HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Immunocytochemical assessment of cell differentiation of podoplanin-positive osteoblasts into osteocytes in murine bone [an abstract of entire text]
Author(s)	永井, 伯弥
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13474号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74007
Type	doctoral thesis
File Information	Tomoya_Nagai_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要約

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）

博士の専攻分野名称　　博士（歯学）　　永井　伯弥

【目的】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。そのメカニズムを組織化学的に解明することを目的とする。

【材料と方法】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。

【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髄側（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、皮質骨骨髄側では、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、皮質骨骨髄側では、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。

【考察】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。