博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏　　名	佐野　博繁
学　　位	博士（医学）
学位記番号	新大院博（医）第　699　号
学位授与の日付	平成28年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Intravital bone imaging by two-photon excitation microscopy to identify osteocytic osteolysis in vivo. （2光子励起顕微鏡を用いた骨細胞性骨溶解解明の試み）
論文審査委員	主査　教授　片貝　智哉 副査　教授　遠藤　直人 副査　教授　佐藤　昇

博士論文の要旨

背景

骨細胞は，骨組織内の細胞のうち90-95%を占める最も多く存在する細胞で，骨基質中の骨小腔に存在している。生存期間は長く，ヒトに於いては数十年にわたると考えられている。骨細胞に顕著な形態学的特徴として，発達した多数の細胞突起があり，この突起を骨基質中に伸ばし，骨細胞同士あるいは骨表面に位置する骨芽細胞と互いに連絡している。骨形態上は骨細胞を擁する骨小腔と，それに連続する骨細胞の突起を含む骨細管が存在し，骨組織中に骨小腔・骨細管ネットワークを形成している。近年、骨細胞において破骨細胞分化因子（receptor activator of NF-κB ligand：RANKL）が強発現し，著しい破骨細胞分化支持能を有するなど多彩な機能が解明されつつある。

骨細胞性骨溶解という骨細胞も骨吸収を行いうるという概念は 1962 年に電子顕微鏡を用いた骨小腔の形状観察から Baud によって報告された。しかし、1970 年代後半になると骨標本作成中のアーチファクトであるとする論文や、骨細胞の単離培養によっても吸収窩が形成されなかったとする論文が報告され、その概念は支持されなくなった。しかし、近年、再び授乳、スクレロスチンや、微重力環境下で骨小腔が拡大したとする論文が散見され、その概念が再認識されつつある。

近年、2 光子励起顕微鏡を用いて生体内での骨組織内の微小環境を解析する手法が確立された。申請者らは、本手法を用いて生体内での骨細胞の機能評価を試みたので報告する。

方法

2光子励起顕微鏡を用いて野生型マウスの脛骨に対して in vivo イメージングを行った。 マウスは吸入麻酔下に脛骨内側近位部軟部組織を展開し、皮質骨を露出させた後、作成した固定台を用いて観察を行った。2光子励起顕微は正立型（ライカ社 SP5）を用い水浸対物レンズを用いて観察した。励起光は870 nm、吸収フィルターは430/80 nm、500/50 nm、565/605 nmを使用し、付随するソフトウェア、イマリス(Bitplane)を用いて画像処理を行った。

骨標識剤であるカルセインを3日前に皮下注射したマウスの脛骨皮質骨を2光子励起顕微鏡で観察すると骨小腔はカルセインによって描出された。また、露出した骨表面に蛍光色素ローダミンを添加すると速やかに骨表面から骨小腔・骨細管ネットワークを介して骨深部まで浸透することから、ローダミンを基盤としたpH応答性蛍光化学プローブ(RhP-EF)を用いて骨組織内の骨小腔における酸性環境の評価を試みた。これらの手法を駆使し、坐骨神経切除による不動性骨粗鬆症モデルでの骨小腔の面積、および酸性環境について解析を行った。10 週齢野生型マウス雌(C57BL/6)を用いて一側は坐骨神経切除術、反対側は偽手術を行った。手術により一側の坐骨神経麻痺を呈したマウスの脛骨近位部は、術後 10 日目μCT にて著明に骨量が減少していることを確認した。このモデルマウスを用いて2光子励起顕微鏡で解析を行った。

結果

骨小腔の面積および酸性環境の評価では、各脛骨内側近位部あたり無作為に5視野を抽出し、各視野の表層より 15-25 μm を解析領域とし、0.5 μm 毎に画像を撮影後し解析を行った。カルセインで描出された各骨小腔において、解析領域で最大面積を呈した画像を評価対象として解析を行うと、坐骨神経切除側では偽手術側に比し、有意に骨小腔の面積が拡大していた（141.9 ± 40.0 vs. 119.0 ± 40.5 μm2; p < 0.0001)。骨小腔内での酸性領域は偏在して存在しており、その解析は酸性領域で骨小腔に接する RhP-EF の蛍光輝度と骨小腔を描出するカルセインの蛍光輝度との相対比によって算出すると、坐骨神経切除側では有意に RhP-EF の相対蛍光強度の増強を認めた（3.01 ± 1.94 vs. 2.07 ± 1.43 a.u.; p = 0.0012)。さらに骨小腔壁とそれに接する酸性領域面の占拠率も有意に増大していた（0.37 ± 0.18 vs. 0.27± 0.14; p = 0.0006)。

骨小腔における骨表面から 20μm での RhP-EF の蛍光輝度実測値はそれぞれ坐骨神経切除側 30.00± 13.11、偽手術側 21.12±11.57 であった(p < 0.0001)。摘出した脛骨を各 pH 濃度に調整した溶媒に浸透させた後、観察した RhP-EF の蛍光輝度は酸性強度依存性の増強を認めた(y = 8.209e0.4234x、R2 = 0.9864)。算出した近似式より推定された pH はそれぞれ 5.9、6.8 であった。

考察と結論

生体内において，破骨細胞は pH 4〜6 の酸性領域で骨吸収を行っていることから，坐骨神経切除を施行した脛骨皮質骨内での骨小腔では，骨の脱灰を遂行しうる酸性環境であることが判明した。骨小腔の面積が有意に拡大していたことから同部において骨基質の脱灰が生じたものと考えられた。

審査結果の要旨

骨細胞性骨溶解という骨細胞も骨吸収を行いうるという概念は 1962 年に電子顕微鏡を用いた骨小腔の形状観察から Baud によって報告されたが、その後支持されなくなっていた。しかし最近、その概念が再認識されつつある。本研究では、近年確立された2光子励起顕微鏡による生体骨組織内の微小環境を解析する手法を用いて、生体内における骨細胞の機能評価を試みた。

骨標識剤であるカルセインを3日前に皮下注射したマウスの脛骨皮質骨を2光子励起顕微鏡で観察すると骨小腔がカルセインによって描出された。また、坐骨神経切除側では偽手術側に比し、有意に骨小腔の面積が拡大していた。ローダミンを基盤としたpH応答性蛍光化学プローブ(RhP-EF)を用いて骨組織内の骨小腔における酸性環境の評価を試みると、骨小腔内での酸性領域は偏在して存在しており、坐骨神経切除側では有意に RhP-EF の相対蛍光強度の増強を認めた。

したがって，坐骨神経切除を施行した脛骨皮質骨内での骨小腔では，骨の脱灰を遂行しうる酸性環境で

あることが判明した。骨小腔の面積が有意に拡大していたことから同部において骨基質の脱灰が生じたものと考えられた。

本研究は、整形外科学分野ならびに生体イメージングの技術的進展に寄与する重要な成果であり、学位論文として十分に価値のあるものであると判断される。