

ヒト骨形成蛋白を用いた脊柱靱帯骨化症モデルに  
おける骨化過程ならびに石灰化機構に関する微細  
形態学的細胞化学的解析

星 和 人

①

ヒト骨形成蛋白を用いた脊柱靱帯骨化症モデルに  
おける骨化過程ならびに石灰化機構に関する微細  
形態学的細胞化学的解析

星 和 人

## 目次

	頁
第 I 章 緒言	1
第 II 章 実験 1 : ヒト骨形成蛋白 (recombinant human BMP-2, rhBMP-2) を用いたマウス脊柱靱帯骨化モデルの作成とその形態学的解析	
II-1 まえおき	6
II-2 実験材料及び方法	7
II-3 実験結果	9
II-4 考察	12
II-5 小括	16
第 III 章 実験 2 : rhBMP-2 により誘導される靱帯線維芽細胞の軟骨細胞化と軟骨内石灰化における超微形態学的免疫組織化学的变化	
III-1 まえおき	29
III-2 実験材料及び方法	30
III-3 実験結果	33
III-4 考察	35
III-5 小括	39

第IV章 実験3：正常マウスにおける組織非特異型アルカリホスファターゼの免疫細胞組織化学的局在

IV-1 まえおき	52
IV-2 実験材料及び方法	53
IV-3 実験結果	56
IV-4 考察	57
IV-5 小括	61

第V章 実験4：胎生期ラット頭蓋骨の石灰化機構の微細形態学的組織細胞化学的観察

V-1 まえおき	73
V-2 実験材料及び方法	75
V-3 実験結果	78
V-4 考察	79
V-5 小括	82

第VI章 総括

97

謝辞	102
----	-----

参考文献	104
------	-----



## 第1章 緒言

脊柱靱帯骨化症は、脊柱管内に存在する脊柱靱帯、すなわち後縦靱帯あるいは黄色靱帯が病的に骨化して脊髓を徐々に圧迫する麻痺性疾患である。本疾患は後縦靱帯では頸椎に、黄色靱帯では胸椎に好発するため、重篤な慢性対麻痺を来す<sup>1</sup>。さらにこの疾患は骨化の進展に伴い麻痺が持続的に進行するため、治療に難渋することが希ならずある。一方、本疾患の有病率は、諸外国が約0.4%であるのに対し、本邦では1~3%と高く、わが国における整形外科や神経外科学領域の主要な課題となっている<sup>2,3</sup>。しかし、成因に関しては、椎間板説<sup>4</sup>、エストロゲン説<sup>5</sup>、微小損傷説<sup>6</sup>、サイトカイン説<sup>7</sup>、フッ素説<sup>8</sup>などの仮説が立てられているものの、どれも実証されておらず、この病気の発症機序は依然不明である。

臨床病理学的検索においては、Ono et alが骨化巣と正常靱帯との境界部には軟骨様組織が存在することを観察しており、内軟骨骨化により骨化が生じる事を推測している<sup>9</sup>。また、Okada et alも黄色靱帯骨化症の手術例において、骨化層の頭尾側両端で軟骨様組織の形成を観察しており、骨化巣が内軟骨骨化で形成されると推測している<sup>10</sup>。このように、病巣部の骨化形態は一部で膜性骨化が見られるものの主として内軟骨性骨化であると考えられている<sup>9,11</sup>。また、病巣が靱帯の骨付着部(enthesis)と連続性を保っており<sup>9,11</sup>、靱帯の骨付着部の変化

が病態機序において重要な役割を果たしている事が推測されいる<sup>12</sup>。しかし現在までに報告された臨床病理標本は、剖検もしくは手術時の標本であり、ほとんどが病期の進行しているものなので、靱帯組織の初期変化や病変完成までの過程を観察することが困難である。そのために発症機序解明に有用な糸口は十分には得られていない。そこで、脊柱靱帯骨化症における靱帯の骨化機構を解明するためには、靱帯の骨化を再現し、その過程を詳細かつ包括的に解析できる実験モデルの作成とその微細形態学的細胞化学的検索が必須であると考えた。

一方、Kawaguchi et alは、脊柱靱帯骨化症の患者からの病理標本で免疫組織化学を行ない、脊柱靱帯骨化の病変部に bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) と transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) が存在する事を示した<sup>7</sup>。元来、BMP-2やTGF- $\beta$ はTGF- $\beta$ スーパーファミリーの一員であり、BMP-2には皮下や筋肉内にキャリアーとともに移植すると異所性の骨もしくは軟骨の誘導する効果が、TGF- $\beta$ には骨膜下に移植すると骨形成を増強する効果がそれぞれあり、ともに骨形成に深く関与する蛋白である<sup>13,14</sup>。したがって、

Kawaguchi et alの所見は、BMP-2やTGF- $\beta$ を含むTGF- $\beta$ スーパーファミリーが脊柱靱帯骨化症の発症に何らかの因果関係があることを示唆している。さらに、Miyamoto et alは実際に、粗製BMPをpellet状にしてマウスの腰椎の背部脊髄硬膜外腔に外科的に移植し、粗製BMPがin vivoで靱帯に骨化を

誘導できることを確認した<sup>17</sup>。

そこで、本編では実験1として、本疾患の起因物質の候補の一つであるBMP-2を靱帯の骨化誘導剤として用い、脊柱靱帯骨化症の病理像を包括的に把握し、靱帯組織の分化過程を解明することを目的とし、細胞レベルでの形態解析が可能な新規モデルを確立し、このモデルを組織学的、組織化学的に観察した。

さらに、実験2では外因性のBMPによる靱帯線維芽細胞の初期変化を詳細に検討することが発症機序の解明につながると考え、確立した実験モデルを用い、靱帯線維芽細胞の微細形態学的変化ならびに細胞外基質の石灰化現象を透過型電子顕微鏡で観察した。また、alkaline phosphatase(ALPase)の局在を明らかにすることにより靱帯組織の骨、軟骨への分化を検索するとともに、本症における骨形成性のサイトカインであるBMP-2およびTGF- $\beta$ の役割を検討するため、それらのリガンドまたはレセプターの免疫組織化学的局在を検索した。

一方、実験2で検索されたALPaseは骨芽細胞や石灰化する軟骨細胞に局在しており、一般に骨、軟骨への分化マーカーとして使用されているが、その生理的機能は未知である。元来、ALPaseは、骨芽細胞や軟骨細胞において局所のカルシウム・リンイオン積の押し上げ<sup>18</sup>やヒドロキシアパタイト(HA)結晶の成長阻害物質の除去<sup>19</sup>により骨、軟骨における石灰化に関与すると推測されてきた。しかし、いずれの説も証明されてはおらず、その酵素の局在に関しても、酵素組織化学的検索のみで、

蛋白レベルでの局在を示した報告はない。

実験3では、脊柱靱帯の骨化においても重要な役割を果たすと予想されるALPaseの生理的機能を解析するためには、生体組織内での蛋白の局在を明らかにすることが不可欠と考え、組織レベルあるいは細胞レベルでのALPaseの局在を免疫組織細胞化学的手法で明らかにした。

さらに、細胞外基質において起こる生物学的石灰化現象は内軟骨性骨化や膜性骨化における主要な過程の一つであり、一連の骨化過程が起こるためには必須のステップと考えられる。したがって、この石灰化機構の解明は、脊柱靱帯の骨化においても、その機序の理解の一助となるとともに、病変進行の予防法を確立する手がかりになる可能性がある。

現在、骨基質や軟骨基質の石灰化、すなわち生物学的石灰化に関しては、靱帯の石灰化同様、基質小胞性石灰化とコラーゲン性石灰化を経て生じることが知られている<sup>20,22</sup>。しかし、プロテオグリカンやピロリン酸等のHA結晶形成・成長抑制物質が豊富に存在している生体内で、HA結晶がどのような機序で成長し、コラーゲンなどの有機成分とどのような相互関係を保っているかは未知である。

実験4では、靱帯骨化における石灰化現象の機序を解明する事を目的として、初期石灰化の形態学的解析が容易である胎生期ラット頭頂骨を用い、骨や靱帯に豊富に存在し骨代謝や石灰化に深く関与するデコリンとコラーゲン性石灰化の關係に着眼し、超微形態学的、免疫組織細胞化学的に解析した。

最後に、これらの結果を元に本論文における概要、ならびに

脊柱靱帯骨化症における骨化過程ならびに石灰化機構を、ALPaseの免疫組織化学的知見や生物学的石灰化の超微形態学的知見を交えて総括した。

## 第II章 実験1 ヒト骨形成蛋白 (recombinant human BMP-2, rhBMP-2) を用いたマウス脊柱靱帯骨化モデルの作成とその形態学的解析

### II-1 まえおき

脊柱靱帯骨化モデルに関しては、自然発生的モデルとしてはtwyマウス<sup>23</sup>、Zucker fatty rat<sup>24</sup>などが、人工モデルとしては、フッ素投与家兎<sup>25</sup>などが報告されているが、これらのモデルは靱帯の骨化領域が小さいため脊椎を圧迫するには至らない。また、Miyamoto et alは、粗製BMPをpellet状にしてマウスの腰椎の背部脊椎硬膜外腔に外科的に移植し骨化を誘導し、黄色靱帯が骨化した事を確認したが<sup>17</sup>、このモデル動物においては外科的侵襲による組織破壊のため靱帯組織の同定が困難で、細胞レベルでの形態の解析が難しいという欠点があった。従って、本章の目的は、靱帯骨化の過程を詳細にかつ包括的に解析するため、rhBMP-2溶液をマウス黄色靱帯周囲に浸潤する実験モデルを確立する事である。さらに、このモデルを使い、脊柱靱帯の骨化の過程を組織学的に経時的に観察するとともに、Azan染色やelastica van Gieson染色を用い膠原線維や弾性線維の変化を検索し、細胞や細胞外基質の構造変化を透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて解析した。また、破骨細胞の局在を同定するために酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAPase)を酵素組織化学的に検出し、細胞外基質の組成の変化を検索するために、骨基質に多く含まれているI型コラーゲンある



いは軟骨基質に特異的なII型コラーゲンの免疫組織化学を行った。

## II-2 実験材料及び方法

**rhBMP-2の注入** 12週齢の雄ddYマウス(Nihon SLC, Hamamatsu, Japan)の腰椎黄色靱帯を使用した。この週齢のマウス腰椎においては、棘突起の先端を結ぶ線の中点直下2mmの部位に靱帯中央部が存在している。そこで、黄色靱帯にBMPを投与するため、ジエチルエーテルによる吸入麻酔後、マウスの腰部正中の皮膚を約1cm切開し、腰部筋膜越しに棘突起の先端を確認し、棘突起間に27G注射針を垂直に刺入した。100 $\mu$ lのグルタミン酸緩衝液(pH 4.5)に溶かしたrhBMP-2 40 $\mu$ g(山之内製薬株式会社からのご供与)を浸潤させた。BMPを投与した動物は全部で50匹であった(表1)。

**対照** 対照群には同方法で溶解液のみを100 $\mu$ l注入した。対照群に用いた動物は全部で20匹であった(表1)。なお、黄色靱帯の正常構造の観察には、対照群における溶解液非注入部位の腰椎黄色靱帯を用いた。

**標本作製** BMP溶液または溶解液注入後1、2、3、6週でそれぞれジエチルエーテルによる吸入麻酔およびペントバービタルナトリウム(Dainabot, Osaka, Japan) 30mg/kgの腹腔内投与による麻酔を行った後に灌流固定を行った。灌流固定は、固定液100mlを5分間で左心室から注入した。パラフィン包埋用の試料および凍結切片用試料の固定液には、0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.40)によって

緩衝した4%パラフォルムアルデヒド溶液を、エポキシ樹脂包埋用には0.065Mカコジル酸緩衝液(pH7.40)によって緩衝した2%グルタルアルデヒド溶液及び2.5%パラフォルムアルデヒド溶液の混合溶液(pH7.40)を用いた。灌流固定後、BMP-2または溶解液を注入した腰椎を一塊として摘出し、それぞれの固定液に4°Cで2時間浸漬した。脱灰には、パラフィン包埋用および凍結切片用試料に関しては10%EDTAを用い4°C3週間、エポキシ樹脂包埋用試料に関しては4.13%EDTAを用い4°C3週間浸漬した。その後、パラフィン包埋用試料はエタノール脱水後パラフィンに包埋し、凍結切片用試料は10%精製白糖より20%、25%と順次濃度を上げながら浸漬した後、液体窒素で凍結した。エポキシ系樹脂包埋用試料に関しては、7%寒天に包埋し、厚さ200 $\mu$ mにmicroslicer DTK-1000 (DSK, Kyoto, Japan)で薄切り、0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.4)で緩衝した1% OsO<sub>4</sub>で後固定した後アセトン脱水し、Poly/Bed 812 (Polysciences, Warrington, PA)に包埋した。使用した動物の内訳は表1のごとくである。

**組織学的観察** パラフィン包埋された試料を厚さ5 $\mu$ mに薄切して、Azan染色あるいはelastica van Gieson染色を行った。脊柱管狭窄の評価は元来の脊柱管径に対するBMP-2で誘導された骨軟骨組織による突出の割合を、連続切片で計測し、その最大値を狭窄率とした。

**酵素組織化学的観察** TRAPase活性は、厚さ5 $\mu$ mに薄切したパラフィン包埋試料を脱パラフィンし、Van De Wijngaertらの方法にもとずき、AS-BIphosphate (Sigma, St. Louis, MO)を基



質としたアゾ色素法で検出した<sup>26</sup>。核染にはメチルグリーン染色を用いた。

**微細構造の観察** 脱灰試料に関しては、MT-II (Sorovall, Newtown, CT)で超薄切切片を作成し、超薄切片を得た。0.2%タンニン酸水溶液、酢酸ウラン、クエン酸鉛による3重染色を施し、TEM(日本電子JEM-100CX II、JOEL、Tokyo、Japan)で観察した。

**免疫組織化学的観察** 兎抗ラットI型コラーゲン抗体 (Chemicon, Temecula, CA)および兎抗牛II型コラーゲン抗体 (LSL, Tokyo, Japan)による免疫染色では、1.5%過酸化水素のメタノール溶液を用い、室温で10分間内因性ペルオキシダーゼ除去を行い、2.5% hyaruloniidase (Sigma)で室温で60分間処理を行い、1% bovine serum albumin PBS溶液(1% BSA-PBS, Seikagaku, Tokyo, Japan)溶液で室温で30分ブロッキングを行った。一次抗体は希釈倍率100倍で4・C12時間、二次抗体は希釈倍率100倍の horseradish peroxidase (HRP)標識ヤギ抗兎IgG抗体 (Dakopatts, Glustrup, Denmark)で室温1時間反応させ、その後DAB溶液で発色させた<sup>27</sup>。

