

## 学位研究紹介

## op/opマウスへのM-CSF投与による骨基質改変に関する微細構造学的・組織化学的研究

Histochemical and ultrastructural examination of bone remodeling in op/op mouse after M-CSF injection

1)新潟医療福祉大学理学療法学科

2)新潟大学大学院医歯学総合研究科

3)松本歯科大学歯科医学総合研究所

西野幾子<sup>1)</sup>, 網塚憲生<sup>2)</sup>, 小澤英浩<sup>3)</sup>

Niigata University Graduate School of

Medical and Dental Science

Ikuko Nishino<sup>1)</sup>, Norio Amizuka<sup>2)</sup>, Hidehiro Ozawa<sup>3)</sup>

## 【目 的】

カップリング現象は骨代謝回転の基本的現象であり、正常の骨成長や加齢現象、および病的な骨吸収や骨形成においても、骨吸収系細胞と骨形成系細胞とのカップリングが重要な役割を果たす。しかしながら、骨代謝回転は、全身性ホルモン、局所因子、血管・神経、メカニカルストレス、発育状態等の複雑な要因によって影響を受けているために、その機構の解明は難しい。本研究では、その解明の一助として、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)欠損により破骨細胞が存在しないop/opマウスを用いることで、カップリングが行われない状態の骨の組織および細胞を形態学的に検索し、続いて、M-CSF投与により破骨細胞の分化・形成と骨吸収を誘導させることで、連動したカップリングを生じさせ、その組織・細胞の形態学的変化を検討した。特に、M-CSF投与による骨芽細胞系細胞の活性を細胞組織化学的に検索する一方、カップリング因子の候補のひとつでもあり、セメントラインや境界板に局在するオステオポンチン(OPN)について検討を加えた。

## 【材料と方法】

生後11日目のop/opマウス(体重約5g)にrhM-CSFを5mg腹腔内1回投与し、対照群では生理食塩水を同様に腹腔内投与した後、それぞれ投与後5日目に屠殺しその脛骨を採取した。これらの試料を脱灰後、パラフィン

およびエポキシ樹脂に包埋した。パラフィン切片ではアゾ色素法による酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRACPase)活性の検出、およびアルカリフォスファターゼ(ALPase)およびOPNの免疫組織化学的検索を行い、エポキシ切片では微細構造学的観察を行った。また、一部の試料からは非脱灰切片を作製した。

## 【結 果】

op/opマウスにM-CSF投与した場合の破骨細胞の出現と海綿骨梁の変化

コントロールop/opマウスではTRACPase陽性の破骨細胞は骨幹端部、骨幹部ともに認められず、TRACPase陽性のセメントラインやリバーサルラインに相当する構造も観察されなかった。また、石灰化軟骨基質を有する一次海綿骨梁が骨幹端部から骨幹部にかけて全域を占めていた。M-CSF投与群では、骨幹部には多数の破骨細胞が形成されており、その直下の骨基質には吸収窩の形成やそれに連続したTRACPase陽性のリバーサルラインが観察されたが、骨幹端部には破骨細胞形成は認められなかった。

op/opマウスおよびM-CSF投与op/opマウスにおける骨芽細胞の観察

op/opマウスの骨幹端部では、石灰化軟骨上、あるいはその上に僅かに形成された骨基質上に楕円形の骨芽細胞が多数観察され、それらの細胞膜に一致してALPase免疫反応の局在が観察された。骨幹部では、海綿骨梁上の骨芽細胞はALPaseの免疫局在を示したが、それらのほとんどが扁平化を呈していた(図1-A)。一方、M-CSF投与群では、骨幹端部ではコントロールと同様の所見を得たが、骨幹部においては、骨芽細胞は活発な機能を示唆する円形あるいは楕円形を示しており、それらの細胞膜に一致して強いALPase反応が観察された。これらの活性型の骨芽細胞は、TRACPase陽性破骨細胞の周囲に局在する傾向が認められた(図1-B)。

op/opマウスおよびM-CSF投与op/opマウスにおける微細構造学的観察

op/opマウスの骨幹端部を微細構造学的に観察すると、骨端軟骨から続く一次海綿骨梁は不規則な形態を示す軟骨基質に不定形状に形成された骨基質で構成されていた(図2-A)。骨基質には高電子密度を示すセメントラインやリバーサルラインは観察されなかったが、海綿骨梁の軟骨・骨境界部には高電子密度の線状構造物が観

察された。さらに未脱灰標本では、骨梁の軟骨基質は石灰化していたが、その上に形成された骨基質の多くは斑点状の石灰化を示すなど、石灰化不全像を呈した。骨幹部においては石灰化軟骨基質とその周囲に斑点状の石灰化骨基質が観察され、広範囲な類骨層が観察された。また、セメントライン様の構造も観察されなかった。

