

## 学 位 研 究 紹 介

## マウス尾椎の軟骨内一次骨化におけるアルカリ性ホスファターゼとオステオポンチンの局在

## Localization of Alkaline Phosphatase and Osteopontin during Endochondral Ossification in the Developing Cartilage of Coccygeal Vertebrae.

<sup>1)</sup> 新潟大学大学院医歯学総合研究科<sup>2)</sup> 松本歯科大学歯科医学総合研究所佐々木朝代<sup>1)</sup>, 網塚憲生<sup>1)</sup>, 小澤英浩<sup>2)</sup><sup>1)</sup> Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science<sup>2)</sup> Matsumoto Dental University Institute for Dental ScienceTomoyo Sasaki<sup>1)</sup>, Norio Amizuka<sup>1)</sup>, Hidehiro Ozawa<sup>2)</sup>

## 【目的・背景】

アルカリ性ホスファターゼは従来から基質石灰化との関連性が指摘されており、一方、非コラーゲン性骨基質タンパク質であるオステオポンチンは石灰化抑制タンパクと考えられているため、これらは軟骨内骨化における軟骨基質の石灰化制御に重要な役割を果たすと推測される。また、オステオポンチンはインテグリン $\alpha_v\beta_3$ と特異的な結合を示すRGDS (RGD) 配列をもつことから、破骨細胞、骨芽細胞あるいは血管内皮細胞の細胞・骨基質間の接着機構にも関与することが示唆される。軟骨内骨化では、軟骨カラム間に石灰化軟骨基質が形成されることに始まり、その後軟骨小腔に血管内皮細胞が侵入、石灰化軟骨コアが露出し骨基質が沈着する事で一次骨梁が形成される。従って本研究では、軟骨内骨化を軟骨基質の初期石灰化と軟骨小腔への血管侵入の二つの段階に分け、アルカリ性ホスファターゼとオステオポンチンがこれらの段階に関与する形態学的知見を明らかにすることを目的とした。椎骨の一次骨化が連続的に観察できるマウス尾椎を用いた手法により、軟骨細胞の分化に連動した軟骨基質内の石灰化とその関連タンパクであるアルカリ性ホスファターゼ、オステオポンチンの局在を組織細胞化学的、微細構造学的に検索した。

## 【材料と方法】

生後4日のICRマウスの尾部を4%パラホルムアルデヒドにて固定し、未脱灰もしくは脱灰試料をパラフィンおよびテクノビットに包埋し矢状断切片を作製した。これら試料において、石灰化基質のvon Kossa染色、アルカリ性ホスファターゼと酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの酵素組織化学、オステオポンチン免疫組織化学の多重染色をおこなった。また、*in situ* hybridizationによりオステオポンチンmRNAの局在を検出した。さらに、EponまたはLR white に包埋した未脱灰試料を用いて、それぞれ石灰化軟骨基質の微細構造とpost-embedding法によるオステオポンチンの免疫電顕観察をおこなった。

## 【結果と考察】

石灰化軟骨基質におけるアルカリ性ホスファターゼとオステオポンチンの局在

4日齢マウスの第22尾椎は小塊状の軟骨組織で、軟骨細胞は肥大化を示さずアルカリ性ホスファターゼ活性や細胞外基質の石灰化は認められなかった。それに対して、より近位側の第21尾椎では椎体中央の軟骨細胞が肥大化を呈し、それらの細胞膜と周囲の軟骨基質にアルカリ性ホスファターゼ活性が観察された。また、軟骨基質のアルカリ性ホスファターゼ活性に一致して、von Kossa染色陽性を示す石灰化軟骨基質が認められた。しかしながら、このような軟骨基質の初期石灰化部位にはオステオポンチンの局在は認められなかった。さらに、第20尾椎では肥大化細胞層の軟骨基質は広く石灰化し、石灰化軟骨基質の表面に一致した線状のオステオポンチン強陽性反応が観察された(図1-A)。免疫電顕による観察においても初期石灰化基質にはオステオポンチンが認められず、肥大化層の石灰化軟骨基質の極表層にオステオポンチンが観察された(図2-B)。以上、軟骨基質の石灰化初期において、石灰化抑制タンパクであるオステオポンチンが認められなかったことは、オステオポンチンが多量に存在する膜性骨化の初期石灰化と大きく異なる結果であり、軟骨内骨化ではオステオポンチン以外の基質タンパクやproteoglycanが初期石灰化の制御に関与する可能性が考えられた。

血管侵入におけるオステオポンチンの局在変化

次に、軟骨原器が血管侵入を受ける前後で、石灰化基

質とオステオポンチンとの局在を軟骨細胞の分化段階と比較検索した。血管侵入以前では、増殖層下層からアルカリ性ホスファターゼと石灰化基質が認められ、それに遅れて肥大化層上層の石灰化基質の辺縁にオステオポンチンの局在が検出された。一方、破骨細胞を伴った血管侵入を受けると、アルカリ性ホスファターゼと初期石灰化軟骨基質は血管侵入前と同様に増殖層下層から観察されたが、オステオポンチンの局在は肥大化層下層に認められ、血管侵入に伴って血管側へとその局在が限局する傾向を示した。この現象は*in situ* hybridizationの結果においても同様に認められた。このことから、オステオポンチンは石灰化ばかりでなく血管内皮細胞の誘導や、それら細胞の細胞・基質間接着に参与する多機能タンパクである可能性が示唆された。