一次抗体の特異性に関する対照実験には、一次抗体の代わりに非免疫兎血清を用いた。

核染はメチルグリーンで行った。

## II-3 実験結果

黄色靱帯骨化の出現頻度と脊柱管狭窄率 BMP-2を注入したマウス50匹のうち14匹に黄色靱帯またはその周囲に軟骨及び骨形成が観察された。その他のマウス36匹では、黄色靱帯以外の組織の反応、すなわち筋肉や皮下組織の軟骨化あるいは骨化が見られたか、もしくは全く反応が見られなかった。脊柱管の狭窄は3週まで徐々に増加した。すなわち、BMP-2注入1週では10%程度、2週では20%、3週では30-50%の狭窄が見られたが、6週では10%以下に減少していた。対照群の黄色靱帯では特異的な反応は見られなかった。以下の研究では黄色靱帯周囲に見られた特異的な反応に注目した。(表1)

組織学的研究 対照群のAzan染色像では、黄色靱帯は、頭側と尾側の椎弓をつなぐ線維性結合組織として観察され、正常組織と同様な像を呈していた(図1a)。この靱帯は、背側で傍脊柱筋と、腹側で脊髄硬膜と隣接していた。強拡大で観察すると靱帯中央部では扁平な線維芽細胞が平行に走行する太い線維束の間に観察され、靱帯の椎弓への付着部では円形の細胞が観察された。

BMP-2注入後1週では靱帯付着部で、線維成分が減少し、軟骨が出現した。また靱帯中央部でも線維芽細胞が増殖していた(図1b)。注入後2週では、靱帯組織は軟骨組織に置換されていた。これらの軟骨組織には、増殖軟骨細胞及び肥大化軟骨細胞様細胞が観察された。この時期の靱帯中央部の多くの細胞は増殖軟骨細胞様細胞の形態を呈している一方、靱帯付着部の細胞は肥大化軟骨細胞様細胞の像を呈していた。さらに、靱帯付着部周辺には、血管侵入が観察された(図1c)。

3週ではBMP-2により誘導された骨及び軟骨による脊椎への圧迫が著明となった(図1d)。

6週では、BMPで誘導された軟骨はほぼ完全に骨組織で置換されており、かつての靭帯中央部にわずかな軟骨組織を残すのみとなった。(図1e)

また、弾性線維を同定するため、elastica van Gieson染色を行った所、正常黄色靭帯は、弾性線維を豊富に含む腹外側層と、弾性線維と膠原線維とが混在している背側層との2層より構成されており、腹外側層の存在する靭帯傍正中部では弾性線維が密に観察されたものの(図2a,b)、背側層のみで構成される靭帯正中部では膠原線維の基質に弾性線維が散在性に観察された(図2c,d)。対照群でも同様の構造が観察された。

BMP投与2週では、誘導された軟骨組織において断片化した弾性線維が疎に観察され(図2e,f)、6週では弾性線維はさらに減少し、残存する軟骨部にわずかに観察されるのみであった(図2g,h)。

骨化過程における細胞外基質の変化とTRAPase活性の組織化学的变化 細胞外基質の経時的変化を評価するため、I型及びII型コラーゲンの免疫染色を行った。BMP-2注入後1週では、異所性軟骨組織内に見られる太い線維束がI型で染色され(図3a)、II型は軟骨小腔の縁に沿って強く染色された(図3b)。注入後2週ではI型で染色される太い線維束は減少し、細胞外基質におけるII型の染色性が増加した(図3c,d)。

II型を多く含む軟骨組織において、血管侵入が観察された。この領域にはTRAPase陽性の破軟骨細胞が観察された(図4)。

黄色靱帯内の線維芽細胞の軟骨細胞化 BMP-2注入後1週のトルイジンブルー切片では、靱帯線維の間に軟骨細胞様細胞が散在しており、その軟骨細胞様細胞周囲にはメタクロマジーを示す領域が観察された(図5a)。

TEMによる観察でも、靱帯線維芽細胞が経時的に軟骨細胞様細胞へと変化する過程が観察された。対照群の細胞はコラーゲンの太い線維に囲まれた扁平な線維芽細胞であった(図5b)。一方、BMP-2注入後1週では、靱帯細胞は紡錘化し、細胞外基質にはコラーゲンの太い線維が減少し、代わりに細い線維が観察された。また、この時期のBMP誘導軟骨細胞様細胞は粗面小胞体に富んでおり、コラーゲンの太い線維と細い線維が混在する細胞外基質を有していた(図5c)。注入後2週ではコラーゲンの太い線維は減少し、細い線維で囲まれ、小腔を有す菱形の細胞が観察された(図5d)。

## II-4 考察

これまでBMP移植実験には、BMPの拡散を遅延させ、骨、軟骨形成を促進するために種々のキャリアーが用いられてきたが<sup>13,28,32</sup>、本研究では、手術による組織損傷から靱帯組織の微細構造を守るために、rhBMP-2を溶液のまま注入した。rhBMP-2の投与量は従来<sup>13</sup>の報告では数 $\mu\text{g}$ から50 $\mu\text{g}$ であり、今回の実験でも投与量を40 $\mu\text{g}$ とその範囲に収めた<sup>13,28,32</sup>。溶液の体積は靱帯組織以外への漏出を少なくするために100 $\mu\text{l}$ におさえた。また、注入回数も組織損傷を最小限に食い止めるために、注入回数を1回とした。

その結果、50匹中14匹約30%の動物の靱帯に、BMP-2の影響による組織学的変化が観察された。残りは、切片上で他の部位に骨化が見られたものと、切片上には骨化巣が見られなかったものが含まれており、前者は靱帯周囲に浸潤させたBMPが漏出したものと考えられ、後者も組織切片で観察した領域以外で骨化が生じてたものと推測された。

BMP-2の影響が観察できた靱帯では、BMP-2注入法を採用したことにより組織を非侵襲的に取り扱えたので、靱帯細胞のBMP-2による経時的な形態変化を細胞レベルで観察することができた。その結果、BMP-2を投与した靱帯組織において、扁平な線維芽細胞、円形細胞、軟骨細胞様細胞が、経時的に現れ、扁平な線維芽細胞が外因性のBMP-2により軟骨細胞様細胞に分化する事が示唆された。臨床病理でも椎間板ヘルニアの患者の黄色靱帯に軟骨様細胞があることをTEMで観察しており<sup>32</sup>、ヒトにおいても靱帯線維芽細胞が軟骨細胞様細胞へ分化する可能性が指摘されている。従って、靱帯線維芽細胞には軟骨細胞様細胞に分化する能力があり、BMP-2には *in vivo* で、その分化を誘導できる作用があると考えられた。

一方、今回の実験では、靱帯の線維芽細胞がBMP-2により骨芽細胞に分化した像は観察されなかった。*in vitro* ではBMP-2が fibroblastic cell line C3H10T1/2や、osteoblast precursor cell line ROB-C26、myoblast cell line C2C12、bone marrow stromal cell line W-20-17を骨芽細胞に分化させたが<sup>34,37</sup>、*in vivo* の実験では皮下や筋肉内に植えたBMP-2は軟骨形成や軟骨内骨化を誘導する<sup>13</sup>。このような *in vivo* と *in vitro* での相

違は、酸素やメカニカルストレスの違いが間葉系線維芽細胞から骨、軟骨あるいは線維組織への分化の引き金になることを示唆した古典的な研究からわかるように、細胞密度や酸素分圧を含む環境の相違によるものと考えられた<sup>38</sup>。

また線維芽細胞が軟骨細胞様細胞への分化に伴い、細胞外基質の変化が観察された。elastica van Gieson染色の結果、黄色靱帯に含まれる豊富な弾性線維は、BMPによる軟骨誘導とともに著しく減少することが明らかとなった。弾性線維は、項靱帯や黄色靱帯、あるいは動脈壁等に豊富に局在しており、化学組成としては疎水性アミノ酸や不飽和脂肪酸、多糖類により構成され<sup>39,40</sup>、電子顕微鏡像では、電子密度の高いamorphousな物質として観察される。本研究では、BMP注入部位が膠原線維の含有量が比較的多い靱帯正中部であったため、電顕的観察あるいは組織化学的観察において膠原線維が観察されたものと推測された。なお、靱帯の軟骨化に伴う弾性線維の減少機構は今後の検討を要す。

一方、膠原線維においては、免疫組織化学的検索により、靱帯組織の細胞外基質の主要な組成であるの一つであるI型コラーゲンが、BMPの投与によりII型コラーゲンによって置換されることが明らかとなった。TEMによる観察の結果を免疫組織化学の所見と照らしあわせると、扁平な線維芽細胞や円形細胞の周囲の太い線維はI型コラーゲンに対応し、細い細線維はII型コラーゲンに対応しており、靱帯線維芽細胞が、線維軟骨様軟骨細胞を経て硝子軟骨様軟骨細胞へと分化する過程が明らかとなった。

さらに、硝子様となった軟骨は血管侵入を受けた。この血管の周



図には、TRAPase陽性破軟骨細胞が観察され、内軟骨性骨化に合致した所見を呈していた。

一方、病理所見では、本実験モデルで見られるような広範な軟骨形成や、それに続発する急速な骨化は一般には観察されない。また靱帯に生じた骨化巣による脊髄への圧迫状況に関しても、脊柱管に突出した骨化巣の占拠率は、BMP-2注入後3週まで急激に増加するが、その後は減少傾向を示した。それに対し、実際の患者では脊髄を圧迫する骨化巣は数十年以上にわたり維持される。このように、ヒトとラットとの種差を考慮しても、病巣の拡大範囲や病期の進行様式には本実験モデルからの所見と臨床像には相違点がある。

しかし、緒言で述べたように従来臨床病理的観察も骨化過程が主に内軟骨骨化であり、本モデルの骨化様式と類似していた<sup>9,12</sup>。

また、病変の進行形式に関しても、本モデルでは一連の過程が注射部位が中央でも、靱帯付着部より生じていた。靱帯付着部は enthesis と呼ばれ<sup>41</sup>、靱帯層、線維軟骨層、石灰化線維軟骨層、及び骨層よりなる解剖学的構造単位である。多くの脊柱靱帯の骨化に関する所見も、骨化病変が靱帯の付着部から骨へ連続しており<sup>10,11</sup>、靱帯の骨付着部の骨化が靱帯に沿って拡大すると予測されている<sup>12</sup>。

異所性骨化が内軟骨性骨化で生じる事と、骨化が付着部から起こることの二つの事実から考えると、この実験モデルにおける靱帯が骨化する過程は、今まで報告された臨床病理像と類似しており、同様な機序で靱帯組織が骨へと置換されて行くものと推測された。したがって、本実験モデルは脊柱靱帯骨化症における靱帯の病的変化や骨化形式を類似するモデルと考えられた。

## II - 5 小括

rhBMP-2をマウス腰椎黄色靱帯に注入するモデルにおいて、靱帯線維芽細胞が軟骨細胞様細胞へ分化し、誘導された軟骨が内軟骨性骨化の様式で骨へ置換されること、これらの反応が靱帯付着部より始まることが明らかとなった。したがって、本実験モデルは、靱帯の病的分化ならびに骨化様式を類似する系であることが確認された。



番号	週	包埋	群	骨化部位	狭窄率
1	1	Paraffin	実験	靱帯	0.12
2	1	Paraffin	実験	靱帯	0.10
3	1	Paraffin	実験	なし	
4	1	Paraffin	実験	なし	
5	1	Paraffin	実験	なし	
6	1	Paraffin	対照		
7	1	Paraffin	対照		
8	1	Poly/Bed	実験	靱帯	
9	1	Poly/Bed	実験	なし	
10	1	Poly/Bed	実験	なし	
11	1	Poly/Bed	実験	なし	
12	1	Poly/Bed	実験	なし	
13	1	Poly/Bed	対照		
14	1	Poly/Bed	対照		
15	1	Frozen	実験	靱帯	
16	1	Frozen	実験	靱帯	
17	1	Frozen	実験	なし	
18	1	Frozen	実験	なし	
19	1	Frozen	実験	なし	
20	1	Frozen	対照		
21	1	Frozen	対照		
22	2	Paraffin	実験	靱帯	0.20
23	2	Paraffin	実験	靱帯外	
24	2	Paraffin	実験	なし	
25	2	Paraffin	実験	なし	
26	2	Paraffin	実験	なし	
27	2	Paraffin	対照		
28	2	Paraffin	対照		
29	2	Poly/Bed	実験	靱帯	
30	2	Poly/Bed	実験	靱帯外	
31	2	Poly/Bed	実験	なし	
32	2	Poly/Bed	実験	なし	
33	2	Poly/Bed	実験	なし	
34	2	Poly/Bed	対照		
35	2	Poly/Bed	対照		

番号	週	包埋	群	骨化部位	狭窄率
36	2	Frozen	実験	靱帯	
37	2	Frozen	実験	靱帯外	
38	2	Frozen	実験	なし	
39	2	Frozen	実験	なし	
40	2	Frozen	実験	なし	
41	2	Frozen	対照		
42	2	Frozen	対照		
43	3	Paraffin	実験	靱帯	0.50
44	3	Paraffin	実験	靱帯	0.30
45	3	Paraffin	実験	靱帯外	
46	3	Paraffin	実験	靱帯外	
47	3	Paraffin	実験	なし	
48	3	Paraffin	対照		
49	3	Paraffin	対照		
50	3	Poly/Bed	実験	靱帯	
51	3	Poly/Bed	実験	靱帯外	
52	3	Poly/Bed	実験	靱帯外	
53	3	Poly/Bed	実験	なし	
54	3	Poly/Bed	実験	なし	
55	3	Poly/Bed	対照		
56	3	Poly/Bed	対照		
57	3	Frozen	実験	靱帯	
58	3	Frozen	実験	靱帯外	
59	3	Frozen	実験	靱帯外	
60	3	Frozen	実験	なし	
61	3	Frozen	実験	なし	
62	3	Frozen	対照		
63	3	Frozen	対照		
64	3	paraffin	実験	靱帯	0.05
65	6	paraffin	実験	靱帯	0.00
66	6	paraffin	実験	靱帯外	
67	6	paraffin	実験	靱帯外	
68	6	paraffin	実験	なし	
69	6	paraffin	対照		
70	6	paraffin	対照		

表1 実験動物

# 表1 実験動物

番号：動物番号、週：BMP溶液もしくは溶解液注入後の経過期間、  
包埋：包埋方法、狭窄：脊柱管狭窄率、Paraffin：パラフィン包埋標本、Poly/Bed：Poly/Bed包埋標本、Frozen：凍結標本、靱帯：骨化巣が靱帯内あるいは周囲に見られるもの、靱帯外：骨化巣が靱帯以外の部位に見られるもの、なし：骨化巣が見られないもの、  
実験：実験群、対照：対照群。

