



Mechanical fragmentation and transportation of calcium phosphate substrate by filopodia and lamellipodia in a mature osteoclast

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2010-10-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 永房, 鉄之 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1956

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 4 6 5 号	学位授与年月日	平成 21 年 6 月 19 日
氏 名	永 房 鉄 之		
論文題目	<p>Mechanical fragmentation and transportation of calcium phosphate substrate by filopodia and lamellipodia in a mature osteoclast</p> <p>(成熟破骨細胞におけるフィロポディアおよびラメリポディアによるリン酸カルシウム基質の力学的破壊および運搬)</p>		

博士(医学) 永 房 鉄 之

論文題目

Mechanical fragmentation and transportation of calcium phosphate substrate by filopodia and lamellipodia in a mature osteoclast

(成熟破骨細胞におけるフィロポディアおよびラメリポディアによるリン酸カルシウム基質の力学的破壊および運搬)

論文の内容の要旨

[はじめに]

破骨細胞は骨吸収機能を有する多核細胞である。この細胞において、偽足と称されるフィロポディアおよびラメリポディアは細胞移動においては重要な機能を果たすが、骨吸収過程における機能については不明である。そこで本研究では、リン酸カルシウム(CP)をコートしたカバースリップ上に破骨細胞を培養し、ビデオ強化型微分干渉顕微鏡法(VEC-DIC マイクロスコーピー)を用いて、骨吸収活動中である成熟破骨細胞のフィロポディアおよびラメリポディアの動態および機能について解析した。

[材料ならびに方法]

生後 2-8 日齢の日本白色家兔の四肢長管骨を破碎し、得られた細胞を CP コートカバースリップ上で 5 % CO₂、37 °C 下で 90 分間培養を行い、非接着細胞を除去し成熟破骨細胞を単離した。成熟破骨細胞は核が 3 個以上あるものとし、実験終了後に酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP)染色にて確認した。全ての実験は細胞単離後 4-24 時間で行い、観察には VEC-DIC マイクロスコーピーを用いた。40 倍および 100 倍の対物レンズを備えた倒立型微分干渉顕微鏡により細胞の観察を行い、その微分干渉画像を CCD カメラで取得し、デジタル画像処理装置によりリアルタイムにコントラスト強調を行った。一連の画像はビデオモニターで観察しながら、画像取得解析装置で記録および解析を行った。画像記録間隔は 3 秒で、35 °C の条件下に行い、破骨細胞の形態学的変化、特にフィロポディアおよびラメリポディアの動態について観察を行った。また CP 消失領域の面積計測およびその時間的变化、CP 粒子の移動軌跡とフィロポディアおよびラメリポディアの動態との関連について解析した。

[結果]

40 倍の対物レンズによる観察にて CP 消失領域に近接した多核の破骨細胞が鮮明に確認でき、多くの細い線維状のフィロポディアが細胞体部より CP 残存領域および消失領域に放射状に伸びているのが記録できた。また CP 消失領域近くの細胞内に液胞がみられ、その反体側に細胞核がみられた。フィロポディアの観察では細胞体部より伸びたフィロポディアの先端が CP 基質に接着しており、基質より CP 粒子をはがし、先端に粒子を捕らえたまま細胞体部まで移動させる様子が記録できた。3 個の細胞につきその移動距離と移動時間を計測したが、それぞれ 9.2 μm / 10 min、11.0 μm / 6 min、7.0 μm / 8 min であり、いずれもほぼ時間に比例して移動距離が増加した。また 100 倍の対物レンズを用い細胞下も含めて CP 消失領域を計測した結果、記録開始時に 195 μm^2 であった CP 消失領域は 30 分後には 279 μm^2 、60 分後には 417 μm^2 、120 分後には 647 μm^2 まで増加した。なおこの過程において、画面右方向への細胞移動がみられた。また同細胞におけるラメ

リポディアの観察ではCP消失領域外のCP基質まで広がったラメリポディアは基質を細かな粒子に破壊し、またラメリポディアが収縮することによりCP粒子を一塊として細胞体表面まで移動させる様子が記録できた。

[考察]

本研究において VEC-DIC マイクロスコープを用いることにより、CP コートカバースリップ上に培養した成熟破骨細胞のフィロポディアおよびラメリポディアの動態および CP 消失領域の形成を観察できた。VEC-DIC マイクロスコープは生細胞のダイナミックな形態変化の評価や、生理学的反応を明らかにできる手法である。この手法により破骨細胞におけるフィロポディアおよびラメリポディアは CP 基質の力学的破壊と運搬機能を有するという新しい知見が得られた。象牙片上での観察では移動中の破骨細胞は骨吸収を行わないとの報告があるが、CP コートカバースリップ上での本研究では移動中においてもCP消失領域は増加しており、基質の違いが影響している可能性がある。なお骨吸収により生じた分解産物は偽足様形態を示す波状縁よりエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれるとされるが、本実験では波状縁の存在は確認できず、波状縁での骨吸収活動におけるフィロポディアおよびラメリポディアの機能は解明できなかった。また 100 倍レンズを用いて細胞下の CP 基質部に焦点を合わせることで、細胞周辺のみならず細胞下の CP 消失領域も解析できた。この手法を使えば生細胞のまま破骨細胞の活動性を定量的に解析することが可能であり、骨粗鬆症治療薬に対する破骨細胞の形態学的反応を評価できる可能性がある。

