

氏名	大住 隆太
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5936号
学位授与の日付	平成31年3月25日
学位授与の要件	医歯薬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)
学位論文の題目	骨細胞 Sclerostin の脱負荷に伴う分布域変化の解析
論文審査委員	岡村 裕彦 教授 西田 崇 准教授 原 哲也 准教授

学位論文内容の要旨

論文内容の要旨（2000字程度）

【緒言】

寝たきりや宇宙生活に伴う機械的負荷の低下は骨量の減少を引き起こすことが知られている。機械的負荷は骨量をコントロールする決定的なファクターの一つであり、骨細胞が、機械的負荷の感受において重要な役割を果たす可能性が示唆されてきた。骨量の低下を引き起こすタンパク質の一つとして骨細胞特異的に分泌されるSclerostin(Scl)があり、骨の代謝調節において、骨形成の抑制因子として重要な役割を果たしている。Sclは脱負荷により産生量が増加、負荷により産生量が低下することが知られている。また、脱負荷下ではSclが広範囲に分布し、負荷下では分布が狭い範囲に限局する。しかし、機械的負荷にともなうSclの分布の変化に関する報告は乏しく、そのメカニズムは明らかにされていない。そこで、本研究ではそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【材料ならびに方法】

実験には、12週齢の雄性SDラットを10匹用いた。右側の坐骨神経、大腿神経をそれぞれ約5.0 mm区域切除し、左側にはシャム手術を施し、7日間飼育後、灌流固定を行い大腿骨を採取した。右側大腿骨をCut側、左側大腿骨をControl側と定義した。Cut側、Control側の骨量の定量にはpQCT法を用い遠位骨道端部及び骨幹部の骨量を評価した。Sclの領域単位の分布のパターンは、大腿骨骨幹部の冠状断切片にScl抗体を用いて蛍光免疫組織染色を施し、前方部、後方部、外側部、内側部の4領域に分けて、Scl抗体を標識した蛍光色素 (Alexa Fluor488)の蛍光輝度及びScl陽性骨細胞の割合の定量により解析した。機械的負荷に伴うScl分布の変化が生じやすい領域を特定後、骨細胞単位の分布のパターンは、Scl抗体を10 nm径の金コロイドで標識し透過型電子顕微鏡にて骨細胞内、骨小腔内、骨細管内のSclを観察し単位面積当たりの密度(金コロイドの個数/ μm^2)を定量し、評価した。

【結果および考察】

Sclの分布の変化を解析するには、骨細胞内、骨小腔内、骨細管内のSclを免疫電顕法で観察する必要があるが、電子顕微鏡で観察できるのは狭い範囲に限られるためまずは、広範囲に骨組織を観察し、機械的負荷に伴いSclの分布の変化が生じやすい領域を特定する必要がある。そこで、本研究では、ラットの下肢神経切断モデルを用い、蛍光免疫染色を施した骨組織を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、機械的負荷に伴いSclの分布の変化が生じやすい領域を特定し、その領域を免疫電顕法にて観察するという計画のもと実験を行った。pQCTにて、遠位骨幹部は、Cut側ではControl側と比較して皮質骨及び海綿骨の密度が低下していた。骨幹部では、皮

質骨及び海綿骨の密度はCut側、Control側間で有意差はなかった。しかし、大腿骨では成長板軟骨に近接する海綿骨が脱負荷により減少しやすいことが報告されているため、実験で用いた下肢神経切断モデルの妥当性が証明された。蛍光免疫組織染色では、蛍光輝度による解析から、Sc1の分布が機械的負荷により変化しやすい領域が大腿骨の外側部の領域であることが分かった。そこで、外側部領域のSc1の分布をより詳細に評価するために、Sc1陽性骨細胞の割合の定量を行った。その結果、外側部の骨膜側に近接する領域がSc1の分布の変化が生じやすいことが分かった。外側部の骨膜側に近接する領域で免疫電顕法による解析を行い、Cut側では、骨細管内のSc1の密度が優位に大きいことが分かった。一方、骨細胞内、骨小腔内のSc1の密度に2群間に優位差がなく、Sc1の産生量の変化が分布の変化に与える影響が少ない可能性が示唆された。過去の報告より、骨小腔内、骨細管内には体液が存在しており、その溶質の輸送様式の一つに液体の流動があることが明らかとなっている。筋活動や身体活動による機械的負荷は骨組織の変形を生じ、骨小腔や骨細管内の液体の流動を引き起こすことが明らかとなっている。また、Sc1等の大きな分子の溶質の輸送には、体液の流動による輸送が必要となる可能性を示唆する報告がある。以上の報告、本実験で得られた結果から脱負荷下のCut側では産生されたSc1は骨細管内に貯留し、一方、Control側では負荷が加わり骨細管内のSc1が体液の流動により骨細管外へ輸送されて消失しているという可能性が示唆された。