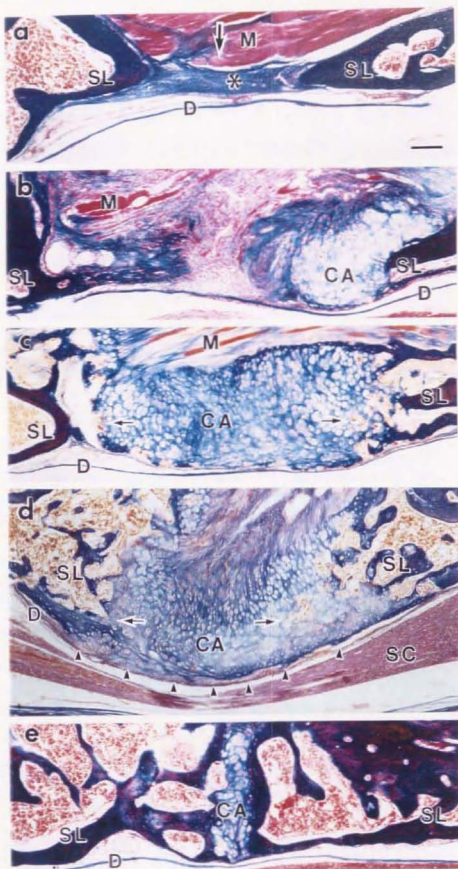


图 1

図1 黄色靱帯の組織学的変化、Azan染色、70倍、Bar=0.1mm

a: 対照群。黄色靱帯(\*)は膠原線維に富んでいるため青色に濃染される。矢印は注入部位を示している。(動物番号6)

b: BMP-2注入後1週。黄色靱帯の椎弓への付着部に軟骨の形成が観察される。この領域のコラーゲン線維は著明に減少していた。靱帯の中央部でのコラーゲン線維の配列は粗造になっていた。(動物番号1)

c: 2週。靱帯組織はほぼ軟骨により置換されていた。靱帯中央部では増殖軟骨細胞様細胞が観察される一方、付着部では肥大化軟骨細胞様細胞が観察された。付着部周囲では血管侵入が見られた(矢印)。(動物番号22)

d: 3週。骨化が進行し、脊髓を圧迫していた(矢頭)。両側の靱帯付着部に血管侵入が観察される(矢印)。靱帯中央部は肥大化軟骨細胞様細胞で占められており、ごく一部に増殖軟骨細胞様細胞が見られる。(動物番号43)

e: 6週。BMPにより誘導された軟骨は、中央部にわずかに残るのみでほぼ骨に置換されていた。(動物番号64)

CA: 軟骨組織、SL: 椎弓、M: 筋肉、D: 脊髓硬膜

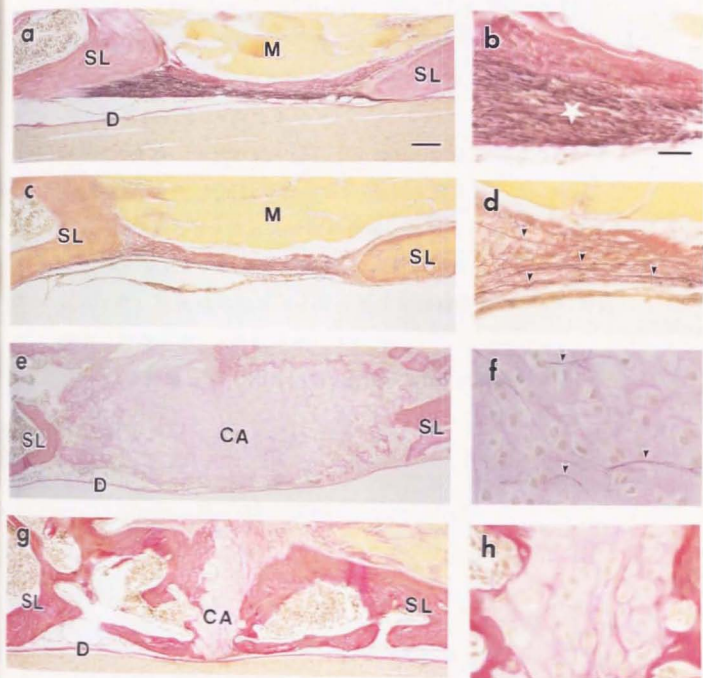




図2 黄色靱帯の組織学的変化、elastica van Gieson染色、

(a, c, e, g: 70倍 Bar=0.1mm、b, d, f, h: 275倍 Bar=0.5mm)

a, b: 対照群、矢状断傍正中部。この部位の黄色靱帯は膠原線維と弾性線維が混在している背側層と、弾性に富んだ腹外側層(星印)により構成される。(動物番号6)

c, d: 対照群、矢状断正中部。この部位の黄色靱帯には膠原線維と弾性線維(矢頭)が混在している。(動物番号6)

e, f: BMP投与後2週、矢状断正中部。誘導された軟骨組織において、弾性線維(矢頭)が散在していた(動物番号22)

g, h: 6週。中央部の軟骨で、残存する弾性線維がわずかに観察されるのみであった。(動物番号64)

CA: 軟骨組織、SL: 椎弓、M: 筋肉、D: 脊髄硬膜

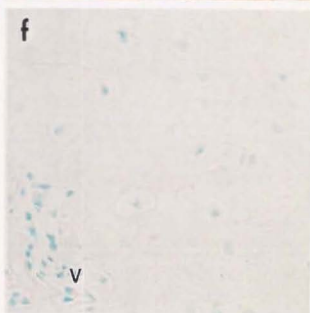
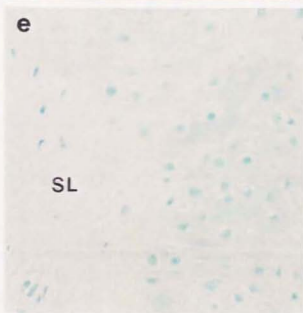
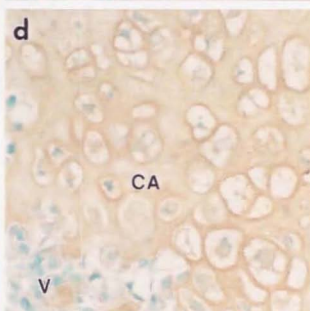
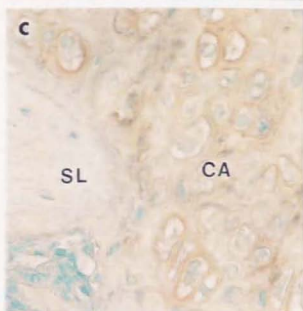
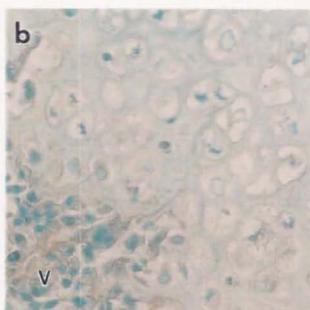
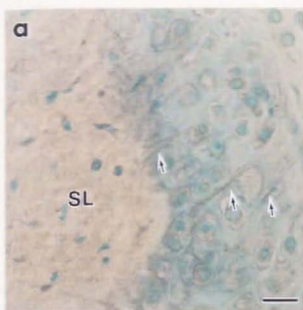


図3 I型およびII型コラーゲンの免疫組織化学的所見、275倍

Bar=0.5mm

a: I型コラーゲンの免疫組織化学、BMP-2注入後1週。太い線維束に免疫反応が観察された(矢印)。(動物番号1)

b: I型、2週。I型陽性の太い線維束は減少した。(動物番号22)

c: II型、1週。軟骨小腔の周囲にはII型コラーゲンの免疫反応が観察される。(動物番号1)

d: II型、2週。II型に対する細胞外基質の免疫染色性は増加していた。(動物番号22)

e: 対照実験、1週。非免疫兔血清を用いた対照実験では特異的な反応は見られない。(動物番号1)

f: 対照実験、2週。特異的な反応は見られない。(動物番号22)

SL: 椎弓、CA: 軟骨、V: 血管侵入



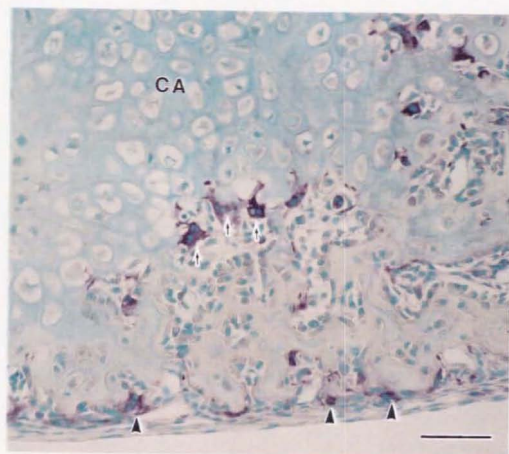


図 4

図4 BMP-2注入後2週のTRAPase活性、140倍 Bar=0.5mm  
血管侵入部位において、TRAPase陽性破骨細胞(矢印)が観察され  
る。また硬膜側にも破骨細胞(矢頭)が観察される。CA: 軟骨組織  
(動物番号22)



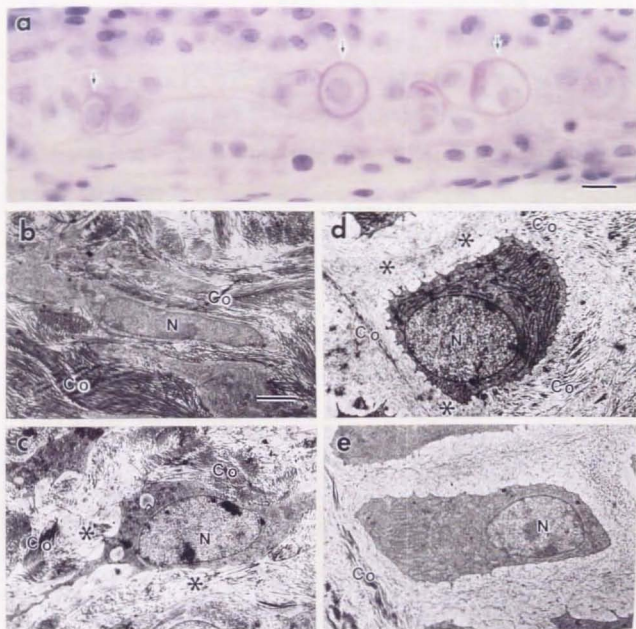


图 5

## 図5 靱帯線維芽細胞の軟骨細胞化

a: BMP-2注入後1週、凍結切片、トルイジンブルー染色。

靱帯線維の間に、メタクロマジーを示す領域で囲まれた軟骨細胞様細胞が観察される(矢印)。1000倍 Bar=10 $\mu$ m(動物番号16)

b-c: 靱帯細胞の微細構造、TEM像、4000倍 Bar=2.5 $\mu$ m

b: 対照群。扁平な線維芽細胞は太いコラーゲン細線維に囲まれていた。(動物番号13)

c: 1週。線維芽細胞は円形化し、細胞外基質中にはコラーゲンの太い細線維と細い細線維(\*)が観察される。(動物番号8)

d: 1週。BMPで誘導される軟骨細胞様細胞周囲には、太いコラーゲン細線維の間に細い細線維(\*)が見られる。(動物番号8)

e: 2週。軟骨細胞様細胞は細いコラーゲン細線維(\*)に囲まれていた。(動物番号29)

Co: 太いコラーゲン細線維、N: 核

### 第Ⅲ章 実験 2 rhBMP-2により誘導される靱帯線維芽細胞の軟骨細胞化と軟骨内石灰化における超微形態学的免疫組織化学的变化

#### Ⅲ-1 まえおき

前章では、rhBMP-2を用いたマウス脊柱靱帯骨化モデルを樹立し、この実験モデルより、靱帯線維芽細胞が軟骨細胞様細胞へ分化し、誘導された軟骨組織が内軟骨骨化の過程を経て骨化することを明らかにした。

本章では、靱帯の線維芽細胞が軟骨細胞様細胞に分化する経路を詳細に検討することが、脊柱靱帯骨化症の初期変化の機構を解明する上で必須と考え、BMP-2により誘導される軟骨細胞様細胞の形態学的特徴と初期石灰化の過程を超微形態学的に観察した。

また、靱帯細胞の分化を評価するために、骨芽細胞や石灰化軟骨細胞への分化指標であるALPaseを酵素組織化学的およびin situ hybridization法を用いて検索した。

一方、近年BMP receptorがクローニングされ、BMP receptorの遺伝子あるいは蛋白レベルでの解析が容易となった<sup>42-44</sup>。現在BMP receptorは、type I、IIの2種類のserine/threonine kinase domainを持つreceptorが知られている。BMPのシグナリングにはこの2つのレセプターの共役が必要で、type IIがリガンドと結合し、type Iがシグナルを通すと考えられている<sup>43</sup>。type IにはIAとIBの2種類があり、成獣ラット骨外膜骨芽細胞などではtype IAの

みを発現しており、組織や細胞による分布の相違が知られている<sup>43</sup>。この様なtype I receptorは肢芽発生や骨折治癒などの骨形成においてup-regulationを示すことが報告されており、この実験モデルの骨化過程にも同様な制御機構があると推測される。BMPの標的となる細胞を同定すると共に、靱帯の形態変化に伴うレセプターの局在状態を解析する事は脊柱靱帯骨化症の発症機序を検討する上で非常に重要なことと考え、BMPレセプターtype IおよびIIの免疫組織化学的局在を解析した。

さらに、臨床病理所見では病変部にBMP-2のみならず、TGF- $\beta$ などのサイトカインの局在を示す報告もあり、TGF- $\beta$ スーパーファミリーと病態との因果関係が推測されている<sup>7</sup>。TGF- $\beta$ はBMPsと異なり皮下や筋肉内に投与しても異所性骨化は誘導しないが、骨膜下に投与すると強力に骨形成を促進する<sup>14-16</sup>。しかし、靱帯骨化におけるTGF- $\beta$ の役割は検討されていない。そこで、本症におけるTGF- $\beta$ の役割を解析するため、この実験モデルにおけるTGF- $\beta$ の局在をTGF- $\beta$  receptorの局在と共に免疫組織化学的に検索した。

### III-2 実験材料及び方法

**試料作成** 前章のごとく、12週齢のddYマウス50匹の腰椎黄色靱帯周囲にrhBMP-2溶液(40 $\mu$ g/100 $\mu$ l)を注入し、靱帯の骨化を誘導し、パラフィン切片用試料、凍結切片用試料、Poly/Bed包埋用試料用試料を作成した。対照群には、溶解液のみを注入した同週齢の動物20匹を用いた。内訳の詳細は第II章の表1で示した。なお



未脱灰の試料は浸漬固定が終了した後に、直接1%4酸化オスミウムで後固定し、アセトン脱水して、Poly/Bedに包埋した。

**微細構造の観察** 脱灰試料に関しては、MT-IIで超薄切切片を作成し、未脱灰試料に関しては、超薄切の際に、脱灰されないようにエチレングリコール溶液を使用して、超薄切片を得た。0.2%タンニン酸水溶液、酢酸ウラン、クエン酸鉛による3重染色を施しTEMで観察した。

