

論文要旨等報告書

氏	安藤涼子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3 5 7 6 号
学位授与の日付	平成 2 0 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	骨細胞ネットワークの3次元形態計測 -ニワトリとマウスの比較-

論文審査委員 教授 山本 敏男 准教授 市川 博之 教授 山城 隆

学位論文内容の要旨

【目的】

骨細胞は骨組織中で最も多く存在する細胞であり、隣接する骨細胞同士と細胞突起を介して三次元的なネットワークを形成している。さらにそのネットワークは、骨表面の骨芽細胞から骨髄領域にまで及ぶことから、外的刺激に反応し、異なる機能をもつ細胞群の統括、協調に重要な役割を果たすと考えられている。そしてこの細胞間ネットワークにおいて重要なのが、ギャップ結合を介する物質の移動、即ち細胞間コミュニケーションである。

一方、歯科矯正治療時の歯牙移動は、周囲の骨において活発な骨リモデリングを生じる。そして、骨細胞を取り囲む骨微小環境は、破骨細胞直下で大きな変化が生じると考えられている。即ち、細胞外pH(pH_e)および細胞外カルシウム濃度([Ca²⁺]_e)の劇的な変化である。我々は、これらの因子が骨細胞のギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションに何らかの影響を与えると仮定し、ニワトリ胚頭蓋骨より取り出した生骨組織中の骨細胞に対してFluorescence Replacement After Photobleaching解析(FRAP)を行った。同様に骨リモデリングの調節因子の一つである副甲状腺ホルモン(PTH)の影響について検討した。さらに、細胞内カルシウムがこれらの因子に関与している可能性を検討した。

【方法】

1. 骨組織中の骨細胞におけるギャップ結合の分布を検討するために、胎生16日齢ニワトリ胚頭蓋骨を取り出し、抗Connexin43抗体にて免疫蛍光染色を行った。
2. 骨組織中の骨細胞におけるギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションを検討するために、胎生16日齢ニワトリ胚頭蓋骨を取り出し、ギャップ結合を通過出来る蛍光色素Calcein-AM(MW=622)で蛍光染色した。FRAPは、標的とする骨細胞をレーザーにて消光し、その後起こる周囲細胞からの蛍光色素の再流入を、蛍光輝度を指標に計測した。計測は、消光直後から1分おきに5分後まで行った。
3. FRAPによる標的細胞への為害性および各種培養条件下による標的細胞への為害性について検討した。胎生16日齢ニワトリ胚頭蓋骨から初代骨細胞を単離・培養し、FRAPを行なう場合と同様のレーザー照射を単離した初代骨細胞に行い、3時間経過した後の標的細胞の生死についてCalcein-AMおよびPropidium iodideの取り込みの違いによって判定した。

3. 骨細胞ネットワークの3次元解析：ニワトリおよびマウスの頭頂骨における共焦点画像から、コンピュータソフトウェア（IMARIS, NEURON TRACER, SURPASS）を用いて骨細胞ネットワークの3次元形態計測を行い、両者を比較した。
4. 骨細胞1個当たりの形態計測値の算出：1個の骨細胞が占める骨基質の体積と骨基質 $1\mu\text{m}^3$ に占める骨細胞突起の長さ、骨細胞突起を含む骨細胞の表面積、体積から、骨細胞1個当たりの形態計測値を算出した。