【結論】

機械的負荷に起因する骨細胞のSc1の分布の変化を免疫電顕法により解析することができた。脱負荷により、Sc1は骨細管領域において分布が著しく、負荷により骨細管領域の分布が減少することが判明した。それは、転写・翻訳レベルの違いに加えて、機械的負荷に伴う体液の流動による輸送の違いが関係している可能性が示唆された。本研究により、機械的負荷によるSc1の分布の変化の新たなメカニズムが存在する可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

機械的負荷は骨量をコントロールする重要なファクターの一つであり、骨細胞は機械的負荷の感受において重要な役割を果たしている。骨細胞から分泌されるSclerostin(Scl)は、骨形成の抑制因子として機能し、骨の代謝調節において重要な役割を果たしている。Sclは、骨組織に対する脱負荷によりその産生量が増加、反対に、負荷により産生量が低下する。また、機械的負荷の変化に応じて、Sclの骨組織内の分布範囲が変化する。しかし、脱負荷に伴うScl分布の分子細胞レベルの変化に関しては明らかになっていない。本研究は、脱負荷に伴うSclの分布変化の解析を目的とするものであった。

実験では、12週齢の雄性SDラットの右脚側のみ坐骨神経および大腿神経の区域切除を行い、7日間飼育した。神経切断(Cut)側、対照(Control)側の骨量の定量にはpQCT法を用い遠位骨端部および骨幹部の骨量を評価した。Sclの領域単位の分布のパターンは、大腿骨骨幹部の冠状断切片に抗Scl抗体を用いて蛍光免疫組織染色を施し、前方部、後方部、外側部、内側部の4領域に分けて、蛍光色素の蛍光輝度及びScl陽性骨細胞の割合を定量解析した。脱負荷に伴いSclの分布の変化が生じやすい領域を判定後、骨細胞単位の分布パターンを調べるため、金コロイド標識した抗Scl抗体を用いて免疫電顕を行った。透過型電子顕微鏡にて骨細胞・骨小腔・骨細管内の金コロイド数を計測し、単位面積当たりの密度(金コロイドの個数/ μm^2)を定量して、評価した。

pQCT法による骨量解析の結果、骨幹部の骨密度は両群間で差はなかったが、遠位骨端部は、Cut側で有意に骨量低下が認められたことから、本研究の下肢神経切断モデルの妥当性が証明された。

蛍光免疫組織染色では、蛍光輝度による解析から、Sclの分布が脱負荷により変化しやすい領域が大腿骨の外側部の領域であることを明らかにした。次に、外側部領域のSclの分布をより詳細に評価するために、Scl陽性骨細胞の割合の定量を行い、外側部の骨膜側に近接する領域がSclの分布の変化が生じやすいことを明らかにした。

骨幹部外側の骨膜側に近接する領域で免疫電顕法による解析を行い、Cut側で、骨細管内のSclの分布密度が大きいことを見出した。一方、骨細胞・骨小腔内のSclの密度は両群間に有意差がなく、Sclの産生量の変化が分布の変化に与える影響が少ない可能性が示唆された。以前の報告より、骨小腔・骨細管内には体液が存在しており、その溶質の輸送に液体の流動が関与することが知られている。筋活動や身体活動による機械的負荷は骨組織の変形を生じ、骨小腔や骨細管内の液体の流動を引き起こす。よって、Sclの輸送には、体液の流動による輸送が重要となることを示唆する報告もなされている。以上の知見と本研究で得られた結果から、Cut側で生じる脱負荷下の条件では産生されたSclは骨細管内に貯留する一方、Control側では負荷が加わり骨細管内のSclが体液の流動により骨細管外へ輸送されて消失しているという可能性が示唆された。

今回得られた新たな知見は、脱負荷に伴うSclの分布の変化の違いを示すものであり、今後寝たきりや宇宙空間滞在に伴う骨量の減少に対するSclを標的とした新たな治療法の発展につながることを期待される。よって、審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。