**酵素組織化学的観察** ALPase活性の検出は凍結切片用の試料をMinotomeで-20°Cに保冷しながら厚さ8 $\mu$ mに薄切し、50 mM MgSO<sub>4</sub>で37°C2時間で再賦活した後、AS-Biphosphateを基質としたアゾ色素法で、37°C5分間反応させ、ALPase活性を検出した<sup>46</sup>。

**免疫組織化学的観察** 抗BMP receptor type Iおよびtype II抗体による免疫染色には厚さ5 $\mu$ mのパラフィン切片を用い、0.01%トリプシン溶液(Difco, Detroit, MI)で37°C30分反応させた後、0.3%過酸化水素メタノール溶液で室温30分反応させ内因性ペルオキシダーゼを除去し、1%BSA-PBS溶液で室温30分間ブロッキングした。その後、一次抗体は希釈倍率300倍で4°C12時間反応させ、streptoavidin-biotin法(Nichirei, Tokyo, Japan)にもとずいて反応させた<sup>45</sup>。

TGF- $\beta$ に対する免疫染色にも厚さ5 $\mu$ mのパラフィン切片を用い、0.3%過酸化水素のPBS溶液を室温で30分間反応させ内因性ペルオキシダーゼ除去を行い、10%BSA-PBS溶液で室温で2時間ブロッキングを行った。一次抗体のポリクローナル兔抗TGF- $\beta$ 1

latency-associated peptide(TGF- $\beta$ 1 LAP)、TGF- $\beta$ 2 LAP、TGF- $\beta$ 3 LAP抗体(Ab96, Ab94, Ab95)、は希釈倍率100倍で4°C 12時間、二次抗体HRP標識ヤギ抗兔IgG抗体は希釈倍率200倍で室温1時間反応させ、その後DAB溶液で発色させた<sup>47,48</sup>。

TGF- $\beta$  type I receptorに対する免疫染色には、Minotomeで厚さ8 $\mu$ mに薄切した凍結切片を用い、0.3%過酸化水素のPBS溶液を室温で30分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼ除去を行い、10% BSAのPBS溶液で室温で2時間ブロッキングを行った。一次抗体のポリクローナル兎抗TGF- $\beta$  type I receptor抗体(VPN)は希釈倍率100倍で4°C 12時間反応させ、streptavidin-biotin法を用いてDAB溶液で発色させた<sup>49,50</sup>。

一次抗体の特異性に関する対照実験には、一時抗体の代わりに非免疫兎血清を用いた。核染はメチルグリーンで行った。

**In situ hybridization** ALPaseのcDNAよりsense及びantisenseのcRNAを作成した。cRNAプローブはdigoxigenin標識UTP(Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany)を用いて作成した。senseプローブは対照実験として用いた。50% formamide、10mM Tris-HCl(pH 7.6)、100mg tRNA、1x Denhardt's solution、10% dextran sulfate、600mM NaCl、0.25% SDS及び1mM EDTA混合液を90°Cで10分間加熱した。それぞれのcRNAプローブは濃度0.1-10 $\mu$ g/mlに調節した。ハイブリダイゼーションは50°Cで一晩行われた。ハイブリダイゼーション後、切片は50% formamideの2倍希釈SCCを用いて約55°Cで30分間洗浄し、10mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5M



NaCl及び 1mM EDTA (TNE)37°Cで処理した。プローブの非特異的結合を除去するため、RNase A treatment (20µg/ml in TNE solution)で37°C30分浸漬した。digoxigenin標識プローブの免疫学的検出のため、2%blocking agentで前処置をし、その後1000倍希釈したALPase標識羊抗digoxigenin抗体で浸漬した。可視化にはnitroblue tetrazolium saltおよび5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphateを用いた<sup>31)</sup>。

### III-3 実験結果

#### BMP-2投与後の黄色靱帯の微細形態学的変化

TEMでは、対照群の黄色靱帯では扁平な核を有する扁平な線維芽細胞が太さ30-60nmのコラーゲン細線維に囲まれていた(図6A)。BMP-2投与後2週では、靱帯中央部で円形の核を有する楕円形の細胞が観察され、周囲の細胞外基質は、太いコラーゲン細線維により構成される線維束と細い直径数・20nmの細線維が混在していた(図6B)。この様な細胞の細胞質には、拡張した粗面小胞体、多数のゴルジ小胞を伴うゴルジ装置が観察され、増殖軟骨細胞あるいはやや肥大化軟骨細胞に類似した像を呈していた(図6C)。

一方、靱帯付着部では、血管侵入部位周囲の軟骨細胞基質に石灰化領域と思われるトルイジンブルー染色に濃染する領域が観察された(図7A)。この領域の多くの軟骨細胞は、細いコラーゲン細線維を含む細胞外基質と明瞭な軟骨小腔に囲まれ、細胞質の電子密度は低く、硝子軟骨における肥大化軟骨様細胞の像を呈していた(図7B)。

しかし、これらの肥大化軟骨細胞様細胞の中には、細胞外基質に太いコラーゲン線維が散見される部位や、太いコラーゲン線維と顆粒状の多糖体様構造とが複雑な網状構造を呈して、軟骨小腔を形成している部位もあった(図7C,D)。肥大化軟骨細胞周囲の石灰化領域では、直径30nmから数百nmの基質小胞が見られ、それらのいくつかは針状結晶を有しており、また、コラーゲン細線維に沿った石灰化も見られ、軟骨内石灰化の過程が観察された(図8A,B,C)。

**ALPaseの組織化学的变化** 対照群では靱帯中央部の扁平な線維芽細胞には観察されなかったが、靱帯付着部の円形の細胞にはALPaseの活性が観察された(図9a)。1週では、靱帯中央部のいくつかの細胞にALPase活性が観察された(図9b)。2週では従来靱帯組織があった部位は軟骨細胞様細胞で埋められていたが、このような細胞にはALPase活性が有意に観察された(図9c)。In situ hybridizationでも、BMPで誘導された軟骨組織における多様な種類の軟骨細胞様細胞にALPase mRNAが検出された(図9d)。

ALPaseの発現は、ALPase活性の局在に一致していた。

**BMP receptorの免疫組織化学的局在** BMP receptor type IAとtype IIに対する免疫染色を行った所、対照群では靱帯中央の扁平な線維芽細胞に反応が見られた(図10a,b)。同様に、靱帯付着部の円形細胞にも免疫活性を持つ細胞が観察された(図10d,e)。BMP-2注入2週後では異所性軟骨のすべての細胞に、BMP receptor type IAとtype IIの局在が見られた(図10g,h)。しかし、BMP receptor type IBは靱帯組織では特異的な反応が観察されなかった。一次抗体として非免疫血清を使った対照実験でも特異的

な免疫反応は観察されなかった(図10c, f, i)。

TGF- $\beta$ およびTGF- $\beta$  receptorの免疫組織化学的局在 TGF- $\beta$ の免疫組織化学では、TGF- $\beta$ 1, 2LAPの特異的な免疫局在はいずれの組織でも観察できなかった。しかし、TGF- $\beta$ 3LAPの局在は対照群の黄色靱帯には観察されなかったのに対し、BMP-2投与後2週では、靱帯中央部の増殖軟骨細胞あるいは肥大化軟骨細胞に免疫局在が観察された(図11A, B)。さらに、この様な増殖軟骨細胞あるいは肥大化軟骨細胞にはTGF- $\beta$  type I receptorの局在が観察された(図11C)。一方、靱帯付着部では、血管侵入部位に隣接した肥大化軟骨細胞にはTGF- $\beta$ 3LAPの免疫局在は観察されなかった(図11B)。一次抗体として非免疫血清を使った対照実験では特異的な免疫反応は観察されなかった。

### III-4 考察

本章では、ALPaseに対する酵素組織化学を行い、BMP-2注入後一部の扁平な線維芽細胞にALPase活性が出現したことから、本編第II章同様に、靱帯線維芽細胞が軟骨細胞に分化することが推測された。さらに、扁平な線維芽細胞にBMP receptor type IA及びIIの局在が観察された。これらの免疫組織化学的検索から、扁平な線維芽細胞が外因性のBMP-2の標的となることが証明され、靱帯線維芽細胞が軟骨細胞へ分化することが再確認された。

一方、本章におけるALPase酵素活性の局在とBMP receptorの免疫局在から、靱帯付着部の持っている特異的な性質が明らかとな

った。すなわち、第一点は靱帯中央部の扁平な線維芽細胞にはALPase酵素活性がないにも関わらず、付着部の円形細胞には活性が見られたこと、第二点はBMP receptorを有する細胞は中央部より付着部の方が密に存在していることである。CooperやYamadaも靱帯や腱の付着部すなわち"enthesis"の細胞が線維軟骨の軟骨細胞と同様な特徴を持っているということを述べおり<sup>41, 52</sup>、付着部の細胞が外因性のBMPに容易に反応する事を示唆している。これらの性質からも、靱帯付着部が骨化過程の開始部位となりうる事が支持された。

BMP-2で脊柱靱帯に誘導された軟骨を詳細に検討すると、線維軟骨と硝子軟骨相方の特徴を有しており、微細構造学的に両方の移行像も観察された。BMP投与後2週の本モデルでは、BMP-2による組織変化は靱帯中央部と、靱帯付着部では異なり、靱帯中央部では線維軟骨が見られたが、靱帯の骨への付着部では概ね硝子軟骨に類似した形態をとり、そこでは内軟骨骨化に先だって起こる血管侵入が観察された。従って、線維軟骨様組織は、靱帯組織から硝子軟骨組織へ分化する際の移行像を示していると思われた。細胞内の構造では、靱帯中央部の増殖軟骨細胞あるいは肥大化軟骨細胞様細胞には粗面小胞体の拡張やゴルジ装置やその周囲にあるゴルジ小胞の集積が見られ、コラーゲンや多糖体など蛋白合成、分泌が盛んに行われていると推測された。

靱帯付着部の肥大化軟骨細胞様細胞の軟骨小腔では、I型コラーゲンと思われる太い細線維とプロテオグリカンがネットワークを形成している特殊な構造を持つものも観察された。この構造はBMP

誘導軟骨細胞で観察され、線維軟骨と硝子軟骨の中間形態を示すものと推測された<sup>13, 34</sup>。石灰化は概ねII型コラーゲンと思われる細い細線維でしめられる硝子軟骨様組織で起こったが、一部観察されるI型コラーゲンと思われる細線維とII型と思われる細線維が混在している線維軟骨様組織でも生じていた。一方、黄色靱帯は弾性線維を含んでおり、弾性線維も動脈硬化等において石灰化基質となりうることを報告されているが<sup>46</sup>、今回の実験では観察部位が正中部であったため、弾性線維が比較的少なく、さらに軟骨誘導により弾性線維が減少するため、弾性線維の石灰化に関しては特異的な所見を得ることができなかった。石灰化の様式に関しては、BMPで誘導する靱帯骨化においても、基質小胞の関与が確認された。基質小胞は、成長軟骨の内軟骨骨化や頭蓋骨の膜性骨化のみならず、線維軟骨内石灰化においても、初期石灰化の場合となると考えられている<sup>12</sup>。過去においても、BMPにより生じる軟骨内石灰化と基質小胞の存在は観察されていたが、本実験ではエチレングリコールを用いて試料の脱灰を防ぐことにより、HAと思われる針状結晶を内包する基質小胞の存在と、基質小胞性石灰化からコラーゲン性石灰化へ移行する過程を明らかにした<sup>35</sup>。また、BMPにより誘導された基質小胞が数百nmと通常より大型なものが見られたのは、急激な組織改変により生じるcell debrisが含まれているためと推測された。

このような特性を持つ軟骨組織において、BMP receptor type I A及びIIの免疫組織化学的局在を観察した。対照群の靱帯細胞と比較して、誘導された軟骨細胞により免疫染色性が強かったため、外因性BMP-2によるBMP receptorのup-regulationが推測された。



BMP-2は初期の段階のみではなく、軟骨分化の進行期にも作用している事を示しており、靱帯が骨化する過程の軟骨形成においても、肢芽発生や骨折治癒などと同様BMPが重要な役割を果たしていると推測された。

また、脊柱靱帯骨化症の発症に関与すると推測されているTGF- $\beta$ 及びTGF- $\beta$  receptorの免疫組織化学を行った。一般にTGF- $\beta$ はin vitroの系において、培養軟骨細胞の分化や、プロテオグリカンなどの基質合成を促進するが、最終分化への到達や石灰化を抑制することが知られている<sup>38-39</sup>。Chickの成長軟骨における免疫組織化学でも、TGF- $\beta$ 3が増殖軟骨細胞と初期肥大化軟骨細胞に観察される一方、後期肥大化軟骨細胞における反応性は減少していた<sup>40</sup>。マウスを使った脊柱靱帯骨化の本実験モデルにおける靱帯中央部の増殖軟骨細胞あるいは肥大化軟骨細胞にはTGF- $\beta$ 3が陽性であり、逆に靱帯付着部の石灰化肥大化軟骨細胞には免疫反応が観察されない傾向は、成長軟骨の所見と同様であった。一方、本実験モデルにおいては、TGF- $\beta$ 3に比べTGF- $\beta$ 1,2の反応が強くそして特異的ではなかったため、正確な局在同定には至らなかった。Thorpeらのchick成長軟骨における所見でも、TGF- $\beta$ 3に比べTGF- $\beta$ 1,2の反応が弱く、isoformによる局在性の差が観察された<sup>40</sup>。さらにラットではTGF- $\beta$ 2が他のTGF- $\beta$  isoformに比べ強力な骨、軟骨誘導因子であるのに対しマウスではTGF- $\beta$ 3が内軟骨骨化の初期過程や、軟骨芽細胞の成長、分化に重要な役割を果たすと考えられている。この様な種差や発現部位によるisoform間での役割の相違が、今回のisoform間での矛盾を反映しているのかもしれない<sup>14,41</sup>。



また、靱帯中央部の増殖軟骨細胞もしくは肥大化軟骨細胞には TGF- $\beta$  type I レセプターが局在していた。TGF- $\beta$  の signal transduction には type I および type II の両者が必要である<sup>82,83</sup>。しかし、これらの軟骨細胞に TGF- $\beta$  type I レセプターが局在していたことは軟骨細胞における TGF- $\beta$  の autocrine/paracrine の機構が存在する可能性を示唆する所見である。したがって、本実験系においては、外因性の BMP は靱帯線維芽細胞の軟骨細胞化と軟骨細胞からの TGF- $\beta$  分泌を誘導し、内因性の TGF- $\beta$  と共同で誘導された軟骨細胞分化や基質合成を促進させるものと推測された。脊柱靱帯骨化症の発症機序においても、TGF- $\beta$  は軟骨形成を基点とする脊柱靱帯骨化症の発症において、軟骨細胞の分化促進という役割を担っている可能性がある。

