

学 位 論 文 題 名

Immunolocalization of sclerostin synthesized by
osteocytes in relation to bone remodeling in the
interradicular septa of ovariectomized rats

(卵巣摘出ラットの根間中隔歯槽骨における骨改造と
骨細胞産生蛋白スクレロスチンの局在に関する組織化学的解析)

学位論文内容の要旨

【背景および目的】

骨基質中の骨小腔に存在している骨細胞は、多数の細胞突起を伸ばしており、それら突起は骨細管を通して骨基質内に張り巡らされている。骨細胞の細胞突起は、骨細胞同士や骨表面に位置する骨芽細胞の突起と互いにギャップ結合で連絡することで、機能的細胞性ネットワーク、すなわち、骨細胞・骨細管系を形成している。骨細胞・骨細管系は生理的な骨改造に伴って、骨細胞の長軸が骨表面と平行に、また、骨細胞の突起が骨表面と垂直に終始するといった格子状の規則的配列を示すようになる。このような規則的配列を示す骨細胞・骨細管系こそが、効率的に機能する状態にあると考えられる。近年、骨細胞から産生されるタンパク質が注目されており、基質石灰化に関連する dentin matrix protein-1(DMP-1)と骨芽細胞を抑制することで骨改造に影響を与えるスクレロスチンなどがあげられる。これら因子の産生と骨細管系の規則性には関連性があり、特に、スクレロスチンは、成熟骨のように規則的配列を示す骨細管系から多量に産生されることが知られている。

歯科領域において、歯の生理的遠心移動を受けているラット下顎臼歯の根間中隔歯槽骨を観察すると、近心側では骨吸収を、遠心側では骨形成を認めることができる。歯槽骨におけるスクレロスチンは、このような骨吸収・骨形成に応じて骨細胞から産生されていると考えられる。さて、骨粗鬆症は骨吸収および骨形成の動的バランスが崩壊した代謝性疾患であり、骨細胞が産生するスクレロスチンと密接な関連性があるものと推測される。特に、閉経期骨粗鬆症はエストロゲン欠乏によって発症し、骨吸収亢進による骨量減少を示すが、同時に、歯槽骨や顎骨などの歯科領域においても影響を及ぼすことが報告されている。従って、骨粗鬆症の歯槽骨における骨吸収あるいは骨改造と骨細胞によるスクレロスチン産生の局在的関連性を明らかにすることは、歯科医学領域において意義があると思われる。

本研究では、ラット卵巣摘出によるエストロゲン欠乏状態における歯槽骨の骨改造と骨細胞によるスクレロスチン産生の関連性について、根間中隔歯槽骨の近心側に注目して組織化学的に検索した。

【材料と方法】

生後9週齢 Wister 系雌性ラットに卵巣摘出 (OVX 群) と偽手術 (Sham 群) を施し、4週後に下顎骨をアルデヒド固定後、通法にてパラフィン包埋を行った。観察部位として下顎第一臼歯の根間中隔歯槽骨を用い、臼歯の近・遠心根を通る面で組織切片を作製した。同切片上で、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、オステオポンチン、DMP-1、スクレロスチン、エストロゲン受容体 (ER α)、receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL)、TUNEL 組織化学、ならびに鍍銀染色を行った。

【結果と考察】

Sham 群の第一臼歯根間中隔歯槽骨の近心側には、TRAP 陽性破骨細胞が集積する傾向が認められたが、OVX 群では、より多数の TRAP 陽性破骨細胞が歯槽骨の近心側に局在していた。このことは、歯槽骨近心側の生理的な力に加えて、エストロゲン欠乏状態により多数の破骨細胞が出現したものと考えられる。さらに、OVX 群歯槽骨の近心側において、スクレロスチン陽性を示さない骨細胞が広範囲にわたって認められた。統計解析を行ったところ、OVX 群におけるスクレロスチン陰性骨細胞の分布範囲は Sham 群と比べて有意に高い値を示していた。一方、骨細胞が産生するもう一つの因子である DMP-1 は、Sham 群・OVX 群ともに均一な陽性反応を示しており、OVX によって DMP-1 局在は変化しないと考えられた。

このような OVX による歯槽骨近心側のスクレロスチン産生低下のメカニズムとして、エストロゲン欠乏が骨細胞に直接作用しスクレロスチン産生を低下させることで骨改造を活発にする可能性、あるいは、エストロゲン欠乏が破骨細胞形成を促進させて、それにより亢進した骨改造に応じてスクレロスチン産生が抑制される可能性の二つが考えられた。前者の可能性を解明するため、エストロゲン受容体 (ER α) の免疫染色を行ったところ、Sham 群・OVX 群ともに、歯槽骨の骨芽細胞、骨細胞および破骨細胞に局在し、両群に ER α 分布における違いを認めることはできなかった。さらに、エストロゲンとアポトーシスの関連性が示唆されていることから TUNEL 染色を行ったが、Sham 群・OVX 群の近心側・遠心側ともに TUNEL 陽性細胞数の割合に有意差は認められなかった。以上のことから、エストロゲン欠乏が直接、骨細胞に作用する可能性はそれほど高くないと推測された。次に、後者のメカニズムに関して検索を行うと、OVX 群では歯槽骨近心側に局在する多数の破骨細胞周囲に RANKL 強陽性反応および強 ALP 陽性反応が観察された。また、OVX 群の近心側では、多数の複雑な TRAP 陽性・オステオポンチン陽性セメントラインが広範囲にわたって認められるとともに、分断化された不規則な骨細胞・骨細管系が観察された。この結果は、スクレロスチンが規則的な骨細管系から産生されることを踏まえると、後者の可能性、すなわち、エストロゲン欠乏が破骨細胞形成を促進させて、それに伴った骨改造亢進に応じてスクレロスチン産生が抑制される可能性が高いと考えられた。

