

学位論文題名

Immunolocalization of DMP1 and sclerostin in
osteocytic lacunar canalicular system of
osteoprotegerin deficient mice

(オステオプロテジェリン遺伝子欠損マウスの骨細胞・骨細管系における
DMP1と sclerostin の免疫局在)

学位論文内容の要旨

【背景】 骨細胞は、dentin matrix protein-1(DMP-1: Toyosawa et al., J Mol. Evol., 1999) 産生による局所的な基質石灰化調節、および、sclerostin 分泌による骨芽細胞の抑制(Winkler et al., EMBO Journal, 2003)を行うことが明らかにされている。骨細胞は細胞突起を骨基質内に張り巡らせて骨細管系を構築している。この骨細胞・骨細管系が規則的な幾何学配列を示すほど、内部応力の感知や骨代謝調節を含めた細胞機能が向上すると推測されている。このような骨細管系の配列は、骨改造現象に大きく依存することが知られている(Hirose et al., J Bone Miner Metab, 2007)。つまり、骨改造が緩やかで成熟した緻密骨では骨細胞・骨細管系が効率よく機能し、骨改造が活発に行われている幼弱骨では骨細胞・骨細管系の機能的効率性は低下するという。このような骨改造は、破骨細胞の骨吸収とその後の骨芽細胞による骨形成によって成し遂げられる。一方、破骨細胞の分化形成において、破骨細胞前駆細胞には receptor activator of nuclear factor κ B (RANK)が発現し、骨芽細胞系細胞にはそのリガンドである RANK ligand (RANKL)が発現しているが、破骨細胞前駆細胞と骨芽細胞系細胞とが cell-to-cell contact を行うことで、RANK/RANKL シグナルが伝達されて破骨細胞への分化ならびに骨吸収活性の亢進が誘導される (Kong et al., Nature 1999; Simonet et al., Cell 1997)。さて、この RANK/RANKL 作用において、オステオプロテジェリン(osteoprotegerin: OPG)は RANKL の decoy 受容体として機能するために、RANKシグナルを抑制する (Bucay et al., Genes & Develop, 1998; Mizuno et al., Biochem Biophys Res Commun. 1998)。従って、OPG 遺伝子欠損(OPG^{-/-})マウスでは、破骨細胞が亢進し、それに伴った骨芽細胞による骨形成も亢進することが知られている(Amizuka et al., J Electron Micro., 2003)。以上のことを踏まえて、本学位研究では OPG^{-/-}マウスの骨端部と皮質骨において、骨細胞・骨細管系の配列性がどのように変化しているか、また、骨細胞が産生する DMP-1 と sclerostin が高骨代謝回転の環境でどのような局在を示すかについて、組織化学的に検索した。

【材料と方法】 生後17週齢の野生型雄性マウスおよび OPG^{-/-}雄性マウス(各匹数 n=6)をアルデヒド固定し大腿骨を組織解析用サンプルとして摘出した。それらを 10%EDTA 水溶液にて3ヶ月間脱灰後、上昇エタノールにて脱水しパラフィン包埋した。組織化学解析としては、Bodian 変法による鍍銀染色ならびに、アゾ色素法による酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP)酵素組織化学、ならびに、アルカリフォスファターゼ(alkaline phosphatase: ALP)、DMP-1、sclerostin に対する抗体を用いた免疫組織化学を行った。組織化学染色はHRP 標識二次抗体または ALP 標識二次抗体を用いた間接法にて検索した。さらに、野生型マウスと OPG^{-/-}マウスの骨端部と皮質骨において ALP 陽性領域(骨芽細胞系細胞)ならびに TRAP 陽性領域(破骨細胞系細胞)の割合について統計解析を行った。さらに、同領域において DMP-1 陽性骨細胞数および sclerostin 陽性骨細胞数の割合を統計学的に評価した。