M-CSF投与群の骨幹部はコントロールと同様の微細構造を呈した。一方、骨幹部においては、発達した波状縁を有する破骨細胞が認められるとともに、その直下には吸収窩が観察された。このような破骨細胞に隣接して楕円形状の骨芽細胞が観察され、それらは微細構造学的によく発達したゴルジ体と粗面小胞体で特徴づけ、活性型の骨芽細胞と考えられた(図2-B)。このような部位には、しばしば破骨細胞の直下から連続的な高電子密度の線状構造を示すリバーサルラインあるいはセメントライン様構造が認められた。この線状構造物を境にして、骨基質のコラーゲン細線維の密度や走行が異なっていた。

#### op/opマウスとM-CSF投与後のOPNの免疫局在

op/opマウスにおいては、骨幹部および骨幹部ともに、海綿骨梁の軟骨基質と骨基質の境界に沿ってOPNの弱い反応が認められた。また、骨基質表面にはほとんどOPNの反応は認められなかった。一方、M-CSF投与群の骨幹部ではコントロールとほぼ同様の局在を示した。また、骨幹部では軟骨基質と骨基質の境界にOPNの免疫反応が観察されたほか、TRACPase酵素組織反応とOPN免疫反応の二重染色を施すと、TRACPase反応陽性の破骨細胞直下の吸収窩に線状の強いOPNの陽性反応が認められた。また、吸収窩から続くリバーサルライン上にもOPNが検出され、そのOPN陽性の骨表面にALPase陽性を示す円形状の活性型骨芽細胞が局在して

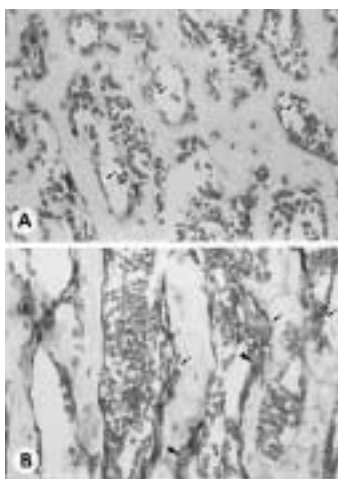


図1  
骨幹部におけるALPase蛋白, TRACPase活性の局在  
A: コントロールop/opマウス骨幹部。海綿骨梁上にALPase陽性の扁平化した骨芽細胞(矢印)が多数認められる。  
B: M-CSF投与op/opマウスの骨幹部。TRACPase陽性の破骨細胞(矢頭)およびリバーサルラインの近傍に、ALPase陽性で楕円形の骨芽細胞(矢印)が多数認められる。

いた。

#### 【考 察】

本研究の結果より、破骨細胞が存在しないop/opマウスでは活発な骨形成が保たれず、特に骨端部では弱いALPase反応と扁平化を呈する骨芽細胞しか観察されなかったことから、破骨細胞を欠いた状態では、骨芽細胞の機能は減弱していると考えられた。また、このことは不定形な形状を示す骨基質、およびそれらの石灰化不全といった基質の異常からも裏付けて考えることができた。一方、M-CSF投与により、破骨細胞は骨幹部に形成され、活発な骨吸収とそれに伴った骨芽細胞の活性化が観察されたことは、生体内における骨芽細胞の骨基質形成をはじめとする活性化は、破骨細胞による骨吸収とのカップリングによることが強く示唆された。破骨細胞が形成した吸収窩とそれに続くリバーサルラインに一致してOPNが観察されたことは、破骨細胞から分泌されたOPNが吸収窩へ蓄積され、そこへの骨芽細胞の誘導・接着・活性化に關与する可能性、あるいは、吸収窩に骨芽細胞から分泌されたOPNが吸着し、それがautocrine/paracrine的に作用することで骨芽細胞の接着、活性化を誘導する可能性が推測された。

#### 【参 考 文 献】

Nishino, I., Amizuka, N., Ozawa, H.: Histochemical Examination on Osteoblastic Activity in op/op Mice With or Without the Injection of Recombinant M-CSF, J.Bone Miner. Metab. (in press)

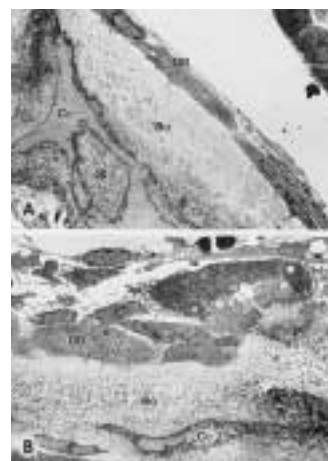


図2 コントロールおよびM-CSF投与op/opマウスにおける電顕所見

A: コントロールop/opマウス骨幹部。骨基質は、軟骨周囲のオスミウム好性領域(\*)と、その表面のコラーゲン細線維のまばらな類骨層で構成されている。骨基質の表面には扁平化した骨芽細胞が並んでいる。OB=骨芽細胞, Cc=軟骨, Bo=骨

B: M-CSF投与op/opマウスの骨幹部。破骨細胞はミトコンドリアに富み、発達した波状縁と明帯を有している。隣接する骨芽細胞は粗面小胞体に富み、発達したゴルジ体を有している。

OC=破骨細胞, OB=骨芽細胞, Cc=軟骨, Bo=骨