【結果】

1. ニワトリおよびマウスの石灰化ステージ：ニワトリおよびマウスの骨格標本において、頭頂骨の大きさと石灰化の進行を比較したところ、ニワトリは胎生16日齢、マウスは胎生17日齢で頭頂骨はほぼ石灰化していた。
2. IMARISを用いた骨細胞ネットワークの3次元解析：ニワトリおよびマウス頭頂骨において、隣接する骨細胞の3次元中心間距離は、それぞれ $23.5\pm 6.1\mu\text{m}$ 、 $39.6\pm 11.6\mu\text{m}$ であり、マウスが有意に大きいことが示された。1個の骨細胞から出る細胞突起数は、それぞれ 52.7 ± 6.4 本、 49.7 ± 9.7 本であり、種による差は認められなかった。骨細胞1個が占める骨基質の体積は、それぞれ $4204.8\pm 605.9\mu\text{m}^3$ 、 $10664.7\pm 1510.3\mu\text{m}^3$ であり、マウスが有意に大きいことが示された。骨基質中に占める骨細胞の密度は、それぞれ 242699.9 ± 36818.2 個/ mm^3 、 95556.9 ± 1386.2 個/ mm^3 であり、ニワトリが有意に大きいことが示された。
3. NEURON TRACER および SURPASS を用いた骨細胞ネットワークの3次元解析：ニワトリおよびマウス頭頂骨において、骨基質 $1\mu\text{m}^3$ に占める骨細胞突起の長さは、それぞれ $0.24\pm 0.03\mu\text{m}$ 、 $0.25\pm 0.06\mu\text{m}$ であり、種による差は認められなかった。骨基質 $1\mu\text{m}^3$ に占める骨細胞の表面積は、それぞれ $0.26\pm 0.09\mu\text{m}^2$ 、 $0.33\pm 0.01\mu\text{m}^2$ であり、種による差は認められなかった。骨基質中に占める骨細胞体積の割合は、それぞれ9.29%、12.92%であった。
4. 骨細胞1個当たりの形態計測値：骨細胞1個当たりの骨細胞突起の長さ、表面積、体積は、ニワトリでは $1014.2\pm 124.5\mu\text{m}$ 、 $1094.4\pm 398.3\mu\text{m}^2$ 、 $390.6\pm 94.6\mu\text{m}^3$ 、マウスでは $2667.7\pm 596.0\mu\text{m}$ 、 $3491.8\pm 145.2\mu\text{m}^2$ 、 $1378.2\pm 176.5\mu\text{m}^3$ であり、いずれもマウスが有意に大きいことが示された。

【考察および結論】

本研究において、骨細胞ネットワークの計測部位、計測時期を動物種間で統一した結果、胎生期のニワトリおよびマウス頭頂骨における3次元骨細胞ネットワークの形態の種による相違が明らかとなった。これは、従来の骨小腔を中心とした形態の比較に加え、新たに骨細胞突起を含めた3次元骨細胞ネットワークの形態を比較したものである。隣接する骨細胞の中心間距離や骨基質中に占める骨細胞の密度など、骨細胞の細胞体に関する計測値では動物種間で有意な差が認められた。しかし、1個の骨細胞から出る細胞突起数や骨基質 $1\mu\text{m}^3$ に占める骨細胞突起の長さ、骨細胞の表面積など、骨細胞突起が関与する計測値では動物種間で差を認めなかった。また、骨細胞1個あたりの骨細胞突起の長さ、表面積、体積はマウスが有意に大きい値を示した。このようにニワトリおよびマウスにおいて骨細胞ネットワークの形態に相違が認められたことから、骨細胞が担う機能にも何らかの相違が見られる可能性が考えられる。

論文審査結果の要旨

骨細胞は多数の細胞突起を持ち、その細胞突起により骨基質中で3次元的なネットワークを形成している。骨細胞はそのネットワークを介してメカニカルストレスの感知・伝達や、骨代謝調節に関与するといわれている。これまで骨細胞ネットワークの形態は、年齢や骨質、動物種などに影響を受けると報告されている。しかし、これまでの種に関する報告では、動物種間での年齢が統一されておらず、種による相違を正確に反映していない可能性がある。また、骨基質中の骨細胞突起による3次元的なネットワークの形態を直接捉えることは困難であったため、これまでの骨細胞ネットワークの形態の種差に関する報告は骨小腔の2次元形態計測に基づくものであった。そこで本研究では骨細胞ネットワークの形態の種による相違を検討するために、計測部位、計測時期を動物種間で統一することとした。また、石灰化が終了した胎生期のニワトリおよびマウス頭頂骨における骨細胞突起を含めた骨細胞ネットワークの形態を3次元的に捉え、形態計測学的に動物種による相違を検討することとした。

その結果、ニワトリは胎生16日齢、マウスは胎生17日齢で頭頂骨は石灰化していた。また、胎生16日齢ニワトリおよび胎生17日齢マウスにおいて、隣接する骨細胞の中心間距離や骨基質中に占める骨細胞の密度など、骨細胞の細胞体に関する計測値では動物種間で有意な差が認められた。しかし、1個の骨細胞から出る細胞突起数や骨基質 $1\mu\text{m}^3$ に占める骨細胞突起の長さ、骨細胞の表面積など、骨細胞突起が関与する計測値では動物種間で差を認めなかった。これらのことから、本研究により、従来の骨小腔を中心とした形態の比較に加えて、新たに骨細胞突起を含めた3次元的な骨細胞ネットワークの形態の種による相違を検討することができた。

よって、本研究は年齢を統一した異なる動物間の骨細胞ネットワークの3次元形態の相違を初めて明らかにしたという点において新規性の高い基礎的研究であることが高く評価され、本論文審査委員会は、全会一致で、本学位申請論文が博士（歯学）の学位を授与されるに値する論文であると認めた。