



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Immunocytochemical assessment of cell differentiation of podoplanin-positive osteoblasts into osteocytes in murine bone [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	永井, 伯弥
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13474号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74006
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Tomoya_Nagai_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野名称

博士（歯学）

永井 伯弥

Immunocytochemical assessment of cell differentiation of podoplanin-positive osteoblasts into osteocytes in murine bone

(podoplanin 陽性骨芽細胞および骨細胞における組織化学的検索)

骨細胞は、骨芽細胞が骨基質中に埋め込まれることで分化し、周囲の骨細胞または骨芽細胞と細胞突起を介した細胞性ネットワークを形成している。成熟骨における骨細胞は幾何学的に規則正しい配列を示すが、それは骨芽細胞から骨細胞への時間的・空間的分化において規則性を有するためと推測される。このことは同時に、骨細胞への分化において、骨芽細胞が偶発的に基質に埋め込まれて骨細胞に分化するのではなく、何らかのメカニズムが存在する可能性を示唆していると推察される。podoplanin は、ERM ファミリー蛋白質と結合することで RhoA、および、その下流シグナルである ROCK を介して ERM 蛋白をリン酸化し、アクチンフィラメントなどの細胞骨格を再構築することで、細胞突起の形成、細胞極性の獲得や移動に関与することが示唆されている。また、CD44 も同様に、ERM ファミリーと結合し細胞骨格の再構築に働くことが考えられているが、podoplanin と CD44 は互いに結合部位を持ち、それぞれが ERM 蛋白のリン酸化/細胞骨格の再構築において共役的に関わる可能性が推測されている。

以上、骨芽細胞から骨細胞への分化において podoplanin シグナルが関与する可能性を明らかにするため、本学位研究では、骨細胞に分化しつつある骨芽細胞や分化初期の骨細胞における podoplanin やアクチンフィラメントの細胞内局在、また、CD44 陽性細胞との局在性を組織化学的に検索した。

生後 8 週齢の ICR マウスを麻酔下にて 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定後、大腿骨・脛骨を摘出し、EDTA 脱灰後、通法にてパラフィン、および、凍結切片を作製した。これらの切片を用いて podoplanin, CD44, 組織非特異型アルカリホスファターゼ (TNALPase)、リン酸化 ezrin 免疫組織化学、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 酵素組織化学を行った後、パラフィン切片は光学顕微鏡で、凍結切片は stimulated emission depletion (STED) 顕微鏡で観察した。また、podoplanin の微細局在を解析するため、podoplanin 免疫染色後の凍結切片をエポキシ樹脂に包埋し、pre-embedding 法にて免疫電顕観察を行った。さらに、生後1週齢マウスから頭蓋骨を取り出して器官培養を行い、CD44 を添加しないものを対象群、CD44 を添加したものを実験群として 6、12、24、48、72 時間培養後に RT-PCR による Podoplanin、Ezrin、Gapdh の発現およびリン酸化 ezrin における immunoblotting にて解析した。

その結果、大腿骨骨幹端の骨梁において、骨基質に埋入された直後の骨細胞、および骨

表面に局在するいくつかの TNALPase 陽性骨芽細胞が **podoplanin** 陽性反応を示した。また、準超薄切片や超薄切片を用いた免疫電顕観察では、**podoplanin** 陽性反応は、骨芽細胞の細胞膜および骨基質に埋め込まれたばかりの骨細胞の細胞膜、および、一部の骨芽細胞や骨細胞の細胞突起に一致して局在していた。従って、**podoplanin** は、骨細胞に分化しつつある骨芽細胞、あるいは、分化したばかりの骨細胞に対するマーカーになりうると推測された。

次に、**podoplanin** 陽性骨芽細胞と **podoplanin** 陽性を示さない骨芽細胞において、細胞骨格であるアクチンフィラメントの分布を観察するために、**podoplanin** およびアクチンフィラメントの二重染色を施して STED 観察を行った。その結果、**podoplanin** 陽性を示さない骨芽細胞は良く発達したストレスファイバーを形成していたが、骨に埋め込まれつつある **podoplanin** 陽性骨芽細胞におけるアクチンフィラメントは、細胞膜周囲や細胞突起の基部に集積しており、その分布パターンは骨細胞に類似していた。また、**podoplanin** はアクチンフィラメントが蓄積した場所に局在する傾向があることが示されたことから、**podoplanin** 陽性骨芽細胞におけるアクチンフィラメントの再構築が推測された。

持続的に骨形成が生じる皮質骨骨髓側(骨モデリング部位)、ならびに、大腿骨骨幹端(骨リモデリング部位)において、**CD44** 陽性細胞と **podoplanin** 陽性骨芽細胞・骨細胞との局在を検索した。その結果、皮質骨骨髓側では、**podoplanin** 陽性骨芽細胞が骨表面に一定間隔で局在していたが、**podoplanin** 陽性骨芽細胞と **CD44** 陽性細胞との細胞間接触像は観察されなかった。しかし、**podoplanin** 陽性骨芽細胞の細胞膜周囲にはリン酸化 **ezrin** の局在が STED 観察された。よって、皮質骨骨髓側では、骨細胞への分化における **podoplanin** シグナルは **CD44** によって増強されないと推測された。一方、骨リモデリング部位である骨幹端骨梁では、TRAP 陽性破骨細胞が **CD44** 陽性を示し、**podoplanin** 陽性骨芽細胞にしばしば接触または近接していた。これらの **podoplanin** 陽性骨芽細胞の中には **CD44** 陽性を示すものもあった。リン酸化 **ezrin** の免疫組織化学を行うと、**CD44** 陽性/**podoplanin** 陽性骨芽細胞はリン酸化 **ezrin** 陽性を示し、**CD44** 陽性/TRAP 陽性破骨細胞はリン酸化 **ezrin** の陽性反応を示さなかった。このことから、**podoplanin** 陽性骨芽細胞が、**CD44** 陽性破骨細胞と接触することで、骨細胞への分化における **podoplanin** シグナルが増強される可能性が推察された。

さらに、**CD44** が **ezrin** のリン酸化を促進するか明らかにするため、生後 1 週齢マウスから得られた頭蓋冠を **CD44** 添加あるいは非添加培地で器官培養し、6、12、24、48、78 時間後における *Podoplanin*、*Ezrin*、*Gapdh* の発現を RT-PCR にて解析したところ、これらの発現量に大きな差は認められなかったが、リン酸化 **ezrin** 蛋白は **CD44** 添加群のほうが高値を示した。このことから、**CD44** は **ezrin** リン酸化を促進すると推測された。

以上のことから、骨基質に埋め込まれつつある骨芽細胞、あるいは、埋め込まれたばかりの骨細胞は **podoplanin** を細胞膜上に発現し、ERM ファミリー蛋白質のリン酸化を介して細胞内アクチンフィラメントの局在を再構築する可能性が推察された。また、骨リモデリング部位では **CD44** 陽性破骨細胞が骨細胞分化における **podoplanin** 作用を増強する可能性、一方で、モデリング部位の骨細胞分化においては、**CD44-podoplanin** 以外の機序が推測された。