自殺，すなわちプログラムされた細胞死であり，生理的条件下（病的状態でない）において多くの単核細胞で観察されている。本研究で検索対象とした破骨細胞は，多核の巨細胞であり，その特徴として，形態的に透過型電子顕微鏡（以下 TEM）で観察される波状縁や明帯の存在，酵素化学的に酒石酸耐性酸性フォスファターゼ（以下 TRAP）活性の存在が知られている。多核の細胞である破骨細胞の病的条件下におけるアポトーシスに関しては報告があるが，生理的条件下に関してはよく分かっていない。そこで本研究は，骨改造中のラット下顎骨を用いて，生理的条件下における破骨細胞のアポトーシス過程を，形態的に明らかにすることを目的として行なった。

【材料と方法】

実験動物に生後 7 日齢の Wistar 系ラット 10 匹を用いた。全身麻酔下で左心室より 4% パラフォルムアルデヒド (0.1 M PBS, pH 7.4) にて灌流固定後，下顎骨を採取し，4℃で 12 時間浸漬固定した。固定後試料は，5% EDTA 溶液 (pH 7.4) で脱灰し，通法に従ってパラフィン包埋および凍結包埋した。パラフィン包埋試料は厚さ 5μm，凍結包埋試料は厚さ 10μm の連続切片を，前頭断方向から切歯および臼歯を含む領域で作製し，パラフィン切片は HE 染色および免疫染色に，凍結切片は免疫染色および免疫電顕に用いた。免疫染色は，アポトーシスを起こした核を染める TUNEL 染色と酵素組織化学的に破骨細胞を特異的に染色する TRAP 染色の二重染色を行った。TUNEL 染色には Apoptag™ペルオキシダーゼ In Situ アポトーシス検出キットを用いて，以下のように行った。パラフィン切片はプロテアーゼ K 処理後に，また凍結切片はアセトン後固定後に，3.0% 過酸化水素/PBS にて内因性ペルオキシダーゼを除去し，TdT 酵素と dUTP ジゴキシゲニン (1:11 希釈) で 37℃，1 時間，湿潤箱で反応させた。切片は PBS にて洗浄後，1 次抗体に対する抗体を室温で 30 分間反応させた。次に，DAB によって赤褐色に発色させ，アポトーシスを起こした細胞を検索した。陽性コントロールとして，離乳後 4 日目のラット乳腺細胞より作製したポジティブコントロールスライドを用いた。また，陰性コントロールは，TdT の代わりに PBS を反応させた。TUNEL 反応検出後，同一切片において破骨細胞の存在を確認するためにアゾ色素法を用いて TRAP 活性の検出を行った。基質として Naphthol AS-TR，ジアゾニウム塩として Fast Blue BB を用い，10 mM 酒石酸ナトリウムを含有した 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.2) を反応液とし，37℃で TRAP 活性を青色に発色させて検出した。この TUNEL と TRAP の二重染色された切片は光学顕微鏡 (以下光顕) を用いて観察し，

写真撮影した。二重染色したパラフィン切片において、TUNEL 陰性・TRAP 陽性、および TUNEL 陽性・TRAP 陽性の多核の破骨細胞数を計測した。また、凍結切片は上述した方法で TUNEL および TRAP 染色後、1% OsO₄にて室温で1時間後固定し、脱水後、ビームカプセルに満たしたエポキシ樹脂を浸潤させ、重合・再包埋した。再包埋した試料は、包埋された凍結切片に平行な方向で0.1μm厚の超薄切片を作製し、ウラン・鉛の二重染色の後、TEMにて観察した。