### III-5 小括

rhBMP-2 を用いて脊柱靱帯に骨化を誘導する実験モデルにおいて、靱帯線維芽細胞が ALPase を発現し、その後線維軟骨様軟骨細胞から硝子軟骨様軟骨細胞へと分化する事、さらにその周囲には軟骨内石灰化が生じることが明らかとなった。また、靱帯線維芽細胞の軟骨細胞化に伴い BMP receptor が up-regulate されると同時に、TGF- $\beta$  が外因性 BMP-2 と共同で autocrine/paracrine 機構により軟骨細胞の基質合成と成熟を促進するサイトカインネットワークの存在が示唆された。

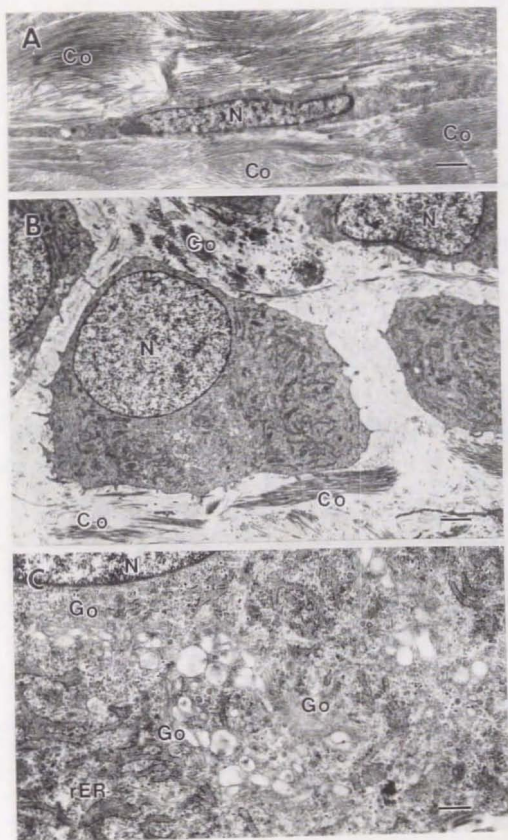


图 6

# 図6 BMP投与後の靱帯細胞のTEM像

A: 対照群の靱帯線維芽細胞

コラーゲンの太い細線維(Co)に囲まれた扁平な線維芽細胞が観察される。8000倍 Bar=1 $\mu$ m (実験動物14)

B: BMP-2投与後2週の靱帯中央部の軟骨細胞

軟骨細胞がコラーゲンの細い細線維に囲まれていた。細胞外基質にはコラーゲンの太い細線維(Co)も観察される。4000倍 Bar=2 $\mu$ m (実験動物29)

C: 靱帯中央部の軟骨細胞の拡大像

粗面小胞体(rER)の拡張と豊富なゴルジ装置(Go)が観察される。ゴルジ装置の周囲には多数のゴルジ小胞も観察された。40000倍 Bar=0.2 $\mu$ m

N: 核。

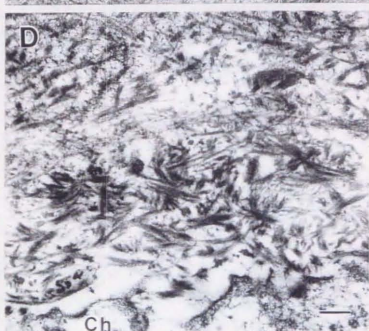
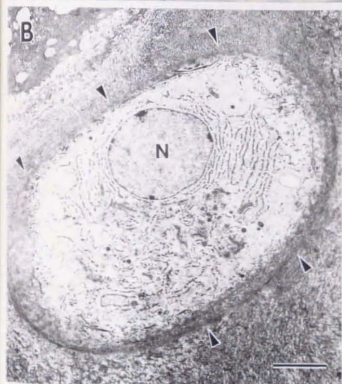
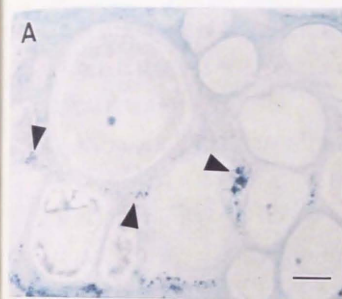


图 7

図7 靱帯付着部に見られる血管侵入部位周辺の軟骨細胞

A: トルイジンブルー染色による未脱灰切片の光顕像

軟骨細胞周辺の細胞外基質に石灰化領域と思われるトルイジンブルー染色に濃染する領域(矢頭)が観察される。1000倍 Bar=10 $\mu$ m  
(実験動物29)

B, C, D: 脱灰切片のTEM像 (実験動物29)

B: 軟骨小腔(矢頭)に囲まれた楕円形の軟骨細胞は電子密度の低い細胞質を有していた。3000倍 Bar=3 $\mu$ m C, D: ある肥大化軟骨細胞では、収化したコラーゲンの太い細線維が軟骨小腔を占有し、この様な細線維と顆粒状の多糖体とがネットワークを形成していた。DはCの\*の拡大像。D:4800倍 Bar=3 $\mu$ m E:33000倍 Bar=0.25 $\mu$ m



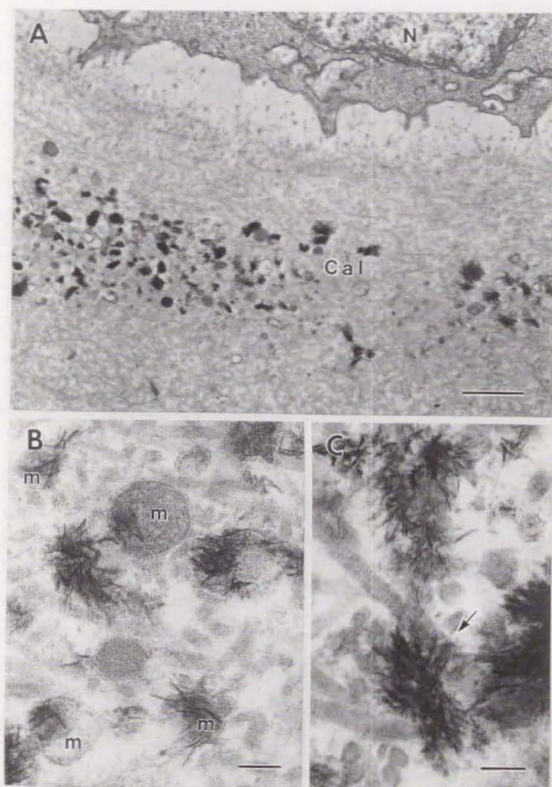


图 8



# 図8 軟骨内石灰化のTEM像

A: 靱帯付着部に見られる血管侵入部位に隣接した肥大化軟骨細胞周囲の細胞外基質には石灰化領域(Cal)が観察された。16000倍  
Bar=1 $\mu$ m (実験動物29)。

B, C: 石灰化領域の強拡大(125000倍) Bar=10nm (実験動物29)  
基質小胞(m)内に針状結晶が見られる。石灰化球より成長した針状結晶はコラーゲン細線維(Co)へと進展し、コラーゲン性石灰化(矢印)を生じていた。

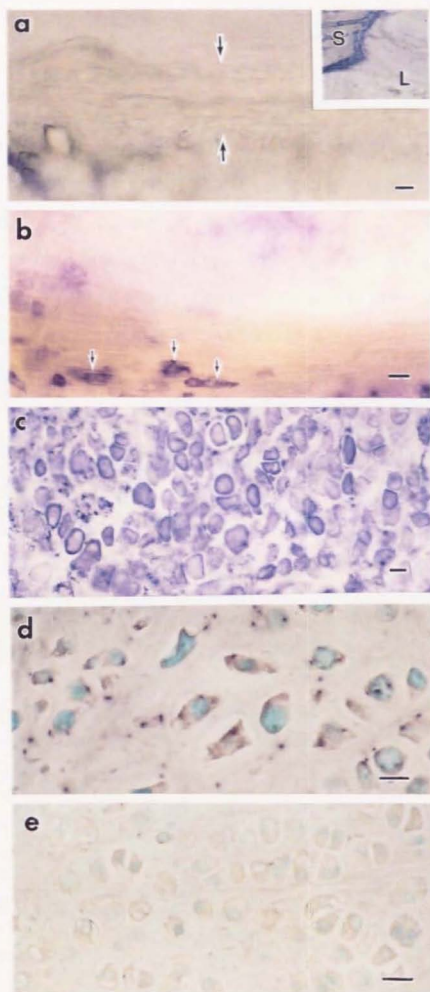


図9 ALPase酵素活性とALPase mRNAの局在 Bar=10 $\mu$ m

a: 対照群のALPase酵素活性

矢印で挟んだ黄色靱帯中央部にALPase酵素活性は観察されない、500倍。一方、靱帯付着部にはALPase酵素活性が観察される(囲み100倍)。S: 椎弓、L: 靱帯。(実験動物20)

b: BMP-2注入後1週。靱帯中央部の扁平な線維芽細胞にはALPase活性を示すものもある(矢印)。500倍。(実験動物15)

c: 2週。靱帯のほとんどの細胞にALPase酵素活性が検出できる、500倍。(実験動物36)

d: ALPase mRNAのin situ hybridization、2週。酵素組織化学と同様にほとんどの細胞にALPase mRNAが検出できる。700倍。(実験動物22)

e: ALPase mRNAのsense probeを用いたin situ hybridization、2週。特異的な反応は見られない。700倍。(実験動物22)

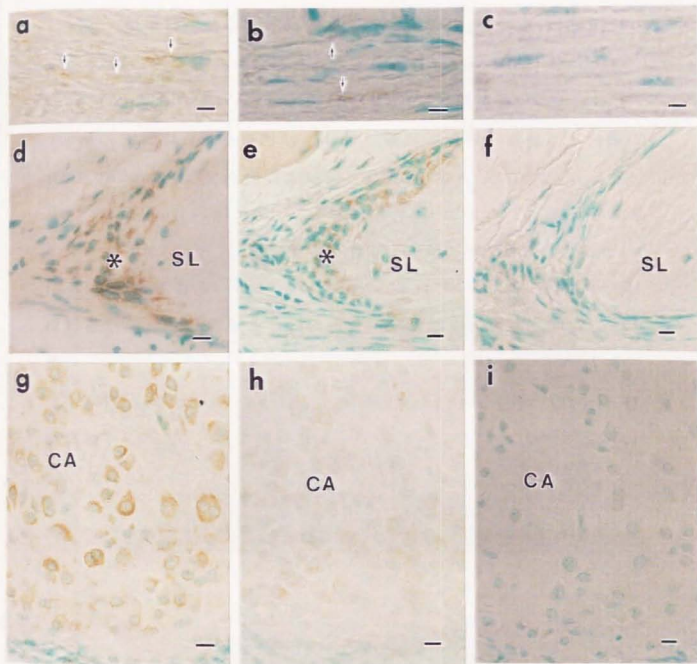


图 10

図10 BMP receptorの免疫組織化学的局在 Bar=10 $\mu$ m

a, b, c: 対照群 (動物番号6)。扁平な線維芽細胞(矢印)にはBMP receptorの免疫局在が観察された。500倍。 a: BMP receptor type IA、b: BMP receptor type II、c: 対照実験。

d, e, f: 対照群 (動物番号6)。靱帯付着部の円形の細胞にも同様にBMP receptorの免疫局在が観察された(矢印)。300倍。 d: BMP receptor type IA、e: BMP receptor type II、f: 対照実験。

g, h, i: BMP-2注入2週 (動物番号22)。BMPで誘導された軟骨(CA)が観察される。BMP receptors type IAおよびtype IIの免疫局在が増殖軟骨細胞あるいは肥大化軟骨細胞に観察された。300倍。

g: BMP receptor type IA、h: BMP receptor type II、i: 対照実験。

SL: 椎弓。

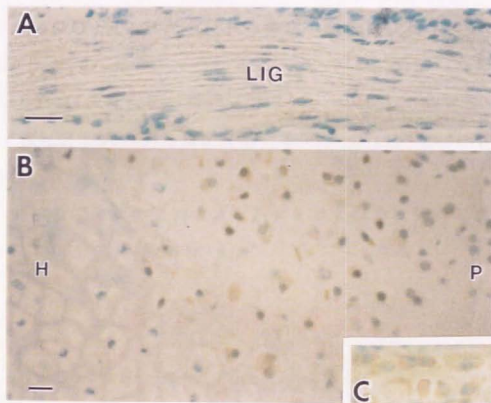


图 1 1



図11 TGF- $\beta$ およびTGF- $\beta$  receptorの免疫局在 Bar=20 $\mu$ m

A:対照群の黄色靱帯におけるTGF- $\beta$ 3 LAPの免疫染色

靱帯組織に免疫局在は観察されない。LIG:黄色靱帯。500倍。(動物番号6)

B:BMP投与後2週の黄色靱帯におけるTGF- $\beta$ 3 LAPの免疫染色

増殖軟骨細胞(P)および肥大化軟骨細胞の細胞質に免疫反応が観察されたが、靱帯付着部に見られる血管侵入部位に隣接した肥大化軟骨細胞(H)には免疫反応は観察されない。300倍。(動物番号22)

C:BMP投与後2週の黄色靱帯におけるTGF- $\beta$  type I receptorの免疫染色

靱帯中央部の増殖軟骨細胞および肥大化軟骨細胞に免疫局在が観察される。300倍。(動物番号36)

#### 第Ⅳ章 実験 3 正常マウスにおける組織非特異型アルカリホスファターゼの免疫細胞組織化学的局在

##### Ⅳ-1 まえおき

本編第Ⅲ章のマウス脊柱靱帯骨化モデルにおいては、靱帯線維芽細胞がBMP-2により軟骨細胞へ誘導されるのに先行して、ALPase活性が陽性となった。したがって、ALPaseは靱帯細胞の軟骨細胞化や、その後の石灰化機転において何らかの役割を担っている可能性がある。

ALPaseはorthophosphoric-monoester phosphohydrolase (EC 3.1.3.1.)の略称で、様々なリン酸エステルを加水分解し、無機リン酸と広義のアルコールを生じる触媒である。この酵素は生物界では高等植物をのぞき、バクテリアから高等動物に至るまで広く分布している。ALPaseに関しては、現在まで、精製や分子構造、in vitroでの酵素作用などについては、数多くの研究が報告され、肝疾患、骨疾患あるいは腫瘍に関する臨床的な研究業績も蓄積している。

また、近年ではALPaseの遺伝子レベルでの解析も進み、ヒトにおいて肝・骨・腎型、腸型、胎盤型、などのアイソザイムがクローニングされている<sup>64-67</sup>。一方、齧歯類に関しては、マウスでは胎盤型、胎仔型、腸型が<sup>68,69</sup>、ラットでは肝・骨・腎型などが<sup>70,71</sup>同定されているが、アイソザイムとその局在はヒトのそれとは、正確には対応せず、名称も混乱している。しかし、遺伝子配列を参考にす

