

学位論文題名

サーモンカルシトニンがメダカ破骨細胞に及ぼす影響

学位論文内容の要旨

緒言

破骨細胞は骨吸収に関与する多核の巨細胞であり、骨上の吸収窩に面する部分に光学顕微鏡観察で刷子縁、透過型電子顕微鏡観察で波状縁と呼ばれる構造を有し、骨基質を溶解する。哺乳類ではカルシトニン（calcitonin : CT）は破骨細胞に直接作用するホルモンとして知られている。CT は破骨細胞のカルシトニン受容体に結合してその波状縁を消失させる結果、破骨細胞が骨表面から離れるため、骨吸収抑制作用を示す。脊椎動物の系統発生を考えた場合、CT はすべての脊椎動物に存在し、その作用は様々に報告されているが、哺乳類以外の CT の役割はよく分かっていない。脊椎動物の系統発生において、骨と破骨細胞が出現するのは硬骨魚類からであるため、硬骨魚類で CT が破骨細胞に及ぼす影響を調べることは、脊椎動物における CT の役割を考える上で重要である。このためには硬骨魚類の骨組織より破骨細胞を分離し、培養下で直接 CT を作用させ、哺乳類の破骨細胞における CT の効果と比較することが必要だが、硬骨魚類の破骨細胞を分離培養した報告はない。本研究はメダカ咽頭骨の破骨細胞を分離培養する実験系を確立し、咽頭骨の器官培養の実験系と併用し、サーモンカルシトニン（salmon calcitonin : sCT）がメダカ破骨細胞に及ぼす影響を形態学的に明らかにすることを目的とする。

材料と方法

1) 実験動物

メダカ成魚を MS222 により麻酔し、断頭後、頭部を試料とした。

2) 分離培養

試料より採取した咽頭骨は、洗浄後、Leibovitz's L-15培地中で、機械的に破骨細胞を分離した。細胞は Chamber Slide 中に培地とともに播種し、24時間培養後、濃度が 10^{-6} g/ml \sim 10^{-10} g/mlの5段階になるように、sCT を添加し、1または3時間、室温、大気中で培養して実験群とした。sCT を培地中に添加しないものを対照群とした。培養後、細胞を浸漬固定し、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 活性反応を検出後、光学顕微鏡にて観察を行った。

3) 器官培養

試料より採取した咽頭骨は、洗浄後、Chamber Slide 中に置き、培地中で濃度が 10^{-6} g/ml \sim 10^{-10} g/mlの5段階になるように sCT を添加し、1または3時間、室温、大気中で培養し、実験群とした。sCT を培地中に添加しないものを対照群とした。培養終了後、試料は浸漬固定し、脱灰した。試料は Epon に包埋した後、 $0.5\mu\text{m}$ の準超薄切片を作製し、トルイジンブルー染色後、光学顕微鏡で観察した。

結果

1) 分離培養

1時間の培養の対照群において、TRAP 活性陽性反応を示す細胞は細胞外形が円形もしくは楕円形を示し、細胞質突起を伸長している像が多数観察された。実験群では、いずれの sCT の濃度でも TRAP 活性陽性反応を示す細胞は対照群の細胞と細胞外形に差異は認められなかった。咽頭骨より分離された咽頭歯に複数の TRAP 活性陽性反応を示す細胞が接する所見も観察された。3時間の培養の対照群においても、TRAP 活性陽性反応を示す細胞は細胞外形が円形もしくは楕円形を示し、細胞質突起を伸長している像が多数観察された。実験群では、いずれの sCT の濃度でも対照群の細胞と細胞外形に差異は認められなかった。sCT の作用時間においては、1時間と3時間では対照群、実験群ともに TRAP 活性陽性細胞の大きさと細胞外形に差異は認められなかった。