【結果および考察】 OPG^{-/-}マウスの骨端部には、野生型マウスに比べて多数の TRAP 陽性破骨細胞および厚い ALP 陽性骨芽細胞層が形成されていた。鍍銀染色を行うと、骨細胞・骨細管系は不規則な走行を示しており、一部、濃縮した核を有する骨細胞や空の骨小腔も観察された。一方、OPG^{-/-}マウスの皮質骨においても、野生型マウスに比べて多数の TRAP 陽性破骨細胞と ALP 陽性骨芽細胞が観察されたが、それら細胞群は皮質骨内部に局所的に侵入する傾向が認められた。鍍銀染色を行うと、皮質骨内部の骨細管系は規則的であり、TRAP 陽性破骨細胞および ALP 陽性骨芽細胞が侵入する部位周囲は不規則な細管分布が観察された。

以上の組織異常を踏まえた上で DMP-1 および sclerostin 免疫染色を行うと、OPG^{-/-}マウスの骨端部では、野生型マウスに比べて少数の骨細胞に DMP-1 陽性反応が観察された。過去の報告において、DMP-1 は骨細管系の規則性とは関係なく発現・産生されることが述べられているが(Ubaidus et al., J Electron Micro, 2009)、核濃縮を示す骨細胞や空の骨小腔の存在を考慮すると、OPG 欠損状態で著しく亢進した骨改造によって、骨細胞機能が障害を受け DMP-1 産生も低下したものと推測された。一方、OPG^{-/-}マウスの皮質骨においては、不規則な細管を示す骨細胞も含めてほとんどの細胞に DMP-1 陽性反応が認められた。

sclerostin 陽性反応は、OPG^{-/-}マウスの骨端部だけでなく規則的な骨細管系を示す皮質骨においても、わずかな骨細胞にしか観察されなかった。そこで、TRAP, ALP, sclerostin の三重染色を行うと、多くの骨芽細胞は ALP 陽性を示す細胞体のふくよかな活性型骨芽細胞を示しており、そのような活性型骨芽細胞周囲の骨細胞は sclerostin 陽性を示さなかった。一方、それらの骨芽細胞から離れた位置に局在する骨細胞は sclerostin 弱陽性反応を示すことが明らかとなった。

以上のことから、OPG 欠損状態において、骨端部と皮質骨の骨改造や骨細管系の変化は部位によって異なること、さらに、骨細胞から産生される DMP-1 は骨細管系の規則性に、また sclerostin 産生は周囲に存在する骨芽細胞によって大きく影響を受けると推測された。特に、従来、骨細胞から産生されて一方向性に骨芽細胞を抑制すると考えられている sclerostin については、骨表面の骨芽細胞が骨細胞の sclerostin 産生に影響を及ぼす機序も推察された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 浪 雅 光

副 査 教 授 網 塚 憲 生

副 査 教 授 土 門 卓 文

学 位 論 文 題 名

Immunolocalization of DMP1 and sclerostin in osteocytic lacunar canalicular system of osteoprotegerin deficient mice

(オステオプロテジェリン遺伝子欠損マウスの骨細胞・骨細管系における
DMP1と sclerostin の免疫局在)

審査は主査、副査全員が一同に会して口頭で行った。はじめに申請者に対し本論文の概要の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

【背景・目的】 骨細胞は、dentin matrix protein-1(DMP-1) 産生による局所的な基質石灰化調節、および、sclerostin 分泌による骨芽細胞の抑制を行うことが明らかにされている。このような骨細胞・骨細管系が規則的な幾何学配列を示すほど、骨代謝調節を含めた細胞機能が向上するが、それは骨改造現象に大きく依存することが知られている。一方、破骨細胞の分化形成において、破骨細胞前駆細胞には receptor activator of nuclear factor B (RANK)が発現し、骨芽細胞系細胞にはそのリガンドである RANK ligand (RANKL)が発現するが、破骨細胞前駆細胞と骨芽細胞系細胞とが cell-to-cell contact を行うことで、RANK/RANKL シグナルが伝達されて破骨細胞への分化ならびに骨吸収活性が亢進する。このような RANK/RANKL 作用において、オステオプロテジェリン (osteoprotegerin: OPG)は RANKL の decoy 受容体として機能するために、RANKシグナルを抑制する。従って、OPG 遺伝子欠損(OPG^{-/-})マウスでは、破骨細胞が亢進し、それに伴った骨芽細胞による骨形成も亢進することが知られている。以上から、本研究では OPG^{-/-}マウスの骨端部と皮質骨において、骨細胞が産生するDMP-1と sclerostin が高骨代謝回転の環境でどのような局在を示すかについて、組織化学的に検索した。