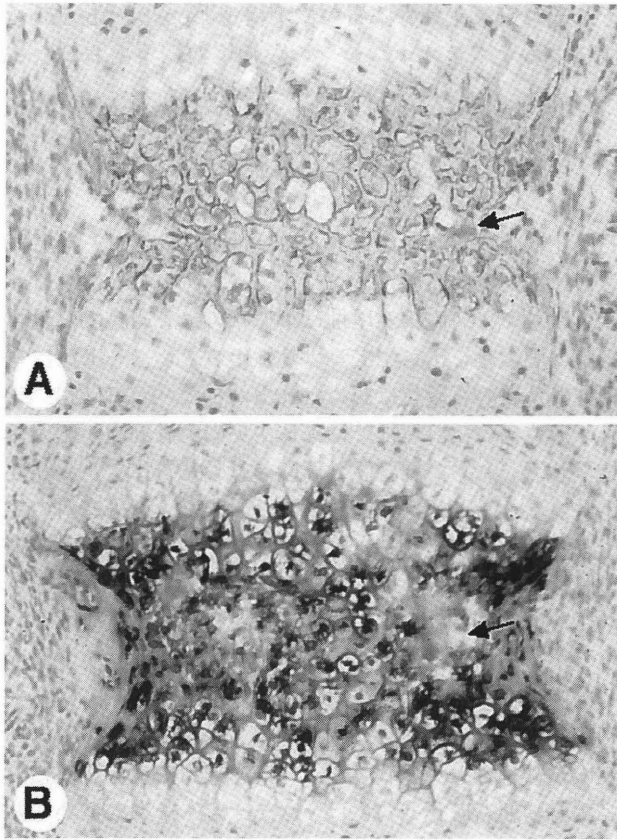


図1  
マウス尾椎軟骨の全体像。A,B共に矢印の部位に血管侵入がみられる。  
A: 免疫組織化学によるオステオポンチンの観察。肥大化軟骨小腔の小腔壁に沿って、オステオポンチンタンパクの局在を示す強い陽性反応が認められる。  
B: *in situ* hybridization。肥大化軟骨細胞にオステオポンチンのmRNA発現が認められる。

## 【結 論】

軟骨の分化に連動してアルカリ性ホスファターゼと石灰化の開始がみられ、オステオポンチンはその後の石灰化制御に関係する可能性があること、さらに血管侵入後は骨原生細胞や破骨細胞系細胞の走化性や接着にも関与し、その結果一次骨化における血管侵入を制御する可能性が示唆された。

## 【参考文献】

Sasaki, T. Amizuka, N. Ozawa, H.: Localization of Alkaline Phosphatase and Osteopontin during Matrix Mineralization in the Developing Cartilage of Coccygeal Vertebrae, Arch Histol.Cytol., Vol.63, p.271-284, 2000.

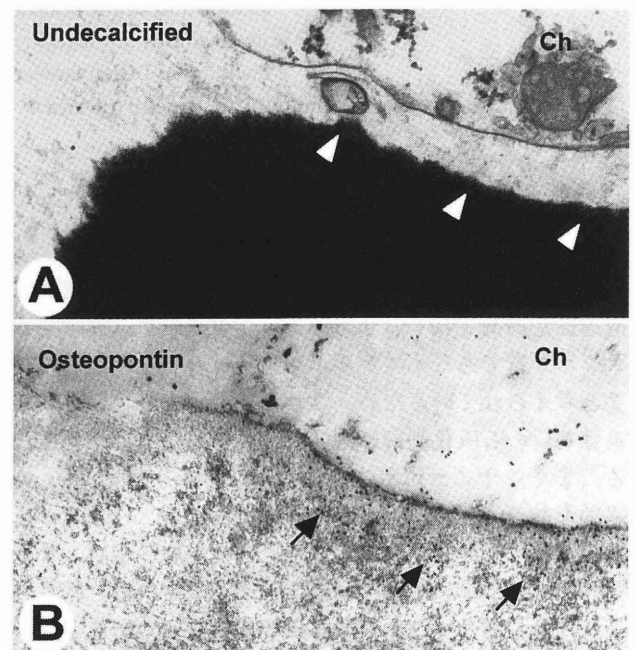


図2  
電子顕微鏡による肥大化軟骨細胞と軟骨基質の観察。  
A: 未脱灰切片による観察。軟骨基質の石灰化部位が高電子密度に観察される。矢頭で石灰化軟骨基質の表層を示す。Ch:軟骨細胞。  
B: 脱灰切片によるオステオポンチンの免疫電顕。矢印の部位にオステオポンチンの局在を示す金粒子の集積が観察される。これらは、Aで矢頭の示す部位に一致する。Ch:軟骨細胞。