

学位研究紹介

ビスホスフォネートの投与により誘導される破歯細胞のアポトーシスに関する細胞化学的・微細構造学的研究

Cytochemical and Ultrastructural Examination of Apoptotic Odontoclasts Induced by Bisphosphonate Administration.

新潟大学歯学部小児歯科学講座

渡邊淳一

Department of Pedodontics,
Niigata University Faculty of dentistry

Jun-ichi Watanabe

破骨細胞の分化・活性を抑制するビスホスフォネートの作用機序は不明な点が多く、持続的に吸収のみが進行する歯根吸収における破歯細胞へのビスホスフォネートの作用を明らかにすることは、破歯細胞と破骨細胞の相違点をより明確にすることができるとともに、ビスホスフォネートの破骨細胞に対する作用機点の解明にも役立つものと考えられる。さらに、ビスホスフォネートの破歯細胞に対する作用は、破歯細胞の運命、特にアポトーシスにも関連し、その詳細な観察は多核細胞のアポトーシスを解明する上でも重要である。

そこで、本研究では、破歯細胞と破骨細胞の相違点、特に歯根吸収抑制時における破歯細胞の動態を明らかにする目的で、永久歯萌出過程におけるカイウサギにビスホスフォネートを投与し、乳歯歯根表面に観察される破歯細胞の形態学的変化を、組織化学的・微細構造学的に観察し、破歯細胞がアポトーシスに至るまでの過程について詳細な検索を行った。

第三世代ビスホスフォネート・YM175を生後6日齢のカイウサギに1 mg/kgの割合で腹腔内投与した後、1, 3, 5日目に固定、下顎骨を摘出し検索を行った。

ビスホスフォネート投与後の破歯細胞数の変化をコントロール群と比較して統計学的に検索したところ、多核の破歯細胞数は、3日目に最小値を示し、5日目にやや増加したが、ともに有意な減少を示した。また、アポトーシスを示す破歯細胞数は、3日目に最大値を示し、5日目にやや減少したが、ともに有意な増加を示した。従って、破歯細胞数の減少は、主としてアポトーシスによる細胞死に起因する可能性が示唆された。

酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TPARase) 活性

を検索したところ、コントロール群では TRAPase 陽性反応を示す破歯細胞が乳歯歯根象牙質表面に多数局在し (図 1-A)、TRAPase 陽性反応は波状縁とその周囲の細胞質に特に強く観察された (図 1-C)。これに対し、ビスホスフォネート投与群 3 日目の TRAPase 陽性反応を示す破歯細胞では、ほとんどが乳歯歯根象牙質から離れて存在し (図 1-B)、細胞極性が喪失し、TRAPase 反応が細胞質内で顆粒状に観察された (図 1-D)。さらに、一部の破歯細胞では核の濃縮像が観察され、TRAPase 反応が細胞質全体に瀰漫性に認められた (図 1-D)。カテプシン K による免疫組織化学も、TRAPase 活性とほぼ同様に観察された。微細構造学的検索では、コントロール群の破歯細胞は、吸収窩に面して発達した波状縁、波状縁に近接した多数の空胞、豊富なミトコンドリアや核を取り囲む様に局在する発達したゴルジ体などで特徴づけられた。一方ビスホスフォネート投与群では、多くの破歯細胞は波状縁を有さず、象牙質表面から離れて存在し、核周囲のゴルジ体は各層板構造が縮小化を呈し、その周囲には明るい内部構造を有する小胞が多数認められた。しかしながら、ミトコンドリア、核などには著しい微細構造学的変化は認められなかった。このように、ビスホスフォネートの投与によって、TRAPase 活性ならびカテプシン K 免疫反応性の低下が認められ、その局在も細胞質全体に瀰漫性に観察されたことは、破歯細胞の波状縁の消失、象牙質表面からの離脱、ゴルジ層板の縮小化などの微細構造学的変化と関連する所見と考えられる。すなわち、ビスホスフォネートは、破歯細胞のライソソーム合成ならび分泌を含めたタンパク輸送系を阻害するとともに、ゴルジ体などによるタンパク修飾も抑制することで、乳歯歯根象牙質の吸収活性を抑制することが推測される。

