



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Ultrastructural examination on bone matrix surrounding osteocytes in PTH-administered mice [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	本郷, 裕美
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12157号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62176
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiromi_Hongo_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 本郷 裕美

学位論文題名

Ultrastructural examination on bone matrix surrounding osteocytes in PTH-administered mice.
(副甲状腺ホルモン投与によって誘導される骨細胞周囲の骨基質の微細構造学的変化について)

【背景と目的】 骨細胞は、骨芽細胞が自ら産生した骨基質中に埋め込まれた細胞であり、骨基質中の骨小腔という空間に存在している。骨細胞は、細胞突起を伸ばし骨細胞同士や骨表面に位置する骨芽細胞と互いにギャップ結合で連絡することで、骨基質中に無数に張り巡らされた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。しかし、骨細胞・骨細管系は骨の部位によって、その配列・分布が異なる。例えば、骨幹端の骨梁の骨細胞は形が丸く、配列が不規則であるのに対し、皮質骨の骨細胞は扁平な紡錘形を呈し、骨表面に対して平行に配列している。つまり、骨細胞・骨細管系は、骨幹端の骨梁よりも成熟骨である皮質骨において規則的に配列しており、両部位における骨細胞の機能は若干異なることが考えられる。1960 年代に Bélanger によって、副甲状腺ホルモン(PTH)投与または低カルシウム(Ca)食の給餌によって骨細胞が骨小腔周囲の骨基質を溶解する現象、すなわち、骨細胞性骨溶解が提唱された。しかし、その詳しい機序に関しては未だ明らかにされておらず、この現象について否定的な意見も聞かれる。そこで本研究では、その可能性を探るために、皮質骨と骨梁の骨細胞およびその周囲の骨基質の変化について微細構造学的および組織化学的に解析した。

【材料と方法】 生後 11 週齢の雄性 ICR マウス(野生型マウス)および破骨細胞が存在しない *Rankl*^{-/-}マウスに hPTH[1-34](80μg/kg, 160μg/kg, 2mg/kg)を外頸静脈から投与し、30 分、1 時間、6 時間、9 時間後において必要に応じて血液を採取し血中 Ca 濃度を測定した。また、同マウスをアルデヒド溶液にて灌流固定を行った。その後、大腿骨および脛骨を摘出して、通法にてパラフィン、エポキシ樹脂、MMA 樹脂、研磨切片を作製した。それぞれの切片を用いて H-E 染色、プロトンポンプのサブユニットである a3(破骨細胞に特異的サブユニット)および d2(破骨細胞・腎臓にも検出されるサブユニット)の免疫組織化学、準超薄切片によるトリイジブルー染色、von Kossa 染色、透過型電子顕微鏡観察、およびカルセイン投与による蛍光顕微鏡観察を行った。さらに、Ca の沈着を検索するために、野生型マウスに hPTH[1-34](80μg/kg)を投与し、PTH 投与後 5-7 日の間に ⁴⁴Ca 安定同位体を配合した餌を給餌し、灌流固定・エポキシ樹脂切片を作製することで、⁴⁴Ca の局在を同位体顕微鏡にて観察した。

【結果と考察】 野生型マウスの腎動静脈を結紮し、血中 Ca 濃度の経時的変化を測定すると、PTH 投与 1 時間後で血中 Ca 濃度が有意に上昇し、その後、PTH 非投与群と同じ値を示した。このことは、PTH 投与により、血中 Ca 濃度が腎臓での作用を介さずに短時間で一過性に上昇することを示唆している。PTH 投与したマウスの骨組織切片を観察すると、PTH 非投与のコントロール群 6 時間後では、すべての骨細胞は骨小腔の大きさ・外形と一致した形態を示していた。一方、PTH 投与群では、骨幹端・骨梁の骨細胞は骨小腔に一致した外形を呈したが、皮質骨では骨細胞の周囲に拡大した間隙を認めた。このことは、PTH 投与により、皮質骨の骨細胞が酸分泌を行う可能性を示唆している。そこで、プロトンポンプの α_3/α_2 サブユニットの免疫組織化学を行ったところ、すべての破骨細胞に α_3/α_2 サブユニット陽性反応が、また、PTH 投与群の皮質骨の骨細胞に α_2 サブユニット陽性反応が認められた。よって、皮質骨の骨細胞は α_2 サブユニットを含むプロトンポンプによって周囲の骨基質を酸により溶解すると考えられた。さらに von Kossa 染色で確認すると、PTH 投与群の骨細胞周囲の骨基質は、広範囲に渡って青く抜けた未石灰化領域を示していた。同部位を透過型電子顕微鏡観察すると、骨小腔壁が不規則な形状を示し、骨小腔内部にはコラーゲン線維が分解されたとされる不定形構造物や断片的な石灰化基質を認めた。さらに、PTH 投与した骨細胞周囲の骨基質が拡大した間隙を示さなくとも、微小な性状変化を生じる可能性を明らかにするため、原子間力顕微鏡によるナノインデンテーションを行った。その結果、顕微鏡レベルで構造変化が認められない場合でも、骨小腔周囲の基質の弾性率が PTH 投与 1 時間後で低下し始め、6 時間後には著しく低い値を呈することが示された。従って、骨細胞は、PTH 投与により、周囲の骨基質を溶解する可能性、また、構造的変化を示さなくとも物理的性状を脆弱化させる可能性が推察された。

これらの所見について、破骨細胞の関与の有無を明らかにする必要から、破骨細胞が存在しない *Rankl*^{-/-}マウスを用いて同様の実験を行った。その結果、PTH 投与 1 時間後の血中 Ca 濃度は、腎動静脈を結紮しただけのコントロール群に比べて有意に上昇していた。PTH 投与 *Rankl*^{-/-}マウスの骨組織を観察すると、一部の骨小腔が拡大しており、さらに、von Kossa 染では骨小腔周囲に青く抜けた未石灰化基質を認めることができた。透過型電子顕微鏡観察では、PTH 投与野生型マウスと同様に、骨小腔壁は不規則な外形を示し、小腔内部には有機性の不定形構造物が見られた。ところが、それだけでなく、骨小腔を取り囲むように一層の骨基質が観察されたことから、骨基質が一度溶解した後に石灰化ミネラルを沈着する可能性が推察された。そこで *Rankl*^{-/-}マウスにカルセイン投与し蛍光顕微鏡観察すると、骨小腔周囲にカルセイン標識が認められた。このことは、*Rankl*^{-/-}マウスでは、骨細胞が石灰化ミネラルの流出・流入を局所的かつ一過性に行う可能性を示唆しており、さらに、この可能性は、PTH 投与された野生型マウスの骨細胞にも潜在的に存在することが予想された。そこで、野生型マウスに ⁴⁴Ca 安定同位体を給餌し同位体顕微鏡で観察すると、いくつかの骨小腔周囲に ⁴⁴Ca 安定同位体の集積を認めたことから、破骨細胞が存在する場合でも、PTH 投与により骨細胞は周囲の骨基質にミネラル沈着を誘導すると推察された。

【結語】 以上、骨細胞は、PTH 投与によって骨小腔周囲の骨基質を溶解する一方、石灰化沈着を誘導する可能性が示唆された。