2) 器官培養

1時間培養の対照群において、破骨細胞は咽頭骨上で多核の巨細胞として観察され、骨表面に刷子縁により吸収窩を形成していた。実験群では、添加した sCT の濃度に関わらず、対照群と同様に破骨細胞は咽頭骨表面に刷子縁により吸収窩を形成する多核の巨細胞として観察され、骨表面から離れて存在する破

骨細胞は認められなかった。3時間培養の対照群、実験群でも1時間培養のものと同様の所見を示していた。また、sCTの作用時間においては1時間と3時間では破骨細胞の形態に著しい差は認められなかった。

考察

硬骨魚類のsCTの作用に関して、これまでに幾つかの研究があり、sCT投与による骨代謝や、破骨細胞の骨吸収能への影響は様々に報告されている。この理由の一つとして、これまでに報告されている実験系は鱗の器官培養や、生体内の血清カルシウム濃度や骨吸収面積の検索であり、生体内の他の細胞や因子が結果に影響を与えている可能性が考えられる。生体内に存在する細胞を分離し、培養する方法は特定の細胞を観察するためには有効で、生体内の影響を受けることなく、外部から与えられた刺激に対する細胞の挙動および形態の変化を観察できることが利点である。

本研究は初めて硬骨魚類の骨組織から破骨細胞を分離培養した報告であり、この非常に簡便な実験系を用いて、CTがメダカ破骨細胞に及ぼす影響について形態学的に検索した。この実験系の結果はsCTがメダカの破骨細胞の細胞外形の変化に影響を及ぼさないことを示している。また、器官培養における結果は、sCTがメダカの破骨細胞の骨吸収を抑制していないことを示している。以上のことから、本研究における破骨細胞の分離培養と器官培養の結果は、sCTはメダカ破骨細胞に対して骨吸収抑制の作用を示さないことを示唆している。

硬骨魚類の鰓にはCT受容体が存在し、CTは鰓を介する水中からのカルシウム取り込みの調節に関与していることが報告されている。メダカにおけるCT受容体の局在に関する報告はないが、ゼブラフィッシュではCT受容体は脳、脾臓、鰓、腸管、腎臓そして皮膚に局在するという報告があることから、メダカのCT受容体も鰓に存在し、CTは鰓を介するカルシウム取り込みの調節に関与している可能性が考えられる。

硬骨魚類の破骨細胞におけるCT受容体の局在を検索した報告はないため、メダカの破骨細胞にもCT受容体が存在しない可能性も考えられる。以上のことから、sCTがメダカ破骨細胞に対して骨吸収抑制の作用を示さないことの一理由の一つとして、硬骨魚類のメダカにおけるCTの役割は、哺乳類のそれとは異なり、破骨細胞による骨吸収を抑制することではない可能性が考えられる。硬骨魚類には脊椎動物の進化の過程で初めて骨と破骨細胞が出現するため、この

種に出現する破骨細胞は系統発生的に原始的な特徴を有している可能性が考えられ、哺乳類の破骨細胞が有する CT による骨吸収抑制作用を持たないことが硬骨魚類の破骨細胞の特徴の一つである可能性が考えられる。

結論

sCT はメダカ破骨細胞に対して骨吸収抑制作用を示さないことが示唆された。その理由の一つとして、硬骨魚類におけるメダカにおける CT の役割は、哺乳類のそれとは異なり、破骨細胞による骨吸収抑制の作用ではない可能性が考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 土 門 卓 文
副 査 教 授 網 塚 憲 生
副 査 特任准教授 野 谷 健 治

学位論文題名

サーモンカルシトニンがメダカ破骨細胞に及ぼす影響

審査は審査担当者全員出席の下、学位申請者から研究内容の説明がなされ、関連事項について口頭試問が行われた。

はじめに、学位申請者より学位申請論文はサーモンカルシトニン (salmon calcitonin : sCT) がメダカ破骨細胞に及ぼす影響を形態学的に明らかにすることを目的として行われたことが述べられた。ついで研究の背景、方法、結果、考察、結論について以下のような説明が行われた。

