



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_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 土屋 恵李佳

主査 教授 北川 善政
審査担当者 副査 教授 網塚 憲生
副査 教授 土門 卓文

学 位 論 文 題 名

Histochemical assessment of the interplay between vascular endothelial cells and septoclasts during endochondral ossification in mice
(軟骨内骨化における血管内皮細胞と septoclast の細胞間連携に関する組織化学的検索)

審査は、審査担当者の出席のもと、はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われた。その内容を以下に記す。

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軟骨カラム間の石灰化軟骨基質が露出し、そこに骨形成が誘導されてゆく。しかし、血管内皮細胞の周囲に septoclast (perivascular cell)が存在することが報告されるなど、軟骨内骨化の血管侵入における細胞間連携について未だ不明な点が多い。そこで、学位研究として、マウス長管骨の軟骨内骨化における血管内皮細胞と septoclast の細胞間連携について組織化学的に検索した。

8週齢雄性マウスをアルデヒド液で灌流固定後、脛骨を摘出し、通法に従ってパラフィンまたはエポキシ樹脂に包埋した。解析項目として、CD31, ドリコス豆レクチン(DBA), MMP-9, F4/80, endomucin, EphB4, ephrinB2, PDGF-bb, TRAP の組織化学および透過型電子顕微鏡(TEM)観察を行った。また、*c-fos*^{-/-}マウスおよび *Rankl*^{-/-}マウスを用いて DBA 陽性 septoclast の存在の有無についても検索した。

骨・軟骨移行部では、CD31 陽性血管内皮細胞の軟骨侵入部位が MMP9 陽性反応を示しており、その部位を TEM 観察すると、血管内皮細胞の複雑な細胞突起が肥大化軟骨細胞層に侵入する像を観察した。また、DBA 陽性 septoclast は血管内皮細胞の軟骨侵入部位よりも骨幹側に局在した。septoclast は大型の水解小体を示すことから取り込み能を有すると推察されたが、F4/80 陽性を示さないことからマクロファージ系細胞ではないこと、また、*c-fos*^{-/-}マウスに存在するが *Rankl*^{-/-}マウスには存在しないことから、その分化過程には RANK シグナルを必要とすることが推測された。骨・軟骨移行部において、septoclast と TRAP 陽性

破骨細胞のいくつかは PDGF-bb 陽性を示したことから、従来、肥大化軟骨細胞が VEGF を産生して血管内皮細胞の軟骨侵入を誘導するという考え方に加えて、同部位における血管の軟骨侵入が PDGF-bb を介して局所的に調節される可能性が推察された。

骨幹端の血管は骨梁に平行に伸びており、その血管内皮細胞は、骨・軟骨移行部において endomucin 陽性/EphB4 陰性を示したが、一次骨梁領域では endomucin 陽性/EphB4 強陽性を示した。一次骨梁領域では、endomucin 陽性/EphB4 強陽性血管に隣接して ephrinB2 陽性骨芽細胞が局在した。TEM 観察では、薄い基底膜または断裂した基底膜を有する血管内皮細胞と成熟型骨芽細胞が直接接触する像が認められた。一次骨梁領域ではモデリングが誘導されており、骨芽細胞の活性にはカップリング以外の因子が必要とされているが、骨・血管関連がその役割の一端を担う可能性が推察された。

以上から、血管内皮細胞は骨・軟骨移行部と一次骨梁領域では異なる機能を持つ可能性が示唆され、特に、軟骨内骨化においては septoclast との細胞連携が重要な役割を果たすと考えられた。

審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。以下にその項目を記す。

- (1) septoclast の細胞構造学的特徴および機能
- (2) 骨・軟骨移行部に septoclast が局在するメカニズム
- (3) septoclast の細胞分化における Rankl と c-fos の役割
- (4) ephrinB2/EphB4 の血管機能に果たす作用
- (5) septoclast と骨髄の reticular cell との細胞学的関連性
- (6) 血管新生阻害剤やビスホスホネート製剤を投与した際の血管の軟骨侵入
- (7) 骨折の治癒過程における血管の軟骨侵入
- (8) 血管内皮細胞の軟骨基質への侵入メカニズム

本研究の結果は、歯科領域に関連する骨組織において、重要な基礎科学的情報を提供しており、また、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知識を有していることが確認された。

以上のことから、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。