



Title	Immunocytochemical assessment of cell differentiation of podoplanin-positive osteoblasts into osteocytes in murine bone [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	永井, 伯弥
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第13474号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/74006
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Tomoya_Nagai_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 永井 伯弥

審査担当者 主査 教授 横山 敦郎
副査 教授 網塚 憲生
副査 教授 土門 卓文
副査 助教 長谷川智香

学位論文題名

Immunocytochemical assessment of cell differentiation of podoplanin-positive osteoblasts into osteocytes in murine bone

(podoplanin 陽性骨芽細胞および骨細胞における組織化学的検索)

審査は、主査、副査が一堂に会し、論文提出者が論文内容の要旨を説明しながら、その内容について審査担当者が口頭試問を行う形で進められた。以下に論文内容と審査の要旨を述べる。

骨細胞は、骨芽細胞が骨基質中に埋め込まれることで分化し、周囲の骨細胞または骨芽細胞と細胞突起を介した細胞性ネットワークを形成している。成熟骨における骨細胞は幾何学的に規則正しい配列を示すが、それは骨芽細胞から骨細胞への分化において時間的・空間的規則性を有するためと推測される。このことは、骨芽細胞が偶発的に基質に埋め込まれて骨細胞に分化するのではなく、骨細胞への分化において何らかの調節メカニズムが存在する可能性を示唆していると推察される。そこで本研究では、生後 8 週齢の ICR マウス大腿骨を用いて podoplanin、CD44、TNALPase、ERM family の 1 つであるリン酸化 ezrin の免疫組織化学、TRAP 酵素組織化学を光学顕微鏡または誘導放出制御 (stimulated emission depletion: STED) 顕微鏡で観察した。また、podoplanin の微細局在については pre-embedding 法にて免疫電顕観察を行った。さらに、生後 1 週齢マウスから頭蓋骨を取り出して器官培養を行い、CD44 を添加した実験群と無添加の対象群における Podoplanin、Ezrin、Gapdh 遺伝子の発現を RT-PCR にて、また、リン酸化 ezrin 蛋白の発現を immunoblotting にて解析した。

大腿骨骨幹端における光顕観察では、いくつかの TNALPase 陽性骨芽細胞が podoplanin 陽性反応を示した。同部位を免疫電顕観察すると、podoplanin 陽性反応は骨芽細胞の細胞膜および骨基質に埋め込まれたばかりの骨細胞の細胞膜、および、一部の骨芽細胞や骨細胞の細胞突起に一致して局在していた。従って、podoplanin は、骨細胞に分化しつつある骨芽細胞、あるいは、分化したばかりの骨細胞の細胞膜に局在するものと推測された。次に、podoplanin およびアクチンフィラメントの二重染色を施して STED 観察を行ったところ、podoplanin 陽性骨芽細胞におけるアクチンフィラメントは、細胞膜周囲や細胞突起の基部に

集積しており、その分布パターンは骨細胞に類似していた。従って、podoplanin は骨芽細胞内のアクチンフィラメントの分布パターンを骨芽細胞型から骨細胞型へと再構築させると推測された。

アクチンフィラメントの細胞内再構築において podoplanin/CD44 相互作用の可能性、ならびに、破骨細胞が CD44 陽性を示すことを踏まえて、皮質骨骨髓側（モデリング部位）と骨幹端骨梁（骨リモデリング部位）において、CD44 陽性細胞と podoplanin 陽性骨芽細胞・骨細胞との局在を検索した。皮質骨骨髓側では、podoplanin 陽性骨芽細胞が骨表面に一定間隔で局在していたが、CD44 陽性細胞との細胞間接触像は観察されなかった。しかし、これらの細胞膜周囲にはリン酸化 ezrin の発現が認められたことから、皮質骨骨髓側では、骨細胞への分化における podoplanin シグナルは CD44 以外の要因によって増強される可能性が推察された。一方、骨幹端骨梁では、CD44 陽性/TRAP 陽性破骨細胞が podoplanin 陽性骨芽細胞にしばしば接触または近接しており、それら骨芽細胞はリン酸化 ezrin 陽性を示したが、CD44 陽性/TRAP 陽性破骨細胞はリン酸化 ezrin の陽性反応を示さなかった。従って、骨幹端骨梁では、podoplanin 陽性骨芽細胞は、CD44 陽性破骨細胞との接触を介して骨細胞への分化における podoplanin シグナルを増強させる可能性が推察された。さらに、器官培養実験で CD44 添加または非添加頭蓋骨における *Podoplanin*、*Ezrin*、*Gapdh* 遺伝子の発現を解析したところ、これらの発現量に大きな差は認められなかったが、リン酸化 ezrin 蛋白は CD44 添加群のほうが高値を示した。よって、CD44 は ezrin リン酸化を促進すると推測された。

以上のことから、骨基質に埋め込まれつつある骨芽細胞、あるいは、埋め込まれたばかりの骨細胞は podoplanin を細胞膜上に発現し、ERM family の 1 つである ezrin のリン酸化を介して細胞内アクチンフィラメントの局在を再構築する可能性が推察された。また、骨リモデリング部位では CD44 陽性破骨細胞が骨細胞分化における podoplanin 作用を増強する可能性、一方で、モデリング部位の骨細胞分化においては、CD44-podoplanin 以外の機序が存在する可能性が推測された。

上記の論文内容及び関連事項について、以下の項目を中心に質疑応答がなされた。

1. podoplanin と CD44 間のシグナル伝達について
2. 本研究におけるチュブリンの細胞内局在の変化について
3. podoplanin 陽性反応を示す骨細胞の分布および骨表面からの深さについて
4. ERM のリン酸化以外の CD44 シグナル伝達について
5. 前骨芽細胞における podoplanin の発現について
6. PTH を添加した場合の podoplanin の発現と局在性について
7. podoplanin を発現させる因子について

これらの質問に対して、学位申請者から明快な説明と回答が得られたとともに、今後の研究に対する展望が示された。

学位申請者は、骨芽細胞から骨細胞への分化の機序を形態学的に解析し、その過程において podoplanin による細胞内アクチンフィラメントの再構築が生じることを微細構造学的・組織化学的に解明したことから、その内容が高く評価された。よって学位申請者は博士(歯学)の学位授与に値するものと判定した。