【材料と方法】 生後17週齢の野生型雄性マウスおよび OPG^{-/-}雄性マウス(各匹数 n=6)をアルデヒド固定し大腿骨を組織解析用サンプルとして摘出した。それらを10%EDTA水溶液にて3ヶ月間脱灰後、上昇エタノールにて脱水しパラフィン包埋した。組織化学解析としては、鍍銀染色、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP)酵素組織化学、ならびに、アルカリフォスファターゼ(alkaline phosphatase: ALP)、DMP-1、sclerostin の免疫組織化学を行った。さらに、

骨端部と皮質骨における ALP 陽性領域ならびに TRAP 陽性領域の割合、また、同領域における DMP-1 陽性骨細胞数および sclerostin 陽性骨細胞数の割合を統計学的に評価した。

【結果および考察】 OPG^{-/-}マウスの骨端部には、野生型マウスに比べて多数の TRAP 陽性破骨細胞および厚い ALP 陽性骨芽細胞層が形成されていた。鍍銀染色を行うと、骨細胞・骨細管系は不規則な走行を示しており、一部、濃縮した核を有する骨細胞や空の骨小腔も観察された。一方、OPG^{-/-}マウスの皮質骨においても、野生型マウスに比べて多数の TRAP 陽性破骨細胞と ALP 陽性骨芽細胞が観察されたが、それら細胞群は皮質骨内部に局所的に侵入する傾向が認められた。鍍銀染色を行うと、皮質骨内部の骨細管系は規則的であり、TRAP 陽性破骨細胞および ALP 陽性骨芽細胞が侵入する部位周囲は不規則な細管分布が観察された。OPG^{-/-}マウスの骨端部では、野生型マウスに比べて少数の骨細胞に DMP-1 陽性反応が観察された。一方、OPG^{-/-}マウスの皮質骨においては、不規則な細管を示す骨細胞も含めてほとんどの細胞に DMP-1 陽性反応が認められた。sclerostin 陽性反応は、OPG^{-/-}マウスの骨端部だけでなく規則的な骨細管系を示す皮質骨においても、わずかな骨細胞にしか観察されなかった。そこで、TRAP, ALP, sclerostin の三重染色を行うと、多くの骨芽細胞は ALP 陽性を示す細胞体のふくよかな活性型骨芽細胞を示しており、そのような活性型骨芽細胞周囲の骨細胞は sclerostin 陽性を示さなかった。一方、それらの骨芽細胞から離れた位置に局在する骨細胞は sclerostin 弱陽性反応を示すことが明らかとなった。

以上のことから、OPG 欠損状態において、骨端部と皮質骨の骨改造や骨細管系の変化は部位によって異なること、さらに、骨細胞から産生される DMP-1 は骨細管系の規則性に、また sclerostin 産生は周囲に存在する骨芽細胞によって大きく影響を受けると推測された。特に、骨細胞から産生される sclerostin については、骨表面の骨芽細胞が骨細胞の sclerostin 産生に影響を及ぼす機序も推察された。

引き続き審査担当者と申請者の間で、論文内容及び関連事項について質疑応答がなされた。主な質問事項として、

- (1) OPG 欠損状態の骨代謝回転について
- (2) FGF23 と血中リン濃度、ならびにそれに対する骨代謝回転について
- (2) 細胞突起を介した骨細胞と骨細胞、または骨芽細胞と骨細胞の情報伝達について
- (3) 鍍銀染色をあえて行った根拠ならびに長所・短所について
- (4) DMP-1 の石灰化に対する作用機序について
- (5) 高代謝回転状態における sclerostin 産生抑制に対して想定される機序について

などがあげられた。

これらの質問に対して申請者は適切な説明によって回答し、本研究の内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野についても十分な理解と学識を有していることが確認された。本研究は、骨基質内に細胞性ネットワークを形成し、基質ミネラルの調節・維持、さらには骨芽細胞の活性を調節することで骨改造に影響を及ぼす骨細胞・骨細管系の機能に対して、遺伝子欠損マウスを用いることで重要な知見を提供している。従って、本研究の内容は、歯科医学の発展に十分貢献するものであり、審査担当者全員は、学位申請者が博士(歯学)の学位を授与するのに値するものと認めた。