以上より、卵巣摘出後の根間中隔歯槽骨近心側では、スクレロスチン陽性骨細胞が広範囲に減少することが明らかにされた。そのメカニズムとしては、エストロゲン欠乏の骨細胞への直接作用ではなく、活発な骨改造によって骨細胞のスクレロスチン産生が抑制された可能性が高いと考えられた。また、このことは、歯槽骨領域において骨改造あるいはそれに参画する細胞群が骨細胞に作用することでスクレロスチン産生が制御されるシステムが存在することを示唆していると推測された。

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 sclerostin synthesized by
osteocytes in relation to bone remodeling in the
interradicular septa of ovariectomized rats

(卵巣摘出ラットの根間中隔歯槽骨における骨改造と
骨細胞産生蛋白スクレロスチンの局在に関する組織化学的解析)

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て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。

本研究では、ラット卵巣摘出によるエストロゲン欠乏状態における歯槽骨の骨改造と骨細胞によるスクレロスチン産生の関連性について、根間中隔歯槽骨の近心側に注目して組織化学的に検索した。

生後9週齢 Wister 系雌性ラットに卵巣摘出(OVX 群)と偽手術(Sham 群)を施し、4週後に下顎骨をアルデヒド固定後、通法にてパラフィン包埋を行った。観察部位として下顎第一臼歯の根間中隔歯槽骨を用い、臼歯の近・遠心根を通る面で組織切片を作製した。同切片上で、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、オステオポンチン、Dentin matrix protein-1 (DMP-1)、スクレロスチン、エストロゲン受容体(ER α)、receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL)、TUNEL 組織化学、ならびに鍍銀染色を行った。

Sham 群の第一臼歯根間中隔歯槽骨の近心側には、TRAP 陽性破骨細胞が集積する傾向が認められたが、OVX 群では、より多数の TRAP 陽性破骨細胞が歯槽骨の近心側に局在していた。このことは、歯槽骨近心側の生理的な力に加えて、エストロゲン欠乏状態により多数の破骨細胞が出現したものと考えられる。さらに、OVX 群歯槽骨の近心側において、スクレロスチン陽性を示さない骨細胞が広範囲にわたって認められた。統計解析を行ったところ、OVX 群におけるスクレロスチン陰性骨細胞の分布範囲は Sham 群と比べて有意に高い値を示していた。一方、骨細胞が産生する

もう一つの因子である DMP-1 は、Sham 群・OVX 群ともに均一な陽性反応を示しており、OVX によって DMP-1 局在は変化しないと考えられた。

このような OVX による歯槽骨近心側のスクレロスチン産生低下のメカニズムとして、エストロゲン欠乏が骨細胞に直接作用してスクレロスチン産生を低下させることで骨改造を活発にする可能性、あるいは、エストロゲン欠乏が破骨細胞形成を促進させて、それにより亢進した骨改造に応じてスクレロスチン産生が抑制される可能性の二つが考えられた。前者の可能性を解明するため、エストロゲン受容体($ER\alpha$)の免疫染色を行ったところ、Sham 群・OVX 群ともに、歯槽骨の骨芽細胞、骨細胞および破骨細胞に局在し、両群に $ER\alpha$ 分布における違いを認めることはできなかった。さらに、エストロゲンとアポトーシスの関連性が示唆されていることから TUNEL 染色を行ったが、Sham 群・OVX 群の近心側・遠心側ともに TUNEL 陽性細胞数の割合に有意差は認められなかった。以上のことから、エストロゲン欠乏が直接、骨細胞に作用する可能性はそれほど高くないと推測された。次に、後者のメカニズムに関して検索を行うと、OVX 群では歯槽骨近心側に局在する多数の破骨細胞周囲に RANKL 強陽性反応および強 ALP 陽性反応が観察された。また、OVX 群の近心側では、多数の複雑な TRAP 陽性・オステオポンチン陽性セメントラインが広範囲にわたって認められるとともに、分断化された不規則な骨細胞・骨細管系が観察された。この結果は、スクレロスチンが規則的な骨細管系から産生されることを踏まえると、後者の可能性、すなわち、エストロゲン欠乏が破骨細胞形成を促進させて、それに伴った骨改造亢進に応じてスクレロスチン産生が抑制される可能性が高いと考えられた。

以上より、卵巣摘出後の根間中隔歯槽骨近心側では、スクレロスチン陽性骨細胞が広範囲に減少することが明らかにされた。そのメカニズムとしては、エストロゲン欠乏の骨細胞への直接作用ではなく、活発な骨改造によって骨細胞のスクレロスチン産生が抑制された可能性が考えられた。また、このことは、歯槽骨領域において骨改造あるいはそれに参加する細胞群が骨細胞に作用することでスクレロスチン産生が制御されるシステムが存在することを示唆していると推測された。

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。主な質問事項は、

- (1) 鍍銀染色の標本の作り方および $ER\alpha$ 免疫染色における抗原賦活について
- (2) 卵巣摘出の手術方法について
- (3) スクレロスチンの細胞学的作用について
- (4) Sham 群と OVX 群歯槽骨の遠心側におけるスクレロスチン陽性骨細胞の割合について
- (5) Sham 群と OVX 群歯槽骨の近心面から 120 μ m 以上の内部領域におけるスクレロスチン陽性骨細胞の割合が変化していない理由について

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。本研究は卵巣摘出ラットの根間中隔歯槽骨における骨改造と骨細胞産生蛋白スクレロスチンの局在に関する組織化学的解析をしたことが高く評価された。本研究の内容は、歯科医学の発展に十分に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）の学位を授与するに値するものと認めた。