



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Histochemical assessment of the interplay between vascular endothelial cells and septoclasts during endochondral ossification in mice [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	土屋, 恵李佳
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12607号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66148
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Erika_Tsuchiya_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 土屋 恵李佳

学位論文題名

Histochemical assessment of the interplay between vascular endothelial cells and perivascular cells during endochondral ossification in mice

（軟骨内骨化における血管内皮細胞と perivascular cell の細胞間連携に関する組織化学的検索）

軟骨内骨化では、骨からの血管内皮細胞が肥大化軟骨細胞層に侵入することで石灰化軟骨基質が露出し、そこに骨芽細胞が骨基質を合成することで一次骨梁が形成されてゆく。しかし、軟骨小腔の横隔壁に侵入する血管内皮細胞の周囲に septoclast（別名 perivascular cell, Lee et al., 1995; Nakamura and Ozawa 1996）が存在することが過去に報告されるなど、軟骨内骨化には未だ不明な点が多い。そこで、我々は、マウス長管骨の成長板軟骨の骨・軟骨移行部における血管内皮細胞および septoclast について組織化学・微細構造学的に検索した。

生後 8 週齢の雄性マウスをアルデヒド液で灌流固定し脛骨を摘出後、同固定液で1日間、4℃にて浸漬固定した。脛骨サンプルは 5%EDTA 溶液で脱灰し、パラフィンまたはエポキシ樹脂へ包埋した。それぞれの切片を用いて H-E 染色、CD31、ドリコスマメレクチン(DBA; septoclast のマーカー)、MMP-9、F4/80、endomucin、PDGF-bb、EphB4、ephrinB2 の免疫組織化学および準超薄切片によるトリジンブルー染色、von Kossa 染色、透過型電子顕微鏡観察を行った。また、生後 1、4、8 週齢マウスを用いて septoclast の数および血管内皮細胞と septoclast との距離における統計解析を行い、Tukey-Kramer 法を用いた多重比較検定を行った。さらに、c-fos^{-/-}マウスと Rankl^{-/-}マウスにおける septoclast の存在の有無や軟骨内骨化の異常について組織学的に検索した。

骨・軟骨移行部では CD31 陽性血管内皮細胞が肥大化軟骨細胞層への先端側に位置しており、それらの血管内皮細胞は軟骨侵入部位において MMP-9 陽性反応を示していた。透過型電子顕微鏡にて観察すると、骨・軟骨移行部の肥大化軟骨細胞の小腔内に血管内皮細胞の細胞突起が挿入している像を認めた。また、血管腔外の軟骨小腔に存在する赤血球や、血管内に肥大化軟骨細胞の細胞残渣なども観察された。さらに、血管内皮細胞の細胞突起が不連続となっている部位が観察されたことから、血管内皮細胞の侵入先端は開放型になっているものと推察された。一方で、DBA 陽性を示す septoclast は MMP-9 を有しておらず、血管内皮細胞よりもやや骨幹側に局在する傾向を

示した。統計解析では、septoclast と血管内皮細胞との距離ならびに septoclast の数は 4 週齢マウスにおいて最も高い値を示した。透過型電子顕微鏡にて観察すると、septoclast はゴルジ装置および大型の水解小体を発達させており、従って、取り込み能を有することが示唆されたが、F4/80 陽性を示さずマクロファージ系以外の細胞と考えられた。また、septoclast は c-fos^{-/-}マウスでは存在したが Rankl^{-/-}マウスでは存在しなかったことから、septoclast の分化には RANK シグナルが必要であると考えられた。野生型マウスと比較して、c-fos^{-/-}マウスと Rankl^{-/-}マウスの肥大化軟骨細胞層は厚くなっており、さらに Rankl^{-/-}マウスでは成長板軟骨と骨の移行部が不均一な形状を呈していた。よって、septoclast は取り込み能を有するほかに、軟骨への血管侵入に影響を与える可能性が考えられた。近年、前破骨細胞が分泌する PDGF-bb が CD31 陽性および endomucin 陽性の血管新生を誘導し、さらに骨形成を亢進することが報告されている (Xie et al., 2014)。我々が検索したところ、PDGF-bb 陽性反応は、骨・軟骨移行部の破骨細胞だけでなく septoclast と思われる細胞にも認められた。このことから、骨軟骨移行部に存在する破骨細胞や septoclast のいくつかは PDGF-bb を産生し、軟骨侵入に必要な血管新生を誘導・支持する可能性が推察された。つまり、軟骨への血管侵入は肥大化軟骨細胞からの VEGF だけでなく、破骨細胞や septoclast からの PDGF-bb によって局所的に調節される可能性が推察された。

近年、軟骨内骨化における血管内皮細胞には骨特異的なサブタイプ CD31^{high}/endomucin^{high} 陽性血管が存在することが報告されている (Kusumbe et al., 2014; Ramasamy et al., 2014)。野生型マウスにおいて endomucin 免疫染色を行うと、成長板直下の領域で endomucin 強陽性を示す多数の血管が観察された。Endomucin と EphB4 の二重染色を行うと、成長板直下の領域には endomucin 陽性のみを示す血管が局在したが、その一方で、一次骨梁領域には endomucin 陽性/EphB4 陽性血管が観察された。このような endomucin 陽性/EphB4 陽性血管には ephrinB2 陽性骨芽細胞系細胞が隣接して局在していた。同部位を透過型電子顕微鏡にて観察すると、骨・軟骨移行部から一次骨梁にかけて血管内皮細胞の基底膜は不連続または非常に薄くなっており、そこでは、血管内皮細胞と骨芽細胞が直接的に、あるいは、電子密度の高い細胞外基質を一層介して接触していた。このことから骨芽細胞と血管内皮細胞は cell-to-cell contact によって EphB4/ephrinB2 シグナルを誘導し、骨形成を促進させる可能性が推察された。このように、血管内皮細胞は成長板直下の領域とそれ以外の領域では異なる機能を持つことが推測された。

以上より、骨の血管は、septoclast、破骨細胞、骨芽細胞といった様々な細胞群の連携プレーによって正常な軟骨侵入を行うと推察された。特に、同一の血管において、骨・軟骨移行部では septoclast や破骨細胞が石灰化基質の吸収や残渣の取り込みだけでなく、局所的な血管新生の調節を受ける可能性、一方、一次骨梁の部位では ephrin シグナルを介した骨芽細胞の活性に関与する可能性が示唆された。