一部の破歯細胞では、核濃縮が観察された。それらの細胞では、アポトーシスの指標である核 DNA の断片化を TUNEL 法で検出をしたところ、TUNEL 陽性反応が核内に不均一に観察され、さらに各々の核においても反応性が異なっていた (図 1-E)。さらに微細構造学的には、著しく濃縮した核の他に、明るい核質を示す核が観察された (図 2)。従って、核濃縮が全ての核で一様に進行するのではないことが示された。また、アポトーシスに陥った破歯細胞 (図 2) では、細胞体のくびれ像や突出像が観察されたことから、アポトーシスに陥った破歯細胞は、細胞体を断片化し、アポトーシス小体を遊離する可能性が示唆された。

アポトーシス像を呈する破歯細胞の核では、さらに特徴的の微細構造を示した。すなわち、隣接する核膜の接触

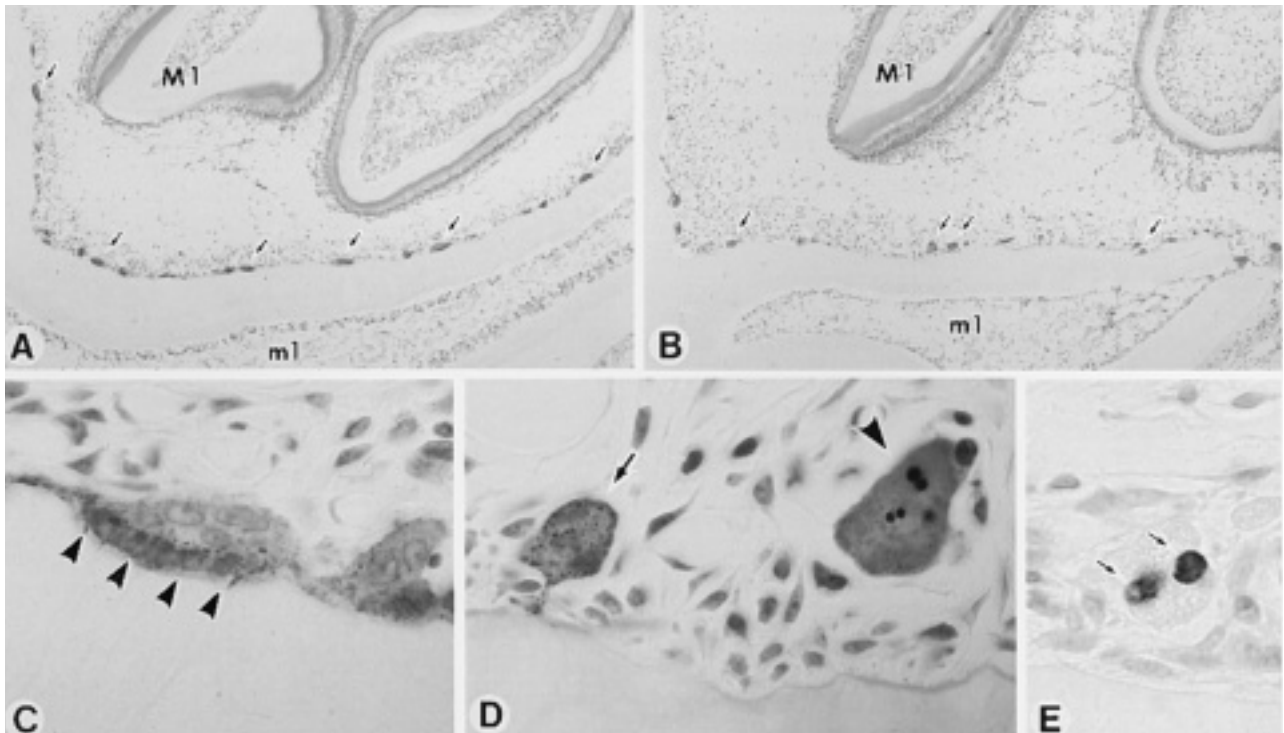


図1 A: TRAPase 陽性の破歯細胞 (矢印) が乳歯歯根象牙質表面に多数認められる。B: TRAPase 陽性の破歯細胞 (矢印) は細胞極性を喪失し, その多くは乳歯歯根象牙質表面から離れて観察される。C: TRAPase 陽性反応は波状縁とその周囲の細胞質 (矢頭) に強く認められる。D: 矢印は, 細胞極性が喪失し, 象牙質表面から離脱する破歯細胞を示す。TRAPase 陽性反応は, 細胞内で不均一に小顆粒状に分布する。核濃縮を呈した破歯細胞の TRAPase 反応は瀰漫性に分布する (矢頭)。E: TUNEL 陽性反応 (矢印) は, 濃染した核内で不均一に観察され, さらに各々の核においても反応性が異なっていた。A~D: TRAPase 染色 E: TUNEL 染色。A, C: コントロール群 B, D, E: ビスホスフォネート投与群 3 日目。ml: 下顎第一乳臼歯 M1: 後継永久歯。