【結果】

免疫染色の結果、骨表面上に吸収窩を形成している多核の破骨細胞は青色の TRAP 陽性を示していたが、細胞体中に見られる複数の核は通常すべて TUNEL 陰性を示していた。TRAP 陽性は破骨細胞の細胞質、刷子縁、刷子縁直下の吸収窩表面に特に強く観察された。このような破骨細胞周囲の骨表面上には、TRAP 陰性で、赤褐色の TUNEL 陽性の核をもつ細胞がしばしば観察された。また、骨表面上に吸収窩は形成していないが、骨近傍において TRAP 陽性を示す多核の破骨細胞が観察され、このような細胞は円形の細胞外形を示していた。これら細胞の中に、TUNEL 陽性を示す1個または2個の核をもつ細胞がごく稀に観察され、TUNEL 陽性の核が細胞体から突出するような像も観察された。このような TUNEL 陽性を示す核をもつ破骨細胞では、細胞質の一部に TRAP 強陽性である部分を含む細胞も観察された。このような細胞と骨表面の間には刷子縁は観察されなかった。このように TRAP 陽性で TUNEL 陽性の核をもつ破骨細胞は、骨表面上に存在する多核で TRAP 陽性の破骨細胞中、約1%の頻度で観察された。

骨表面から離れた部位には、TUNEL 陽性の核を1個含む TRAP 陽性の構造物がしばしば観察された。これらの構造物の外形は円形で、一部は血管壁に近接するものも見られた。また、TUNEL 陽性の核を含まず TRAP 陽性でその大きさが数μmから15μm程度の類円形の外形を示す構造物も骨表面から離れた部位に観察され、これら構造物のいくつかは血管壁の近傍や、線維芽細胞様の細胞体中に観察された。陽性コントロールでは、全体の細胞の核の1~2%にアポトーシスが生じることを確認し、また陰性コントロールでは、特異的な免疫反応は認められなかった。免疫染色を施した同一切片の光顕と TEM による破骨細胞の観察を比較すると、光顕では核全体に観察される TUNEL 陽性反応は、TEM では核の中で幾つかに分散した電子密度の高い不規則な外形を示す構造物として観察された。また、破骨細胞の細胞体中に存在する細胞内小器官であるミトコンドリアや粗面小胞体の単位膜も明瞭に観察され、その微細構造は比較的よく保存されて観察された。この破骨細胞の細胞体中には TUNEL 陽性の核の他に TUNEL 陰性の核も存在していたが、これら TUNEL 陰性の核の微細構造には特に変性像などは観察されなかった。

【考察】

本研究により、生理的条件下において破骨細胞がアポトーシスを起こすことが明らかとなった。また、同一切片の光顕と TEM による破骨細胞の観察の結果より、アポトーシスの際に、破骨細胞の細胞体中に含まれる複数の核における DNA の変性は個々の核で独立して生じ、同時に生じないという可能性が示唆された。これは、破骨細胞が多核の巨細胞であり、形成時期の違う破骨細胞同士の細胞融合により多核化するためであると考えられる。また、骨から離れた部位に観察された TUNEL と TRAP 活性陽性を示す構造物は破骨細胞がアポトーシスにより断片化したものと推測され、このことから、骨改造時の破骨細胞はアポトーシスにより1個から2個までの核を含む様々な大きさの構造物に断片化し、その断片構造物は周囲の血管に進入することや線維芽細胞等に貪食されることにより骨表面から迅速に処理される可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 山 敦 郎

副 査 教 授 土 門 卓 文

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

生理的骨改造時における破骨細胞の アポトーシスに関する免疫組織化学的研究

審査は、審査担当者全員出席の元に、申請者による論文要旨の説明後、説明内容とその関連事項について口頭試問の形式にて行った。以下に論文の要旨と審査の内容を述べる。

本研究の目的は、生理的骨改造時における破骨細胞のアポトーシス過程を TUNEL 法および透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて形態的に明らかにすることである。

試料に生後 7 日齢のラット下顎骨を用いた。通法に従って固定・脱灰後、厚さ $5\mu\text{m}$ のパラフィン標本および厚さ $10\mu\text{m}$ の凍結標本を作製し、TUNEL 染色と TRAP 染色の二重染色後に、光学顕微鏡 (光顕) により観察した。凍結切片はその後、後固定後エポキシレジンに再包埋し、厚さ $0.1\mu\text{m}$ の超薄切片を作製、ウラン・鉛の二重染色の後、TEM で観察した。

