



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Morphological assessment of bone mineralization in tibial metaphyses of ascorbic acid-deficient ODS rats. [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	長谷川, 智香
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11260号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56219
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tomoka_Hasegawa_review.pdf, 審査の要旨



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 長谷川 智香

主査 教授 網 塚 憲 生
審査担当者 副査 教授 鈴 木 邦 明
副査 教授 土 門 卓 文

学 位 論 文 題 名

Morphological assessment of bone mineralization in tibial metaphyses of ascorbic acid-deficient ODS rats.

(アスコルビン酸合成能欠如(ODS)ラットの骨組織石灰化における組織学的解析)

コラーゲン線維は、全身の器官に存在するタンパク質であり、細胞外基質の構成要素の一つである。骨組織では、骨芽細胞から合成・分泌されたコラーゲン線維は、骨基質石灰化の場として機能する。骨基質石灰化は、基質小胞性石灰化とコラーゲン性石灰化の2つに区別されており、骨芽細胞が基質小胞と骨基質蛋白を分泌することによって開始する。骨芽細胞から分泌された基質小胞の内部では、リン酸カルシウムの核形成が誘導され(基質小胞性石灰化)、それが石灰化球と呼ばれる針状結晶塊へと成長してゆく。その後、発達した石灰化球がコラーゲン線維に沿って石灰化し、コラーゲン性石灰化が進行する。現在、コラーゲン性石灰化の機序として、コラーゲン線維の重合化に伴い形成される hole zone 内における石灰化結晶の核形成(hole zone theory)、あるいは、コラーゲン細線維が構成するスーパーヘリックスを足場とする石灰化などが提唱されているが、今のところ定説は無い。

一方、コラーゲン線維の合成過程においてアスコルビン酸が必須であるため、アスコルビン酸合成能欠如(ODS/ShiJcl-od/od)ラットは hole zone を有する成熟型コラーゲン線維を合成することができず、コラーゲン性石灰化の機序を探る良いモデル動物と考えられる。そこで、本研究では ODS/ShiJcl-od/od ラットの骨基質石灰化異常を微細構造学的に解析した。

8 週齢 ODS/ShiJcl-od/od 系雄性ラット 14 匹を、アスコルビン酸を充足させた飲料水を与えた充足群(アスコルビン酸 200mg/dl を添加)7 匹とアスコルビン酸が不足した飲料水を与えた不足群(0.3mg/dl)7 匹に分け、自由飲水・飲食下で 5 週間飼育した。また、カルセイン溶液によるラベリングを行った。13週齢で、通法にて固定し、脛骨の脱灰パラフィン切片、脱灰・未脱灰エポキシ樹脂切片ならびに未脱灰メチルメタクリレート切片を作製した。これらの切片を用いて、H-E 染色、von Kossa 染色、アルカリホスファターゼ(ALP)、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)、PCNA、オステオポンチン、オステオカルシン免疫染色、骨形態計測ならびに透過型電子顕微鏡観察を行った。

アスコルビン酸不足群ラットの脛骨骨幹端では、アスコルビン酸充足群ラットと比較して、一次骨梁が著しく減少していた。一次骨梁の周囲には、ALP 陽性反応を示す骨芽細胞系細胞が厚い細胞層を形成し、その中に多数の TRAP 陽性破骨細胞が認められた。これらの ALP 陽性骨芽細胞系細胞は線維芽細胞様の形態を呈していた。このような細胞はオステオポンチン・オステオカルシン陽性を示す骨基質とはほぼ接しておらず、骨表面から離れて局在していた。また、細胞内部には

拡張した粗面小胞体が多数認められ、細胞周囲には羽毛状を呈する未熟なコラーゲン線維を含む有機性の不定形構造物が局在していた。

骨基質合成・石灰化に着目して観察すると、アスコルビン酸充足群では一次骨梁の軟骨コア周囲に多数の骨基質が添加されており、カルセインの二重ラベリングが認められるのに対し、アスコルビン酸不足群の軟骨コア周囲には骨基質はほとんど添加されておらず、カルセインの二重ラベリングはほとんど認められなかった。不足群の軟骨コアにわずかに添加された骨基質の微細構造を、透過型電子顕微鏡を用いて観察すると、羽毛状で縞模様を示さない重合が未熟なコラーゲン線維が認められた。一方、透過型電子顕微鏡下、ならびに石灰化を検出する von Kossa 染色において、アスコルビン酸充足群・不足群ともに骨幹端の類骨層に基質小胞や石灰化球が観察されたことから、アスコルビン酸が不足した状態においても骨芽細胞は基質小胞性石灰化を行うと考えられた。さらに、同部位を電子顕微鏡観察すると、充足群では石灰化球より伸びる針状の石灰化結晶塊がコラーゲン線維の長軸方向に沿って伸長する像が観察された。また、これらの微細な石灰化結晶は、コラーゲン線維のスーパーヘリックスの長さに一致して平行に局在しており、hole zone から微細結晶が石灰化結晶を成長させてゆく像は認めることができなかった。一方、不足群の石灰化球より伸びる針状の石灰化結晶塊は、微細な線維状のコラーゲン線維に沿って伸長・配列していた。

以上のことより、アスコルビン酸の不足は骨芽細胞による成熟型コラーゲン線維の合成を抑制し、さらに骨芽細胞と骨基質との接着機構にも影響を及ぼすことが推測された。一方で、骨芽細胞による基質小胞形成には大きな影響を及ぼさないこと、また幼弱なコラーゲン線維でも石灰化の足場として機能する可能性が強く示唆された。

現在、コラーゲン性石灰化の機序として知られている hole zone theory では、コラーゲン線維の hole zone に局在するデコリンやバイグリカンなどのプロテオグリカンが除去されることで、これらの間隙にリン酸カルシウム結晶の核形成が生じ、石灰化が開始するとされている。アスコルビン酸不足群のラットでは、hole zone を有さない未熟なコラーゲン線維しか形成されないにも関わらず、このような未熟なコラーゲン線維を足場として石灰化が進行していたことから、hole zone theory の意義を再検討する必要があると考えられた。

引き続き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) ODS/ShiJcl-od/od ラットがアスコルビン酸を合成できないメカニズムについて
- (2) 基質小胞内部におけるリン酸カルシウム結晶形成のメカニズムについて
- (3) 石灰化におけるコラーゲン線維の役割について(他の細胞外基質とコラーゲン線維との比較)
- (4) 試料作製方法の違いが及ぼす透過型電子顕微鏡像への影響について
- (5) アスコルビン酸不足が骨芽細胞や全身の組織に及ぼす作用について
- (6) 骨芽細胞系細胞におけるアルカリフォスファターゼの局在の違いと石灰化における関連性について

この結果は、全身性疾患における歯科医学・歯科治療を鑑みたときに、重要な基礎科学的情報を提供しており、学術的にも高く評価されたと考えられた。加えて、上記の質疑応答から、申請者は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。

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。