[結論]

本研究により、CP コートカバースリップ上に培養した成熟破骨細胞における、フィロポディアおよびラメリポディアの細胞移動以外の機能である CP 基質の力学的破壊および運搬機能が明らかになった。また VEC-DIC マイクロスコープを用いることにより、破骨細胞の活動性を定量解析できる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

破骨細胞は骨吸収機能を有する多核細胞である。この細胞において、偽足と称されるフィロポディアおよびラメリポディアは細胞移動においては重要な機能を果たすが、骨吸収過程における機能については不明である。そこで本研究において申請者は、リン酸カルシウム(CP)をコートしたカバースリップ上に破骨細胞を培養し、ビデオ強化型微分干渉顕微鏡法(VEC-DIC マイクロスコープ)を用いて、骨吸収活動中である成熟破骨細胞のフィロポディアおよびラメリポディアの動態および機能について解析した。

生後 2-8 日齢の日本白色家兔の四肢長管骨を破碎し、得られた細胞を CP コートカバースリップ上で 5% CO₂、37℃ 下で 90 分間培養を行い、非接着細胞を除去し成熟破骨細胞を単離した。成熟破骨細胞は核が 3 個以上あるものとし、実験終了後に酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP)染色にて確認した。全ての実験は細胞単離後 4-24 時間で行い、観察には VEC-DIC マイクロスコープを用いた。40 倍および 100 倍の対物レンズを備えた倒立型微分干渉顕微鏡により細胞の観察を行い、その微分干渉画像を CCD カメラで取得し、デジタル画像処理装置によりリアルタイムにコントラスト強調を行った。一連の画像はビデオモニターで観察しながら、画像取得解析装置で記録

および解析を行った。画像記録間隔は3秒で、35 °C の条件下に行い、破骨細胞の形態学的変化、特にフィロポディアおよびラメリポディアの動態について観察を行った。また CP 消失領域の面積計測およびその時間的变化、CP 粒子の移動軌跡とフィロポディアおよびラメリポディアの動態との関連について解析した。

40 倍の対物レンズによる観察にて CP 消失領域に近接した多核の破骨細胞が鮮明に確認でき、多くの細い線維状のフィロポディアが細胞体部より CP 残存領域および消失領域に放射状に伸びているのが記録できた。また CP 消失領域近くの細胞内に液胞がみられ、その反体側に細胞核がみられた。フィロポディアの観察では細胞体部より伸びたフィロポディアの先端が CP 基質に接着しており、基質より CP 粒子をはがし、先端に粒子を捕らえたまま細胞体部まで移動させる様子が記録できた。3 個の細胞につきその移動距離と移動時間を計測したが、それぞれ $9.2 \mu\text{m} / 10 \text{ min}$ 、 $11.0 \mu\text{m} / 6 \text{ min}$ 、 $7.0 \mu\text{m} / 8 \text{ min}$ であり、いずれもほぼ時間に比例して移動距離が増加した。また 100 倍の対物レンズを用い細胞下も含めて CP 消失領域を計測した結果、記録開始時に $195 \mu\text{m}^2$ であった CP 消失領域は 30 分後には $279 \mu\text{m}^2$ 、60 分後には $417 \mu\text{m}^2$ 、120 分後には $647 \mu\text{m}^2$ まで増加した。なおこの過程において、画面右方向への細胞移動がみられた。また同細胞におけるラメリポディアの観察では CP 消失領域外の CP 基質まで広がったラメリポディアは基質を細かな粒子に破壊し、またラメリポディアが収縮することにより CP 粒子を一塊として細胞体表面まで移動させる様子が記録できた。

VEC-DIC マイクロスコピーは生細胞のダイナミックな形態変化の評価や、生理学的反応を明らかにできる手法である。この手法により破骨細胞におけるフィロポディアおよびラメリポディアは CP 基質の力学的破壊と運搬機能を有するという新しい知見が得られた。この手法を使えば生細胞のまま破骨細胞の活動性を定量的に解析することが可能であり、骨粗鬆症治療薬に対する破骨細胞の形態学的反応を評価できる可能性がある。本研究により、CP コートカバースリップ上に培養した成熟破骨細胞において、フィロポディアおよびラメリポディアが CP 基質の力学的破壊および運搬機能に関与することが明らかになった。また VEC-DIC マイクロスコピーを用いることにより、破骨細胞の活動性を定量解析できる可能性が示された。

審査委員会では、破骨細胞機能の新しい解析システムを確立した点、またフィロポディアおよびラメリポディアの機能に関して新しい知見を報告した点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 破骨細胞はなぜ多核なのか
- 2) 破骨細胞は分裂するのか
- 3) リン酸カルシウムコートカバースリップについて
- 4) matrix protein について
- 5) 微分干渉顕微鏡の原理について
- 6) TRAP 染色について
- 7) フィロポディアとラメリポディアの定義について
- 8) 破骨細胞の動く方向性を規定する因子について
- 9) 破骨細胞が接着するメカニズムについて
- 10) 当該領域の先行研究について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	佐藤 康二		
	副査	金山 尚裕	副査	橋本 賢二