

学位研究紹介
--------

## 骨髄における破骨細胞分化に関する間質細胞の役割

### Role of stromal cells in osteoclast differentiation in bone marrow

新潟大学医歯学総合研究科  
口腔生命科学専攻摂食環境制御学講座  
咬合制御学分野  
**近藤由香里**

Department of Tissue Regeneration and Reconstruction, Division  
of Orthodontics, Section for Oral Life Science, Niigata University  
Graduate School of Medical and Dental Science.  
Yukari Kondo

#### 【目 的】

破骨細胞は造血幹細胞由来であり、その分化には骨芽細胞や骨髄間質細胞によって形成される微小環境が重要な役割を担っていると考えられている。最近では骨芽細胞系細胞による破骨細胞分化誘導因子（ODF）の発現など、破骨細胞の分化・活性化におけるアルカリフォスファターゼ（ALP）活性陽性の骨芽細胞系細胞の役割が主として共存培養系を用いて明らかにされてきた。しかしながら、実際の骨髄組織においては、これらの細胞がどのように関わり合っているのか形態学的に不明な点が多い。

本研究では、まず骨髄間質細胞の分布とその性質を明らかにする為に、骨髄中のALP活性陽性細胞の局在と細網線維の分布を比較検討し、さらにそれらの細胞と酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ（TRAP）活性陽性の破骨細胞系細胞との局在関係を検索する事によって、骨髄中の破骨細胞の分化・誘導における骨髄間質細胞の役割を形態学的に検討した。

なお本研究では、ALP活性陽性細胞とTRAP活性陽性細胞の局在関係をより詳細に検討する目的で、未脱灰試料の樹脂切片を用いた酵素組織化学的二重染色手法の開発・応用も試みた。

#### 【材料と方法】

8週齢のWistar系ラットをアルデヒド固定液にて灌流固定後、脛骨を取り出し4℃にて2時間浸漬固定した。EDTA脱灰試料あるいは未脱灰試料をアセトン系列にて

脱水し、パラフィンおよびテクノビット、エポキシ樹脂に包埋した。切片作成後、ALPとTRAPの酵素組織化学およびALPとODFの免疫組織化学的な検出を行い顕微鏡観察した。鍍銀染色はパラフィン切片を用いて行った。また厚さ50μmのマイクロスライサー切片に鉛法によるALP酵素組織化学を施した後、エポキシ樹脂に包埋・薄切し、顕微鏡観察を行った。

#### 【結果と考察】

ALPは骨芽細胞系細胞の指標として用いられているが、その酵素活性は脱灰や脱水の過程あるいは樹脂の重合熱によって失活するため、従来の方法では樹脂切片上での酵素活性検出は困難であった。しかし本研究では、脱灰による影響を避けるために未脱灰試料を用い、脱水時間を短縮するためにアセトン系列にて脱水を行い、さらに重合熱を避けるためにテクノビット樹脂低温包埋重合法を用いる事で、樹脂切片上でのALP活性の検出が可能となった。さらに同一樹脂切片上でALPとTRAPの酵素組織化学的二重染色手法を施す事によって、骨芽細胞系細胞と破骨細胞系細胞の局在関係をより詳細に検索することが可能となった。

ALPの酵素活性は、細胞質に富む骨芽細胞、骨芽細胞と血管との間に介在する紡錘形の骨芽細胞系細胞、骨髄中の線維芽細胞様間質細胞の細胞膜に認められた。またこれらの細胞は、抗ALP抗体に対しても免疫陽性反応を示した。ALP陽性細胞は互いに細胞質突起によって接触し、骨髄中に網状構造を形成していた。一方、鍍銀によって染色される細網線維も骨髄中に広がる網状構造を形成しており、その分布はALP陽性の線維芽細胞様間質細胞によって形成される網状構造とほぼ一致することが示された。従って、骨髄中のALP陽性線維芽細胞様間質細胞は細網線維を分泌するいわゆる細網細胞であることが同定された。しかしながら、細網線維は骨髄中にほぼ均一に分布していたのに比較し、強いALP活性を示す線維芽細胞様間質細胞は骨表面近くに多く分布していた。従って骨髄中央部と骨近接領域では骨髄間質細胞の機能や性質に差がある可能性も示唆された。

ALPとTRAPの酵素組織化学的二重染色を施した同一樹脂切片の観察では、TRAP陽性の単核細胞の多くは、強いALP活性を示す線維芽細胞様間質細胞に接触している事が示された。また多核の破骨細胞の血管側にもALP陽性の線維芽細胞様間質細胞が破骨細胞を取り囲むように局在しており、それらが細胞突起で破骨細胞に接触している像が認められた。