部位や核膜とその細胞質側に形成された粗面小胞体様の構造物との間に, annulate lamellae 様の梯子状構造物が観察された (図2)。annulate lamellae とは, 精子形成や卵細胞, さらには一部の分泌細胞などで観察される構造物で, その形成機序の一つとして annulate lamellae の孔が核膜孔と同じ微細構造とタンパク局在を示すことから, 核膜から産生される可能性が指摘されている。従って, 本研究で観察された annulate lamellae 状構造物は, 卵や精子形成で認められる annulate lamellae と同様な構造物であり, 核間および核・細胞質間におけるイオンや低分子物質の輸送に関与する可能性が推察される。

本研究は, 歯根象牙質吸収過程を観察対象としており, 象牙質吸収の進行している部位についての所見に限られるが, 吸収される象牙質表面には主として線維芽細胞様細胞が散在しており, それらの細胞の細胞間隙は広く, また象牙質との密接な付着は観察されなかった。さらに, 吸収の進行している象牙質表面はラミナリミタンス様構造を呈しており, ビスホスフォネートが容易に象牙質表面に到達し, 沈着する可能性が推察された。従って, 破歯細胞においても, 破骨細胞と同様に, 基質に一度沈着

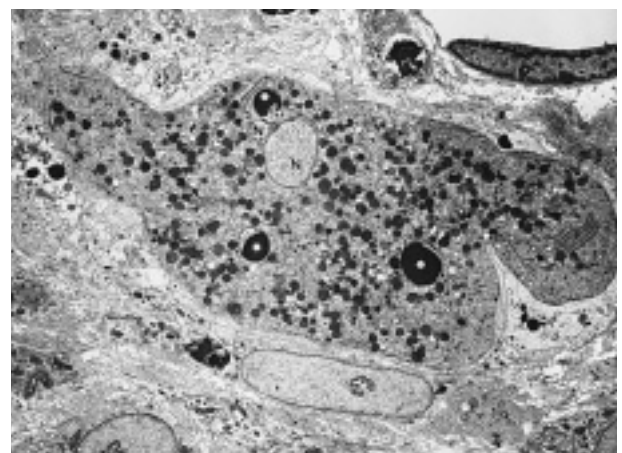


図2 アポトーシスを呈する破歯細胞の電子顕微鏡像。細胞体はくびれ像や突出像を呈し, 濃縮した核 (*) の他, 明るい核質を示す核 (N) も観察される。また, annulate lamellae 様の梯子状構造物が隣接する核膜の接触部位 (矢印) のみならず, 隣接する核の存在しない部位 (矢頭) にも認められる。

したビスホスフォネートを取り込み, 歯根吸収抑制ならびにアポトーシスの誘導が引き起こされることが示唆された。