破骨細胞は多核の巨細胞で、光学顕微鏡観察で刷子縁と呼ばれる構造を有し、骨基質を溶解する細胞である。カルシトニン (calcitonin : CT) は哺乳類では、破骨細胞のカルシトニン受容体に結合し、刷子縁を消失させるため、破骨細胞は骨表面から離れ、骨吸収は抑制される。脊椎動物では、哺乳類以外でのCTの役割はよく分かっていない。硬骨魚類におけるCTの破骨細胞への影響を調べることは、脊椎動物におけるCTの役割を考える上で重要であるが、硬骨魚類の破骨細胞を分離培養した報告はない。本研究はメダカ咽頭骨の破骨細胞を分離培養する実験系を確立し、咽頭骨の器官培養と併用し、sCTがメダカ破骨細胞に及ぼす影響を形態学的に明らかにすることを目的とし、以下の方法で行われた。

メダカ成魚を MS222 により麻酔し、断頭後、頭部を試料とした。

分離培養は、メダカの咽頭骨より機械的に分離した破骨細胞をLeibovitz' s L-15 培地で24時間培養し、sCTを 10^{-6} ~ 10^{-10} g/mlの濃度で1または3時間培養液に添加し実験群とした。細胞を固定後、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色し、光学顕微鏡で観察した。

器官培養はsCTを上記と同様の濃度・時間で添加した培地中で咽頭骨を器官培養したものを実験群とした。その後、試料を固定、脱灰、エポン包埋後、準超薄切片を作製し光学顕微鏡で観察した。分離・器官培養ともにsCTを添加しないものを対照群とした。

実験の結果、分離培養した対照群の破骨細胞はほぼ円形の細胞外形を有し、TRAP陽性を示した。実験群の破骨細胞ではsCTの濃度・作用時間に影響されることなく、対照群と同様の細胞外形を示し、TRAP陽性であった。器官培養の対照群の破骨細胞は刷子縁を持ち、骨に吸収窩を形成していた。実験群の破骨細胞はsCTの濃度・作用時間に影響されることなく、対照群と同様に刷子縁を持ち、骨に吸収窩を形成していた。

以上の結果は、sCTがメダカの破骨細胞の細胞外形の変化に影響を及ぼさないことと、sCTがメダカの破骨細胞の骨吸収を抑制しないことを示している。この理由として、哺乳類では、破骨細胞にCT受容体が存在し、CTは直接破骨細胞に作用して骨吸収を抑制することから、硬骨魚類にはCT受容体が存在しない可能性が考えられた。また、硬骨魚類の鰓にはCT受容体が存在し、CTは鰓を介する水中からのカルシウム取り込みの調節にCTが関与することが報告されていることから、同様に、メダカのCT受容体も鰓に存在し、CTは鰓を介するカルシウム取り込みの調節に関与している可能性が考えられる。

以上のことから本論文の結論として、sCTはメダカ破骨細胞に対して骨吸収抑制作用を示さないことが示唆された。

以上の説明に引き続き、各審査担当者より、本研究の背景、方法、結果、考察および関連の研究について質問がなされた。主な質問内容は以下の通りであった。

- 1) sCT を用いた理由について。
- 2) 破骨細胞とメカニカルストレスとの関係について。
- 3) 破骨細胞の鰓における CT の役割について。
- 4) 哺乳類と魚類の CT のアミノ酸配列の相同性について。
- 5) 両性類の破骨細胞における CT 受容体の存在について。

これらの質問に対して、学位申請者から明快な回答と説明が得られ、さらに今後の研究についても発展的な将来展望を示した。

以上のことから審査担当者は、本研究は今後のこの分野の研究の発展に大きく寄与するものと判断した。

学位申請者は、本研究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学識を有していることを審査担当者一同が認めた。よって、審査担当者一同は学位申請者は北海道大学博士（歯学）の学位を授与される資格があるものと認めた。