HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | Histological observation on the initial stage of vascular invasion into the secondary ossification of murine femoral epiphyseal cartilage [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s) | 橋本, 圭司 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(歯学) |
| Dissertation Number | 甲第14535号 |
| Issue Date | 2021-03-25 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/81256 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Keiji_Hashimoto_review.pdf, 審査の要旨 |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# 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　橋本　圭司

審 査 担 当 者　　主査　教授　網塚　憲生
副査　教授　飯村　忠浩
副査　教授　樋田　京子

学　位　論　文　題　名

Histological observation on the initial stage of vascular invasion into the secondary ossification of murine femoral epiphyseal cartilage

（マウス大腿骨骨端軟骨二次骨化における初期血管侵入の組織学的解析）

審査は，審査担当者全員の出席の下，Zoom を用いたオンライン公聴会として実施し，はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われた。内容を以下に記す。

長管骨の発生および形態形成は，軟骨原器に生じた一次骨化と二次骨化により進行する。一次骨化は軟骨原器中央部に，また，二次骨化は骨端軟骨に血管が侵入することによって開始し，その後，血管とともに伴走した骨芽細胞前駆細胞が骨芽細胞に分化し骨形成を誘導してゆく。一次骨化において，肥大化細胞層における軟骨カラム間が石灰化するのに対してカラム内の横隔壁は石灰化しないこと，また，血管内皮細胞は細胞突起を伸長させ，MMP-9 などの基質分解酵素により軟骨カラム内の横隔壁を分解して軟骨侵入すること，が報告されている。ところが，二次骨化においては，血管侵入が一次骨化と同様のメカニズムで誘導されているか詳細な報告がなされていない。本研究では，二次骨化において骨端軟骨に侵入する endomucin 陽性血管内皮細胞や血管侵入に付随する細胞群について，組織学的に明らかにすることを目的とした。

生後 1，3，5，7，10，12，14 日齢のマウスを麻酔下にて安楽死させ，大腿骨を摘出後，4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した。左大腿骨は，EDTA 脱灰後にパラフィン包埋し，厚さ 5 $\mu$ m の矢状断パラフィン切片を作製した。これらの切片を用いて，HE 染色，endomucin，組織非特異型アルカリホスファターゼ（TNALPase），cathepsin K，MMP-9 免疫組織化学，ならびに，酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）酵素組織化学を行った。一方，右大腿骨は，未脱灰の状態でエポキシ樹脂に包埋し，準超薄切片を用いた von Kossa 染色，および，超薄切片を用いた透過型電子顕微鏡解析に供した。

その結果，生後 1〜3 日齢のマウス大腿骨遠位端の骨端軟骨は，関節面の上前面中央部にわずかな窪みを形成し，そこには endomucin 陽性を示す小血管が集積していた。軟骨基質分解に関与すると考えられる MMP-9 陽性反応は，endomucin 陽性血管が集積していた部位の軟骨表面および軟骨膜にわずかにしか認められなかった。さらに，endomucin 陽性血管が局在する領域には TNALPase 陽性細胞が局所的に集積しており，同部位の軟骨基質は石灰化していないにも関わらず，少数の TRAP 陽性破骨細胞が観察された。準超薄切片観察

および透過型電子顕微鏡観察を行ったところ，生後 1 日齢では，血管が関節軟骨に接していたが，それら血管は血管周囲細胞を伴っておらず，血管内皮細胞の基底側の細胞壁は平滑であり，軟骨基質に向かって細胞突起を伸長させていなかった。このような血管内皮細胞の周囲には静止層の軟骨細胞が局在しており，その周囲軟骨基質にコラーゲン細線維の網目状構造が観察されたことから，軟骨基質の分解は生じていないと推測された。

生後 5 日齢になると，endomucin 陽性血管を含有する軟組織塊が軟骨に侵入しはじめており，軟組織塊が侵入する先端では MMP-9 陽性反応が観察された。また，軟骨に侵入する組織塊には，TNALPase 弱陽性骨芽細胞系細胞のほか TRAP 陽性破骨細胞も局在していたが，これらの破骨細胞はほとんど cathepsin K 陽性を示さなかった。準超薄切片観察および透過型電子顕微鏡観察では，軟骨基質内部に侵入する一塊の細胞群が認められたが，侵入端には多数の血管が局在した。これらの血管内皮細胞は細胞突起を軟骨基質に対して穿下性に伸ばすのではなく，血管腔の形を維持しながら血管壁全体として軟骨基質に接していた。このような血管壁周囲の軟骨基質はコラーゲン線維の網目状構造を示さなかったことから，その部位における軟骨基質の分解が推測された。また，血管周囲に存在する軟骨細胞は肥大化しておらず，その周囲に石灰化軟骨基質も観察されなかった。

生後 7～10 日齢では，軟組織塊が骨端軟骨中央部に達すると，様々な方向に拡大してゆき，MMP-9 陽性反応は拡大する軟組織塊の辺縁部に認められた。生後 12,14 日齢になると血管侵入部位に骨形成が生じていた。

以上，マウス大腿骨遠位端骨端軟骨の二次骨化における血管侵入は，一次骨化における骨・軟骨移行部における血管侵入とは異なり，血管内皮細胞が細胞突起を伸ばして軟骨基質を穿下性に貫くのではなく，血管を含む軟組織塊として軟骨に侵入することが明らかにされた。また，軟組織塊の先端部には血管内皮細胞が局在したが，それらは血管腔構造を維持しながら血管壁全体として軟骨基質を分解することが示唆された。

審査については，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。以下のその項目を記す。

（1） 二次骨化の血管侵入部位で MMP-9 を産生する細胞について
（2） 二次骨化の血管侵入部位における血管内皮細胞と軟骨細胞の相互作用について
（3） 一次骨化と二次骨化における血管侵入に付随する細胞群の差異について
（4） 骨端軟骨への血管侵入部位における決定機構について
（5） 骨端軟骨への侵入血管の組織学的特徴について
（6） 個体間や動物種による骨端軟骨への血管侵入の差異について

上記の質疑応答から，申請者から明快な説明と回答が得られた。申請者は本研究の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学識を有していることが確認された。

以上，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相応しいと認めた。