ると、マウス胎盤型はヒトにおいては胎盤型よりも肝・骨・腎型に類似しており、mRNAレベルで90%もの相同性を有しており、ラット肝・骨・腎型もヒト肝・骨・腎型と90%の相同性を持つため、それぞれ相同するアイソザイムと考えるとよいと思われる。このいわゆる組織非特異型ALPase(tissue non-specific alkaline phosphatase, TNAP)のin vivoでの機能は、遺伝子工学の進歩に伴い、徐々に明らかになりつつあり、ノックアウトマウスの解析から中枢神経におけるビタミンB6代謝に関与していることが示唆された<sup>72,73</sup>。しかし、骨や肝臓、腎臓などにおける生理的役割は依然未知である。

本章では、骨に局在するALPaseであるTNAPのin vivoでの生理的役割を解析するためには、生体組織内での局在を明らかにすることが不可欠と考え、組織レベルあるいは細胞レベルでのTNAPの局在を免疫組織細胞化学的手法で明らかにした。

#### IV - 2 実験材料及び方法

**免疫沈降** 織田らの方法に従い、ヒトTNAPを発現するSaos-2 human osteosarcoma cellに<sup>35</sup>S]-methionineを加え3時間培養し、その後3時間<sup>35</sup>S]-methionineを加えずに培養した<sup>74-76</sup>。さらに、phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC, Funakoshi, Tokyo, Japan)を加え1時間37°C培養し、細胞と培養上清を分離した。細胞はさらに溶解して細胞残渣とし、培養上清とともに兎抗ラットTNAP血清を用いて免疫沈降を行った。

77. 免疫沈降はSDS/PAGE(9% gel) fluorographyで分析した。

**試料作成** ジエチルエーテルによる吸入麻酔およびペントバルビタルナトリウム30mg/kgの腹腔内投与による麻酔を行った後、3週齢の雄5匹および妊娠18日の雌のddYマウス2匹を、0.1Mカコジル酸緩衝液(pH 7.4)で緩衝した4%パラフォルムアルデヒドと0.5%グルタルアルデヒドの混合液あるいは4%パラフォルムアルデヒド溶液で灌流固定し、それぞれ凍結切片もしくはエポキシ樹脂切片用およびパラフィン切片用に用いた。脛骨、腎臓、肝臓、切歯、顎下腺、小腸を3週齢のマウスから、胎盤を妊娠マウスから摘出し、さらに同液を用いて2時間、4°Cで浸漬固定をした。脱灰が必要な脛骨、切歯は、引き続き4.13%EDTA溶液(pH 7.4)で4°C、1週間浸漬した。得られた試料の一部は、凍結切片用として、10%ショ糖PBS溶液から20%、25%と順次濃度を上げながら浸漬した後、液体窒素で急速凍結した。凍結した試料は、Minotomeで5μmの厚さに薄切した。また、試料の一部は、Microslicer DTK-1000で50μmに薄切した。

**酵素組織化学的研究** Aso色素法とクエン酸鉛法を用いてALPase活性の局在を同定した。

Aso色素法では、Burstoneの方法に準じ、再賦活のため50mM MgSO<sub>4</sub> 0.05M tris-maleic buffer (pH7.4)溶液に、5μmに薄切した凍結切片を37°Cで2時間浸漬し、5mg naphthol AS-BI phosphateと18mg fast blue RR salt (Sigma)の30ml 0.1M Tris-HCl buffer (pH8.5) 溶液で、37°Cで5分反応させた<sup>46</sup>。

また、クエン酸鉛法ではMayaharaらの方法に従い、50μmに薄

切した切片を、50mM MgSO<sub>4</sub> 0.05M tris-maleic buffer (pH7.4)溶液に、4°Cで8時間浸漬し、その後20mM  $\beta$ -sodium glycerophosphateと3.9mM magnesium sulphate、2.0mM lead citrate、0.8% sucroseの混合液を28mM tris-HCl bufferに溶解し、pH9.4に調整したもので、37°C、10分間浸漬した<sup>7a</sup>。浸漬後、0.8% sucrose 28mM tris-HCl buffer(pH8.5)で4°C、30分浸漬して洗浄し、さらに0.1Mカコジル酸緩衝溶液(pH7.4)で4°C、1時間洗浄した。切片を室温で1%黄色硫化アンモニウムに反応させて可視化した後、0.1Mカコジル酸緩衝溶液(pH7.4)で洗浄し、0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.4)で緩衝した1% OsO<sub>4</sub>に4°C、1時間浸漬して再固定した。再固定した試料は、70% ethanolから上昇エタノール系列で脱水し、酸化プロピレンで置換した後、Poly/Bed 812で包埋した。包埋した試料は、Porter-Blum MT-II ultramicrotomeで1 $\mu$ mに薄切して、光学顕微鏡で観察した。核染にはトルイジンブルーを使用した。

**免疫組織化学的研究** 酵素免疫法では、厚さ5 $\mu$ mの凍結切片もしくは厚さ50 $\mu$ mの切片を用いて、0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PBS溶液に室温で30分浸漬して内因性ペルオキシダーゼ除去を行い、その後抗血清の非特異結合部位をブロックするため1% BSA-PBSに、室温で30分浸漬した。その後、100倍希釈の兔抗ラットTNAP血清で、4°Cで24時間浸漬した。厚さ5 $\mu$ mの凍結切片では、HRP標識山羊抗兔IgGs抗体で、室温で1時間反応させ、DAB溶液で室温5分反応させ可視化した後、メチルグリーンで核染して光学顕微鏡で観察した。対照として、非免疫兔血清を同倍に希釈しものを1次抗体として使

用した。厚さ50 $\mu$ mの切片では、HR標識山羊抗兔IgG抗体で4℃で24時間反応させ、DAB反応の拡散を予防するために2.5%グルタルアルデヒド溶液(pH7.4)に4℃で1時間浸漬した。DAB溶液で室温で5分反応させた後は、酵素組織化学と同様に0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.4)で緩衝した1% OsO<sub>4</sub>で後固定し、Poly/Bed 812に包埋した試料を1 $\mu$ mに薄切して、光顕で観察した。

蛍光免疫法では、1%BSA-PBSでブロッキングし、抗TNAP血清で4℃で24時間浸漬した後、FITC標識山羊抗兔IgG抗体(Dakopatts)で4℃で24時間浸漬した。反応させた切片を5000倍に希釈したethydyne bromideで核染色、High definition real-time 3D microscope Edge R400 (UHI, Tokyo, Japan)で観察した。

#### IV - 3 実験結果

免疫沈降の結果では、細胞残渣やPIPLC処理した細胞上清中に本抗体で認識できる66KDaの蛋白が示された(図12)。

脛骨の成長軟骨では、TNAPの免疫局在もしくはALPaseの酵素活性は、静止層の軟骨細胞の一部や、増殖層から肥大化層にかけての軟骨細胞で検出された。骨組織に関しては、TNAPの免疫局在とALPaseの酵素活性はともに、基質に接着していない前骨芽細胞の細胞表面全周に強い局在を示した。また、基質に接着している、細胞質が豊富な活性型骨芽細胞では血管側もしくは細胞間の接着面に、扁平な骨芽細胞では血管側の細胞表面に局在が見られた(図13)。



腎臓では、TNAPの免疫局在、ALPaseの酵素活性ともに、糸球体尿管極から近位尿細管に至る単層立方上皮の刷子縁に局在が見られた(図14、15A-D)。肝臓では、TNAPの免疫局在、ALPの酵素活性ともに、毛細胆管を形成する細胞膜に局在が見られた(図15E-F)。

切歯においては、中間層細胞と分泌期エナメル芽細胞近位側に免疫反応が観察された。一方、分泌期エナメル芽細胞の遠位側にはTNAPの免疫反応も、ALPaseの酵素活性の局在も観察されなかった。同様に、象牙芽細胞の基底側と象牙質細胞直下の歯髄細胞にTNAPの免疫反応が観察された。象牙前質中に存在している象牙芽細胞の細胞突起は、弱いながらもTNAPの免疫反応を呈しており、この反応はALPaseの酵素活性の局在と一致していた(図16A、文献79参照)

胎盤の栄養膜にも、TNAPの免疫局在が観察された。一方、小腸型のALPaseアイソザイムが局在していると予想される顎下腺や小腸[Zang 1996]にはTNAPの免疫局在は観察されなかった。対照実験として一次抗体の代わりに非免疫兔血清用いた実験では、免疫反応は見られなかった。(図16B-D)

### III - 4 考察

ヒトTNAPを特異的に発現するSaos-2 cellを用いた免疫沈降では<sup>78</sup>、抗ラットTNAP抗体は80KDaのヒトTNAPを認識できることが明らかとなった。さらにマウスにおける抗ラットTNAP血清によ

る免疫組織化学においても、特異的な局在を検出したことから、本抗血清は、ラット、マウスおよびヒトのTNAPを認識できることが確認された。

一般的に、凍結切片やmicroslicerを用いた組織片は通常の酵素組織化学に適していると考えられるが、パラフィン切片はALPaseの熱感受性のため使用できないと考えられてきた。しかし、本研究では、本抗血清を用いた免疫組織化学であればパラフィン切片も使用可能であることが明らかとなり、この方法はTNAPアイソザイムを検出する簡便な方法であると考えられた。

過去の硬組織における酵素組織化学的研究においては、ALPase活性は軟骨細胞では全細胞表面に<sup>80,81</sup>、骨芽細胞では血管側細胞膜に<sup>82</sup>観察された。軟骨や骨におけるALPaseの免疫組織化学も、いくつかのグループより報告されているが、軟骨細胞や骨芽細胞の細胞膜や、骨芽細胞の基質小胞に局在していることを示しているのみで、細胞レベルでの厳密な局在の検討はなされていない<sup>81,83,84</sup>。しかし本研究においては、エポキシ樹脂切片を用いたTNAPの高分解能免疫組織化学により、骨芽細胞と前骨芽細胞での蛋白レベルの局在の相違を明確に示すことが可能となった。さらに、骨におけるTNAP mRNAの発現が、生後2日齢のラットを使ったin situ hybridizationにおいて解析され、骨芽細胞、前骨芽細胞に発現が観察されており<sup>85</sup>、骨芽細胞より前骨芽細胞に検出されたシグナルが多かったという所見は、本研究の所見と一致していた。

骨の石灰化におけるALPaseの機能は依然不明である。RobinsonはALPaseが有機リン酸塩を加水分解し、局所のリン酸

イオン濃度を押し上げていると推測した<sup>18</sup>。FleischとNeumanはALPaseがHA結晶の形成・成長阻害物質であるピロリン酸を除去していると推測した<sup>19</sup>。さらに、ALPaseは無機リン酸の拡散を容易にしたり、無機リン酸の輸送蛋白として働いているなどという推測もなされている。しかし、これらの仮説はいずれも実証されていない。

歯に関しては、電顕を使ったALPase酵素細胞化学では、ALPase酵素活性が、象牙芽細胞の基底側細胞膜、象牙芽細胞直下の歯髓細胞や中間層細胞の細胞表面、分泌期エナメル芽細胞の近位側細胞膜に存在すると報告されている<sup>79,80,88</sup>。本研究ではパラフィン切片で光顕レベルの観察を行ったが、従来の電顕レベルの観察とほぼ同様であった。前分泌期、分泌期、成熟期へとエナメル芽細胞の分化が進行するとALPaseの局在が変化する事が知られている。すなわち、前エナメル芽細胞では近位の細胞膜に酵素活性を示し、成熟期エナメル芽細胞では遠位側に酵素活性が観察される。このように、エナメル芽細胞の分化段階に応じてALPaseの局在が特異的に変化することは、ALPaseの機能を反映している可能性があり、分泌期のエナメル芽細胞はエナメル基質蛋白とイオンをエナメル基質中に分泌し、成熟期エナメル芽細胞はエナメル基質中の有機成分を分解し除去していると推測される<sup>89</sup>。

軟部組織では腎臓の近位尿管の冊子縁と肝細胞の毛細胆管にALPase活性が確認されている<sup>78,90</sup>。本研究では、エポキシ樹脂切片を用いたTNAPの高分解能免疫組織化学により同様な部位に反応が局在していることを確認した。ラットの腎臓や肝臓でも、RNA

blot 分析によりTNAP mRNAの発現が検出されており、本研究の所見と一致していた<sup>71</sup>。

妊娠後期のマウス胎盤迷路におけるALPase活性局在とTNAP mRNAの発現は、酵素組織化学およびin situ hybridizationで検出されており<sup>71</sup>、これらの所見も我々の所見と一致していた。このように、TNAPの免疫組織化学的局在は骨、歯、腎、肝、胎盤等の組織では酵素組織化学的局在と一致していた。酵素組織化学は、酵素の代謝産物を検出するという間接的な手法をとるため、酵素組織化学と免疫組織化学の結果が同様であったことは従来の酵素組織化学が精度の高い検出方法であることを示している。しかし、酵素組織化学で強い酵素反応を示す唾液腺の腺房、筋上皮細胞、導管上皮細胞や小腸上皮の微絨毛にはTNAPの局在は見られなかった<sup>72,73</sup>。ラット小腸を抗ラット腸型ALPase血清で免疫染色した際には、微絨毛が染色されたにも関わらず、本研究では、TNAPの免疫局在が観察されなかったことから、この抗血清は免疫細胞化学において小腸型ALPaseを区別できると思われた<sup>74</sup>。また、ヒト胎盤型ALPaseとも交差しない事がわかっており、免疫染色において小腸型ALPaseやヒト胎盤型ALPaseなどの他のisozymeとTNAPとを識別できる可能性が示唆された。

TNAPの生理的機能を解明するためには、まずその局在を同定することが重要である。今後、細胞レベル、微細構造レベルでさらに詳細な局在を検討することにより、基質小胞由来の石灰化やエナメル形成等におけるTNAPのin vivoでの機能に関する重要な情報が得られると思われる。

#### IV - 5 小 括

正常マウスにおいて、骨、歯、腎、肝、胎盤では、TNAP免疫活性とALP酵素活性はほぼ同様な局在を示した。ALPの局在同定において、TNAPの免疫組織細胞化学は有用な手段であり、今後、金コロイド法による免疫電顕などを利用してさらに詳細な解析が可能となり、TNAPの*in vivo*での機能に関する重要な情報が得られる事が予想される。