通常、骨表面上に吸収窩を形成している多核の破骨細胞は TRAP 陽性を示し、細胞体中に見られる複数の核は通常すべて TUNEL 陰性を示した。しかし極稀に、骨表面上に吸収窩を形成しない TRAP 陽性の破骨細胞で、TUNEL 陽性を示す 1 個または 2 個の核をもつものが観察され、TUNEL 陽性の核が細胞体から突出するような像も観察された。TRAP 陽性で TUNEL 陽性の核をもつ破骨細胞は、骨表面上に存在する多核で TRAP 陽性の破骨細胞中、約 1% の頻度で観察された。骨表面から離れた部位には、TUNEL 陽性の核を 1 個含む TRAP 陽性の構造物がしばしば観察され、一部には血管壁に近接するものもあった。また、TUNEL 陽性の核を含まない TRAP 陽性で類円形の外形を示す構造物も観察され、血管壁の近傍や、線維芽細胞様の細胞体中にも観察された。同一切片の光顕と TEM による観察を比較すると、光顕では核全体に観察される TUNEL 陽性反応は、TEM では核の中で分散した電子密度の高い不規則な外形を示す構造物として観察された。この破骨細胞の細胞体中には TUNEL 陽性の核の他に TUNEL 陰性の核も存在していたが、これら TUNEL 陰性の核の微細構造には特に変性像などは観察されなかった。

本研究により、生理的条件下において破骨細胞がアポトーシスを起こすことが明らかとなった。また、骨改造時の破骨細胞はアポトーシスにより 1 個から 2 個までの核を含む様々

な大きさの構造物に断片化し、周囲の血管への進入や線維芽細胞等による貪食で、骨表面から迅速に処理される可能性が示唆された。

審査の内容

1. TUNEL 陽性の核を含む断片構造物が血管中に取り込まれる様な所見はみられたか。

本研究では、血管の近傍に観察されるのみでその内部には観察されていない。しかしながら、ビスホスホネート投与時においては血管に進入する像が報告されており、炎症がなく白血球が存在しない生理的条件下においては周囲の正常細胞の貪食のみで破骨細胞のアポトーシス後の断片を処理することには無理があると思われるため、血管内への進入の可能性が高いと考えられる。

2. 免疫電子顕微鏡観察において、電子密度の高い構造は、染色体の断片は観察されるか。また、TUNEL 染色を行わないで電子顕微鏡像を観察したとしたら、本研究で観察された破骨細胞はどのような像を示すと考えるか。

電子顕微鏡では DAB とオスミウムにより協調された染色体の断片像が観察される。また、TUNEL 染色により陽性を示す核は核のクロマチンの偏在像とは異なるため、TUNEL 染色を行わなければアポトーシスの所見を得られないと考えられる。これは、TUNEL 染色により示されるアポトーシスと電子顕微鏡により報告されるアポトーシスでは DNA の断片をとらえた時期が違うという可能性を示唆している。

3. 破骨細胞に寿命があるか、またアポトーシスと骨表面からの離脱はどちらが先行するか。

破骨細胞に寿命があるかについては、*in vitro* で多くの報告があるが、*in vivo* ではなく、本研究は横断的な所見のみが得られるため不明である。TUNEL 陽性の核を含む破骨細胞で、骨表面に吸収窩を形成しているものは観察されなかったことから、骨表面からの離脱が先行すると考えられる。

4. アポトーシスにより断片化する際には、細胞膜は保持されているか。また、核の分かれ方に規則性はあるか。

アポトーシスの際には細胞膜はすべて保持されたまま断片化する。本研究では観察されていないが、破骨細胞を使った研究の報告で、TUNEL 陽性と陰性の核を含む 2 個以上の断片様の構造が観察されているため、断片構造物が処理できうる程度の大きさにランダムに分かれると推測される。

本研究は *in vivo* において、破骨細胞が生理的骨改造時にアポトーシスを起こし、破骨細胞のアポトーシス後の断片が周囲の血管や正常細胞による貪食により処理されることを示唆した。生理的条件下における骨組織の骨形成および骨吸収のメカニズムに関しては未

だ解明されていない事項も多く，その解明は，今後骨組織に生じる疾患の治療や予防に有用な可能性があり，将来性の点においても高く評価される．よって，申請者は博士(歯学)の学位に値するものと認められた．