ODFの免疫局在は線維芽細胞様間質細胞に認められ、ALP陽性細胞はODF陽性と考えられた。また、ODFとTRAPの二重染色所見から、ODF陽性の線維芽細胞様間質細胞はTRAP陽性の単核細胞と接触している事が確認された。

電顕観察でも、ALP陽性の細胞が長い細胞質突起を伸ばし、単核の前破骨細胞や多核の破骨細胞に接触している像が観察され、これらの細胞同士の緊密な関係が示唆された。

以上の結果から、骨髄中のALP陽性の線維芽細胞様間質細胞はいわゆる細網細胞であることが明らかとなった。それらの細胞は骨髄中に広がる細胞性網状構造を形成しており、ALPならびにODF陽性の線維芽細胞様間質細胞は、破骨細胞の分化を支持する微小環境を形成している事が形態学的に明らかとなった。また破骨細胞の前駆細胞はこれらの細胞が形成する細胞性ネットワークに接しながら分化し、骨表面まで誘導されている可能性が示唆された。

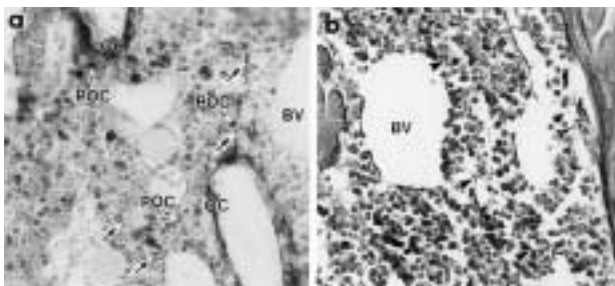


Fig. 1 .a,b

a: TRAPとALPの二重染色 Fibroblastic stromal cell(矢印)の細胞膜にALP活性が検出された。

b: 鍍銀染色による細網線維の検出 Reticular fiber(矢頭)が骨髄中にネットワークを形成している。

OB:osteoblast. OC:osteoclast. POC:preosteoclast. BV:blood vessel.

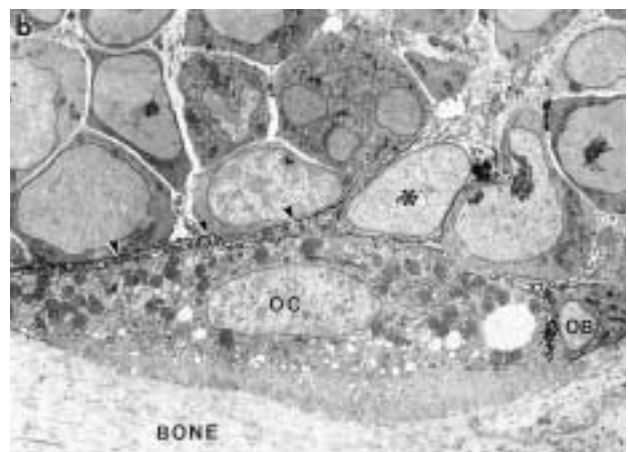
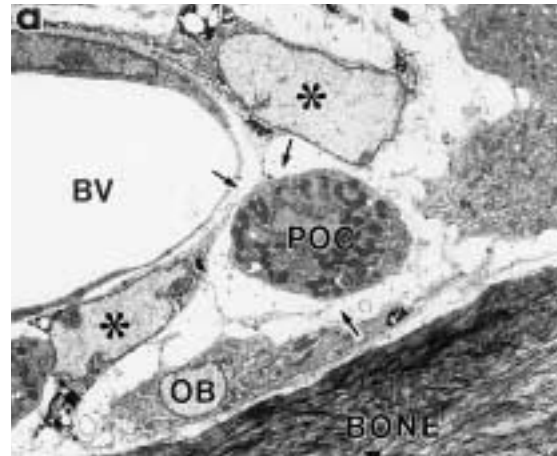


Fig. 2 .a,b

a: Preosteoclast ( POC ) はfibroblastic stromal cell ( 星印 ) の細胞突起 ( 矢印 ) と接触している。

b: ALP活性は破骨細胞の血管側表面を取り囲んでいるfibroblastic stromal cell ( 星印 ) の細胞突起 ( 矢頭 ) に検出された。

OB:osteoblast. OC:osteoclast. BV:blood vessel.