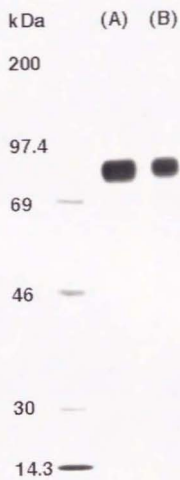
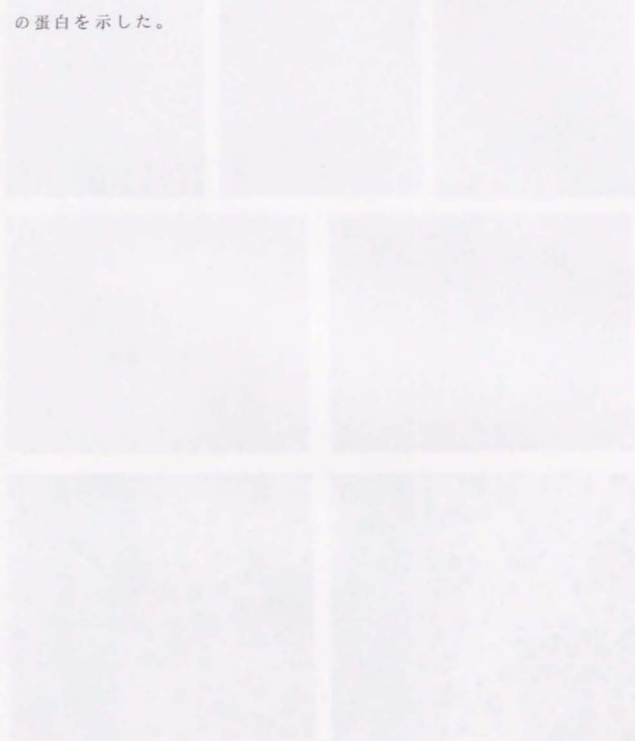


图 1 2



図12 抗TNAP血清による免疫沈降

Saos-2細胞の細胞残渣(A)もphosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC)処理後の細胞上澄も、ともに約80Kdaの蛋白を示した。



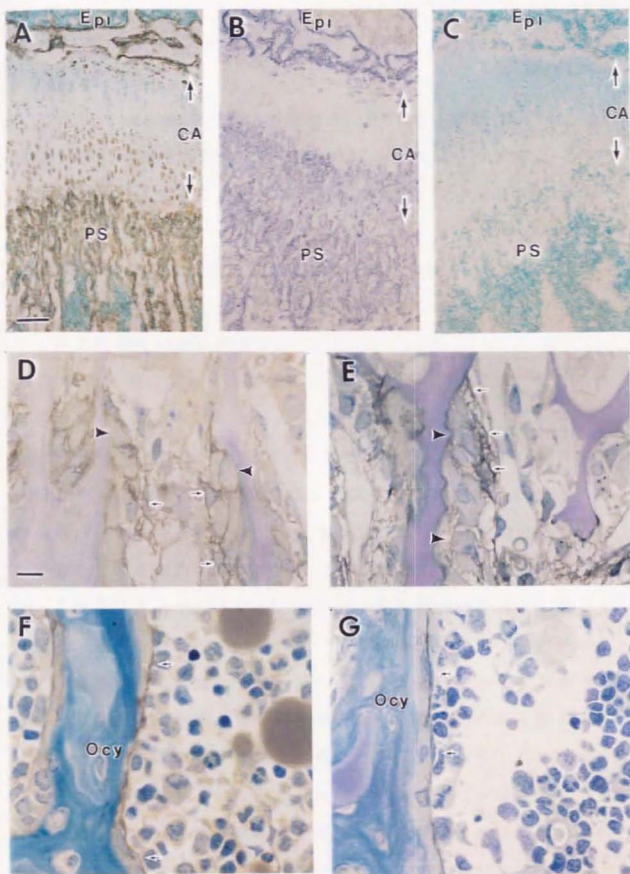


图 13

図13 骨におけるTNAPの局在 A-C 85倍 Bar=0.1mm、D-G  
850倍 Bar=10 $\mu$ m

A: TNAPの免疫組織化学。凍結切片、HRP法。骨端(Epi)や一次海綿骨(PS)の骨芽細胞や、成長軟骨(CA)における静止層の一部や増殖層から肥大化層にかけて、軟骨細胞にTNAPの局在が観察された。

B: ALPの酵素組織化学。凍結切片。Azo色素法。ALPの酵素活性はTNAPの免疫局在と同様に、静止軟骨細胞の一部や増殖軟骨細胞から肥大化軟骨細胞に観察された。

C: 正常兔血清による免疫組織化学。凍結切片。HRP法。特異的な反応が見られる部位はなかった。

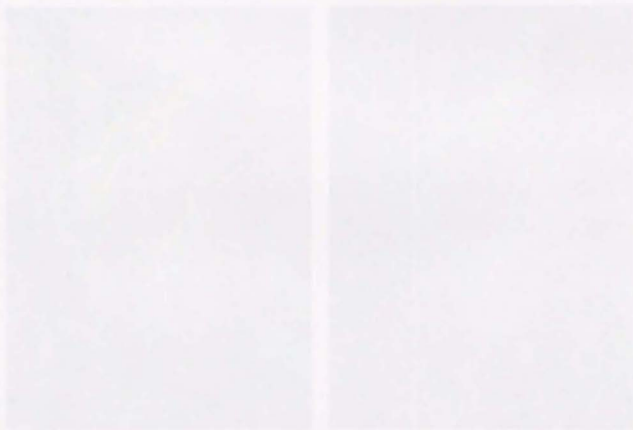
D: 血管侵入部位周囲のTNAPの免疫細胞化学。Poly/Bed切片、HRP法。血管侵入部位の先端には、扁平で豊富な突起を有し、細胞表面の一部で骨基質と接している前骨芽細胞と骨芽細胞の移行形の形態を呈する細胞が観察された。この様な細胞には、基質に接している部位では若干反応が弱いものの、細胞膜表面全周性に強い免疫反応が観察された(大きな矢印)。この細胞の隣には、細胞質が豊富で、立方形もしくは長方形の形状をしている骨芽細胞が観察された。この様な骨芽細胞には、血管側、もしくは他の細胞と隣接している側面の細胞表面に反応が見られたが、基質に接着している部位には、反応が全く見られないか、もしくはわずかしかな反応が見られなかった(矢頭)。骨芽細胞の血管側にある前骨芽細胞は多数の突起を持っており、細胞表面に全周性に強い反応が見られた(矢印)。

E: 血管侵入部位周囲のALPの免疫細胞化学。Poly/Bed切片、ク

エン酸鉛法。TNAPと同様の傾向を示した。

F: 骨端部のTNAPの免疫細胞化学。Poly/Bcd切片、HRP法。骨基質に接している骨芽細胞は扁平化している。扁平化した骨芽細胞の血管側の細胞表面や、骨芽細胞に隣接してる前骨芽細胞の細胞表面全体(矢印)に免疫反応が見られた。基質に埋め込まれた骨細胞(Ocy)には明らかな免疫反応は観察されなかった。

G: 骨端部のALPの酵素細胞化学。Poly/Bcd切片、クエン酸鉛法。TNAPと同様の傾向を示した。



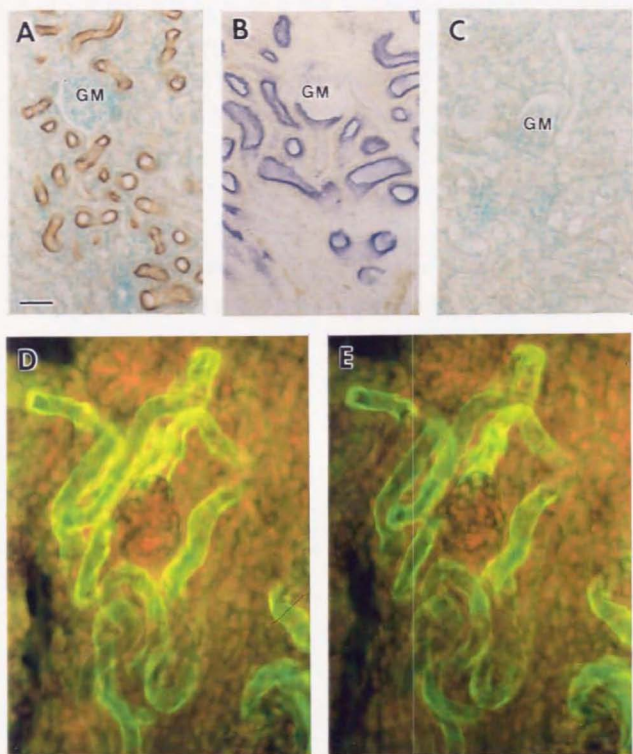


图 14

図14 腎臓におけるTNAPの局在 170倍 Bar=50 $\mu$ m

A: TNAPの免疫組織化学。凍結切片、HRP法。糸球体(GM)周囲に存在する尿細管の管腔壁に免疫反応が見られた。

B: ALPの酵素組織化学。凍結切片。Azo色素法。ALPの酵素活性はTNAPの免疫局在と局在とほぼ一致していた。

C: 正常兔血清による免疫組織化学。凍結切片。HRP法。特異的な反応が見られる部位はなかった。

D, E: TNAPの免疫組織化学。FITC法、ステレオ撮影。糸球体尿管極から、尿細管の管腔壁に連続的に免疫反応が見られた。



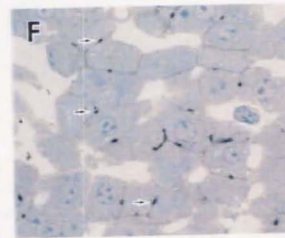
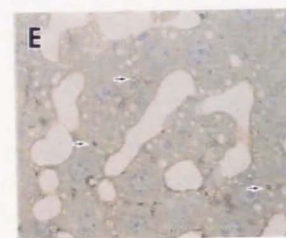
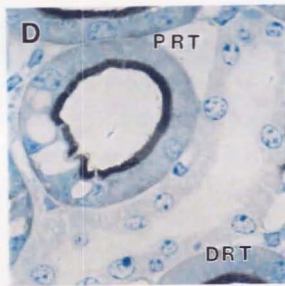
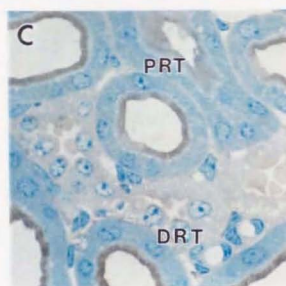
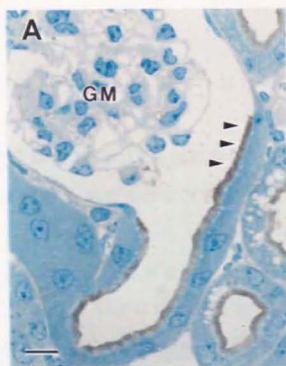


图 1 5

図15 Poly/Bed切片における腎臓および肝臓のTNAPの局在、  
850倍 Bar=10 $\mu$ m

A: 尿細管のTNAPの免疫細胞化学、HRP法。トルイジンブルーで細胞質が濃染する近位尿細管(PRT)の単層円柱上皮の刷子縁に免疫反応が見られた。一方、細胞質が濃染されない遠位尿細管(DRT)には免疫反応は観察されなかった。

B: 尿細管のALP活性の酵素細胞化学。クエン酸鉛法。TNAPの免疫細胞化学と同様に近位尿細管の単層円柱上皮の刷子縁に反応が見られた。

C: 肝実質細胞のTNAPの免疫細胞化学。HRP法。肝実質細胞間の空隙に観察される毛細胆管の管腔壁に免疫反応が見られた。

D: 肝実質細胞のALP活性の酵素細胞化学。クエン酸鉛法。TNAPの免疫細胞化学と同様に、毛細胆管の管腔壁に酵素活性が見られた。一方、一部の細胞の細胞表面にもわずかながら酵素活性が見られた。

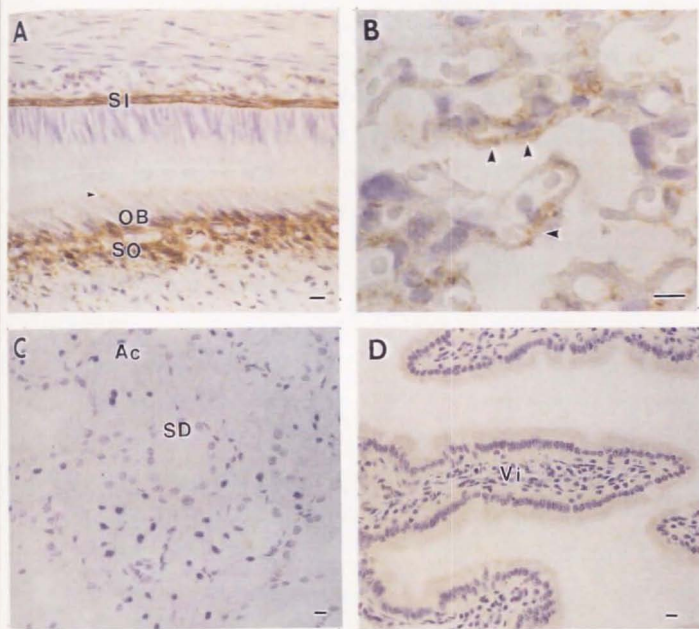


图 16

図16 歯、胎盤、顎下腺、小腸におけるTNAPの免疫組織化学、  
パラフィン切片、HRP法 Bar=10 $\mu$ m

A: 歯。免疫反応が中間層細胞(SI)および分泌期エナメル芽細胞の基底側に観察される。象牙芽細胞(OB)の基底側や、象牙芽細胞直下の歯髓細胞(SO)にも免疫活性が検出される。象牙前質内の細胞突起にもわずかに免疫反応が観察される。340倍。

B: 胎盤。栄養膜に免疫反応が見られる(矢印)。850倍。

C: 顎下腺、D: 小腸。特異的な反応が見られる部位はなかった。  
340倍。

Ac: 腺房、SD: 唾液腺導管、Vi: 絨毛

## 第V章 実験4 胎生期ラット頭蓋骨の石灰化機構の微細形態学的組織細胞化学的観察

### IV-1 まえおき

長管骨では、軟骨が一旦石灰化し、破骨細胞(破軟骨細胞)による吸収を受け、その後骨芽細胞によって形成される骨に置換される内軟骨性骨化の様式で骨化が起こる。第II、III章において解析したBMP-2による韧带骨化も内軟骨性骨化であり、同様に軟骨が骨に置換される前段階として軟骨基質に石灰化が生じた。したがって、基質の石灰化は内軟骨性骨化や韧带骨化において重要な機転である。

一方、韧带の石灰化においても長管骨の内軟骨性骨化における石灰化同様、基質小胞内にHA結晶が析出する基質小胞性石灰化と、基質小胞から成長したHA結晶がコラーゲン細線維に沿って伸長するコラーゲン性石灰化の2つの過程を経ることが明らかとなった。この基質小胞性石灰化とコラーゲン性石灰化は、線維芽細胞が直接骨芽細胞へ分化し骨基質を形成する膜性骨化でも、長管骨に見られる膜性骨化でも普遍的に見られる現象である。本章においては、韧带骨化における石灰化現象の機序を説明する一助として、初期石灰化の形態学的解析が容易である胎生期ラット頭頂骨を用いて生物学的石灰化機構を検索した。

骨におけるコラーゲン性石灰化機構に関しては、古くから、Neumanらによりコラーゲン分子がHA結晶のエピタキシーとなる説が提唱されており<sup>85,96</sup>、形態学的見地からは、Fitton-Jackson

