HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Osteoblastic function is relatively activated in c-src deficient adult mice but not in c-fos deficient mice [an abstract of entire text]
Author(s)	虎谷, 彌
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11719号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59163
Type	doctoral thesis
File Information	Hisashi_Toraya_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要約

学位論文題目

Osteoblastic function is relatively activated in *c-src* deficient adult mice but not in *c-fos* deficient mice
（骨芽細胞の機能は、*c-fos* 遺伝子欠損マウスではなく *c-src* 遺伝子欠損マウスで活性化される）

博士の専攻分野名称　　博士（歯学）　　氏名　虎谷　彌

【緒言】

骨組織では、古い骨が絶えず新しい骨へと置き換わるといった骨改造、すなわち、骨リモデリングが行われている。骨リモデリングは、破骨細胞が古い骨基質を吸収した部位に骨芽細胞が新たに骨基質を合成・添加してゆく現象である。健常人における骨リモデリングでは、破骨細胞の骨吸収と引き続き起こる骨芽細胞の骨形成の間にバランスが取れており、それは、破骨細胞と骨芽細胞の細胞学的カップリングに依存すると考えられる。つまり、破骨細胞は、骨吸収に見合った骨芽細胞の活性化を誘導すると考えられ、例えば、破骨細胞が抑制されると骨芽細胞の活性も低下してしまう。破骨細胞と骨芽細胞のカップリングの機序として、破骨細胞の骨吸収によって骨基質から放出されたカップリング因子が周囲の骨芽細胞を活性化する説（Hayden 1995、Erlebacher 1998）、あるいは、破骨細胞の膜に組み込まれたカップリング因子が骨芽細胞に対して作用する説などが提唱されてきたが、その詳細は未だに明らかにされていない。特に、後者の場合は、破骨細胞が骨吸収を行っていなくとも、骨芽細胞へのカップリングが成立することになる。そこで、本研究では、破骨細胞の存在または骨吸収作用のどちらが骨芽細胞へのカップリングに重要かを明らかにする目的で、破骨細胞が形成されない *c-fos* 遺伝子欠損(*c-fos*$^{-/-}$)マウス、ならびに、破骨細胞は存在するが波状縁が形成されず骨吸収が起こらない *c-src* 遺伝子欠損(*c-src*$^{-/-}$)マウスの大腿骨を組織化学的・微細構造学的に解析した。

【材料と方法】

生後12週齢の *c-fos*$^{-/-}$マウスと *c-src*$^{-/-}$マウスを、ジエチルエーテルおよびペントバルビタール麻酔下で、4%パラホルムアルデヒド溶液による灌流固定を行った。その後、大腿骨を摘出し、通法に従いパラフィンおよびエポキシ樹脂に包埋した。これらの切片上で、H-E 染色のほか、アルカリフォスファターゼ(ALPase)、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAPase)、オステオポンチン、EphB4、ephrinB2, von Kossa 染色の組織化学を行った。さらに、脱灰および未脱灰超薄切片を用いた透過型電子顕微鏡観察、ならびに、オステオポンチンの pre-embedding 法による免疫電顕観察を行った。

【結果と考察】

c-fos$^{-/-}$マウスと *c-src*$^{-/-}$マウスの大腿骨は、野生型マウスとは異なり、骨髄腔の領域が多数の骨梁で満たされた骨硬化症の組織像を示した。*c-fos*$^{-/-}$マウスには、TRAPase 陽性破骨細胞が存在せず、弱い ALPase 陽性反応を示す若干数の骨芽細胞しか観察されなかった。一方、*c-src*$^{-/-}$マウスには、多数の TRAPase 陽性破骨細胞が観察されたが、それらは波状縁や明帯を有せず、また、石灰化基質の取り込みを示さなかった。従って、*c-src*$^{-/-}$マウスの破骨細胞は骨吸収を行わないことが強く示唆された。一方、*c-src*$^{-/-}$マウスの骨基質表面には、多数の ALPase 強陽性骨芽細胞が局在しており、それら細胞は豊富な粗面小胞体やゴルジ体を有することから、活性型骨芽細胞と考えられた。

c-src$^{-/-}$マウスの破骨細胞は、波状縁による骨吸収を行わないが、直下の骨基質に向かってオステオポンチンを分泌することが免疫電顕にて示唆された。また、TRAPase 陽性かつオステオポンチン陽性セメントラインが骨表面と平行に層を形成していたことから、*c-src*$^{-/-}$マウスの破骨細胞は、

波状縁が存在せず骨吸収を営むことができなくとも、TRAPase やオステオポンチンなどを分泌しながら骨基質表面を移動することが考えられた。また、セメントラインが層状に形成されていたことから、破骨細胞が通り過ぎた部位に活性型骨芽細胞が骨基質を添加することが繰り返された可能性が強く示唆された。

そこで、*c-src*$^{-/-}$マウスを透過型電子顕微鏡観察すると、破骨細胞の隣には活性型骨芽細胞が局在し、それら骨芽細胞直下には、石灰化球を含む類骨層が観察された。さらに、破骨細胞と骨芽細胞とは互いに細胞突起を介した細胞間接触を行っている像も認められた。そこで、カップリング因子の候補の一つであるEphB4/ephrin B2を検索すると、骨芽細胞はEphB4を、また、破骨細胞は ephrinB2 陽性反応を示した。

以上のことから、骨リモデリングの場では、破骨細胞の骨吸収によって骨基質内から放出される物質が骨芽細胞に作用するのではなく、破骨細胞と骨芽細胞の細胞間接触が骨芽細胞の活性化に重要であると推測された。つまり、骨芽細胞と破骨細胞とのカップリングには破骨細胞の骨吸収作用ではなく、存在そのものが重要であると考えられる。また、カップリング因子は骨基質内に存在するという考え方が提唱されてきたが、我々の検索では、破骨細胞の膜上、あるいは、ごく近傍に分泌される可能性が高いことが推察される。しかし、カップリング因子については、果たして1つだけなのか、あるいは複数の因子が複雑に関与しているのか、今後の研究に期待が寄せられる。

【結語】

骨芽細胞と破骨細胞とのカップリングには破骨細胞の骨吸収作用ではなく、存在そのものが重要であると推察された。