やChristoffersenによりコラーゲン細線維のHole zoneに石灰化結晶が析出することが報告されている<sup>97,98</sup>。また、Termineらは骨基質よりI型コラーゲン、HA両者に親和性があるオステオネクチンを同定し、この骨基質蛋白がコラーゲン分子におけるHA結析出を制御していると推測している<sup>99</sup>。あるいは、コラーゲン細線維周囲にはピロリン酸やプロテオグリカン等のヒドロキシアパタイト結晶の形成成長阻害物質が存在するとされており、コラーゲン性石灰化においてはアルカリフォスファターゼ(ALPase)やメタロプロテナーゼなどがそれらの除去に関与すると推測されている<sup>100,101</sup>。しかし、いずれの説も決定的証拠に欠け、コラーゲン性石灰化の詳細な機序は未知である。

近年、透過型電子顕微鏡を使かった3次元観察により、コラーゲンの石灰化現象において、コラーゲン細線維内に形成されるHA結晶が板状構造を呈することが報告され、コラーゲン性石灰化におけるHA結晶の形態に関する情報は増えつつある<sup>101,102</sup>。しかし、周囲には石灰化成長阻害物質が豊富に存在する環境で、どのようにしてコラーゲン性石灰化が進行するかについては不明である。したがって、コラーゲン性石灰化機序の解明においては、HA結晶の成長の足場となるコラーゲン細線維の形態の変化を検索することは必須である。幸い、石灰化度が低く、線維性骨である胎生後期や新生仔期のラット頭蓋骨は、非脱灰標本での石灰化の超微形態学的観察は比較的容易であり、また基質小胞性石灰化やコラーゲン性石灰化などの骨の石灰化の初期過程を観察する事ができる<sup>103</sup>。本研究ではこのような軟骨形成や血管侵入を介さない膜性の骨化様式をとるラッ



ト胎仔頭蓋骨を用いて、石灰化部位におけるコラーゲン細線維などの超微形態を観察した。

また、プロテオグリカンは、コラーゲン細線維に結合して、コラーゲン細線維の成長や安定化に関与すると同時に、石灰化結晶の成長・形成を阻害することが知られている<sup>104, 109</sup>。したがって、石灰化領域周辺のプロテオグリカンはコラーゲン細線維の形態や石灰化領域の形成に大きな影響を及ぼすと考えられる。一方、デコリンはコンドロイチン硫酸あるいはデルマタン硫酸からなる一本のGAG鎖と分子量4万MWのコアプロテインからなる骨や靱帯の主要なプロテオグリカンであり、TGF- $\beta$ などを介し骨代謝に重要な役割を果たしていると考えられている<sup>110-112</sup>。そこで、本研究ではさらに、デコリンの免疫局在を免疫組織化学および凍結超薄法を用いた免疫電顕で検討した。

#### IV-2 実験材料及び方法

標本作製 妊娠19日目のWistar rat (Nihon SLC, Hamamatsu, Japan) 1匹をdiethyl etherで麻酔し、ラット胎仔15匹を摘出した。摘出したラット胎仔は、左心室にカテーテルを刺入し、灌流固定をした。固定液には、パラフィンに対し0.1Mカコジル酸緩衝液(pH 7.4)で緩衝した4%パラホルムアルデヒド溶液を、microslicer組織切片および凍結超薄切片用には0.1Mカコジル酸緩衝液(pH 7.4)で緩衝した4%パラホルムアルデヒド・0.5%グルタールアルデヒド混合溶液を、微細形態学的観察に対し0.1Mカコジル酸緩衝液(pH

7.4)で緩衝した2%グルタルアルデヒド・2.5%パラフォルムアルデヒド・0.1%アクロレイン・0.1%タンニン酸混合溶液を、それぞれ5匹ずつ、1匹あたり2ml使用した。灌流固定後、頭蓋冠を摘出し、それぞれの固定液に4°Cで2時間浸漬した。パラフィン切片用、凍結超薄切片用、ヒブラートーム組織切片用及び一部のエポキシ樹脂包埋用の試料は、4.13% EDTA溶液を用いて4°Cで1日間脱灰した。その後、パラフィン包埋用試料はエタノール脱水後パラフィンに包埋した。凍結超薄用試料はTokuyasuの方法にしたがい2M蔗糖溶液と20%ポリビニルピドロン(Wako, Tokyo, Japan)の混合溶液に浸漬した後、それぞれ液体窒素で凍結した<sup>113</sup>。微細構造用試料に関しては、氷晶形成の予防のため50%DMSO水溶液に4°Cで1日間浸漬した後、ドライアイス・アセトンで冷却しながら4% 4酸化オスミウム・アセトン溶液で3日間浸漬して後固定、脱水した。その後、Poly/Bed 812 resinに包埋した。

**組織学的観察** パラフィンに包埋した試料を、厚さ3 $\mu$ mに薄切し、Azan染色液で染色して、光顕で観察した。

**超微形態学的観察** Ultracut UCT Microtome(Leika, Wien, Austria)を用いて、Poly/bedに包埋した試料の厚さ0.5mmに準超薄し、トルイジンブルー染色で観察部位を確認した後、厚さ60-80nmの超薄切片を作成した。未脱灰試料に関しては、超薄切の際に、脱灰されないようにエチレングリコールを使用して、超薄切片を得た。0.2%タンニン酸水溶液、酢酸ウラン、クエン酸鉛による3重染色を施し、あるいは非脱灰超薄切片の一部は無染色のまま、TEMで観察した。

## 免疫組織細胞化学

デコリンに対する免疫組織化学では、Microslicer, DTK-1000 (DSK, Kyoto, Japan)を用いて80 $\mu$ mに薄切した組織切片を用い、Biancoらがデコリンの免疫組織化学で前処置で行ったようにコンドロイチネースABC (Seikagaku) 1.25u/ml で10分37℃で処理した後、20%正常山羊血清・PBS溶液で室温で30分間ブロッキングを行った<sup>114</sup>。一次抗体のポリクローナル兔抗デコリン抗体(LF113)は希釈倍率200倍で4℃12時間、二次抗体FITC標識ヤギ抗兔IgG抗体は希釈倍率100倍で室温1時間反応させた後、Ethidium Bromideを希釈倍率5000倍で室温で5分核染色、confocal laser microscope, LSM-GB 200 (Olympus, Tokyo, Japan)を用いて観察した。

免疫細胞化学は、Tokuyasuの方法に準じて行った<sup>115</sup>。

Reichert-nissei ULTRACUT S Microtome(Leica)に凍結装置 Reichert-Nissei FCS (Leica)を装着した凍結超薄装置を使い、-90℃で90nmに超薄切した。切片回収には2.3M蔗糖・0.75%ゼラチン混合溶液を用い、フォルムバル処理及びカーボンコーティングを施した200Niメッシュに付着させた。コンドロイチネースABC (1.25u/ml、10分37℃)、20%正常山羊血清・PBS溶液(10分、室温)、一次抗体(1:10、室温、1時間)、一次抗体(10nm金粒子標識ヤギ抗兔IgG抗体1:10、室温、1時間)、でそれぞれ反応させた後、4%中性酢酸ウラン

で室温10分間染色し、2%PVA溶液と0.2%ウラン溶液の等量混合溶液で封入し、透過型電子顕微鏡で観察した。

対照実験としては、特異的一次抗体の代わりに等倍希釈の非免疫血清を用いた。

#### IV-3 実験結果

**組織学的所見** 胎生19日齢ラット頭蓋骨は矢状縫合部より側頭部にかけ線維組織から骨組織へ連続的に移行する。骨組織では、皮膚側に円形から楕円形の骨芽細胞が見られ、石灰化骨基質と骨芽細胞の間には石灰化度の低い類骨が観察された。(図17)

**超微形態学所見** この類骨部を透過型電子顕微鏡で観察すると、石灰化していない類骨から石灰化骨基質形成に至る過程が連続的に観察できた(図18)。そこでさらに、類骨から石灰化骨基質の微細形態を高倍で観察した。類骨では、非脱灰切片において2重膜構造に囲まれた基質小胞や、石灰化球を介したコラーゲン細線維の石灰化が観察された(図19a)。また、脱灰切片では、約67nmの周期構造を有するI型コラーゲン細線維が明瞭に観察され、コラーゲン細線維や基質小胞周囲にはプロテオグリカンと思われる細い網目状の線維構造が見られた(図19b)。

石灰化骨基質では、非脱灰切片において石灰化球の周囲にコラーゲン細線維が密に存在しており、コラーゲン細線維周囲の網目状構造がしめる領域は消失していた。コラーゲン細線維の断面は一本一本の輪郭が不明瞭になっており、幅300nm程度の太い細線維束も

観察された(図20a)。脱灰切片でもコラーゲン細線維の断面は不定形を呈し、径の増大したコラーゲン細線維は分枝しており、周期構造がずれている細線維も見られたことから、周期構造を有する成熟した細線維同士が癒合していることが示唆された(図20b)。

**デコリンの免疫組織細胞化学的局在** 免疫組織化学では線維芽細胞の基質や骨芽細胞に近接した類骨にデコリンの局在が認められた一方、骨芽細胞から離れた部位にある石灰化骨基質では、デコリンの免疫活性は減少していた(図21)。一方、非免疫兔血清を使った対照実験では特異的な免疫反応は見られなかった。

さらに凍結超薄法による免疫電顕では、矢状縫合部の基質や骨基質形成開始部位の石灰化していない骨基質ではコラーゲン細線維周囲に免疫局在が密に観察された(図22、23a)。しかし、石灰化が進行するにしたがい細線維の径が増大するとともに、デコリンの局在は減少し、太いコラーゲン細線維を有する石灰化骨基質では免疫反応は著しく減少していた(図23b)。

#### IV-4 考察

一般に、コラーゲン細線維の径の太さは、発生、成長に伴い増加することが知られている。ニワトリの皮膚では、コラーゲン分子もしくはそれに準じるごく細い細線維が側方で癒合し、100nm程度まで径を増加させることが報告されている<sup>11)</sup>。しかし、本研究では、すでに約67nmの周期構造を持ち、直径も40nm程度まで成長した細線維が、side to sideの癒合でさらに太い径の細線維を形成

していた。そのうえ、太い細線維では、周期構造がずれているものも観察されたため、太い細線維の形成は単に発生・成長過程に見られる現象ではなく、石灰化の進行と関連した、成熟した細線維同志の癒合現象と理解することができる。

生体内では、I型コラーゲンは様々な太さや形態を呈している。層板骨におけるコラーゲン細線維は100nm程度のコラーゲン細線維が周期的な異方性を持って配列し、ベニア板様の構造を呈している<sup>116</sup>。層板骨は、この構造により曲げやねじれ、圧迫、張力など各種の機械的ストレスに対応できる強度を獲得している。また腱などは200nmと非常に太い細線維が長軸方向に平行に配列されており、長軸方向にかかる強大な張力に対応できる構造を呈している<sup>41, 52</sup>。このように、コラーゲン細線維は、生体内ではそれぞれの部位と機能に適った径の太さや配列をとっている。したがって、石灰化骨基質形成時における広径コラーゲン細線維の生理的意義について、以下の2点が推測される。

まず、コラーゲン細線維の癒合による空間形成である。すなわち、コラーゲン等の蛋白分子は、それ自体石灰化を抑制する傾向がある<sup>117</sup>。したがって、石灰化に対し抑制性の性質を持つコラーゲン細線維が癒合により、ある程度の空間を形成して、石灰化球が一定の大きさになるまで成長できる場を提供するのかもしれない。

第二点は、広径コラーゲン細線維による単一環境の構築である。コラーゲン細線維に一旦、石灰化が起これば、細線維内において層板状に結晶が成長する<sup>98, 101</sup>。したがって、広径のコラーゲン細線維は、分子内の石灰化結晶を進める上で単一環境を形成し、界面を



減少させて、成長を促進している可能性があると推察される。

一方、デコリンは細線維に結合し、コラーゲン細線維間の間隔を規定していることが知られている<sup>105, 109</sup>。近年作成されたデコリン遺伝子欠損マウスでも、デコリンがI型コラーゲン細線維間の間隔や細線維の形を規定し、皮膚の強度の決定に関与していると報告している<sup>118</sup>。本研究においても同様な結果を得ており、本研究で検索したコラーゲン細線維の癒合現象においても、デコリンが何らかの機能を果たしていることが推測される。

実際、デコリンの免疫組織化学では、石灰化骨基質に比べ類骨の方に免疫反応が強く、ヒトの骨組織では類骨に局在が見られたというBiancoの報告と一致していた<sup>114</sup>。さらに本研究では、凍結超薄法を用いてデコリンの局在を免疫電顕で解析した。その結果、石灰化を伴わない径の細いコラーゲン細線維周囲にはデコリンの免疫局在が多く見られたが、石灰化にともない径の増大した細線維には、免疫局在が著しく減少していた。この所見はデコリンがコラーゲン細線維の癒合現象に関与することを強く示唆していた。

また、デコリンを含むプロテオグリカンのGAG鎖には負電荷があり、カルシウムイオンを捕捉するため局所のカルシウムイオン濃度が減少したり、あるいは、HA結晶形成においてGAG鎖の負電荷がPO<sub>4</sub>-イオンと競合し、PO<sub>4</sub>-イオンのHA結晶への結合の阻害が生じるため、デコリンにも石灰化の抑制作用があることが知られている<sup>106, 107</sup>。したがって、デコリンの脱却現象には、コラーゲン細線維の癒合現象にも関与する点のみならず、石灰化抑制物質の除去と言う側面もあると考えられる。

デコリン脱却の機序に関しては現在不明である。しかし、基質小胞にはプロテオグリカンを分解するメタロプロテナーゼが含まれていると考えられており<sup>118</sup>、基質小胞よりメタロプロテナーゼが放出されると、周囲に拡散し、デコリンの脱却やコラーゲン細線維の癒合を引き起こす可能性がある。

もう一つの可能性としては、HA結晶の静電気的特性の関与が考えられる。すなわち、HA結晶は負に帯電していると推測されており、10%FBSを含んだMEN中のHA結晶は-29mVのzeta potentialを保持している<sup>119</sup>。一方、GAG鎖も強い負の電荷を持っているので、HA結晶の帯電状態によっては、GAG鎖とコラーゲン細線維間の結合が不安定になる可能性もある。したがって、HA領域の拡大による、物理的環境の変化がデコリンの局在性やコラーゲン細線維の形態の変化を誘発することもあり得ると推測される。

生物学的石灰化は、有機成分と無機質結晶の相互作用により、制御、調節されている可能性がある。今後は、他のプロテオグリカンや骨基質蛋白の機能を検討するとともに、この有機成分と無機質結晶との相互作用に対する細胞の関与を検討する必要がある。

#### IV - 5 小括

コラーゲン性石灰化は、コラーゲン細線維からのデコリンの脱却とコラーゲン細線維の癒合をともなう進行する。デコリンが豊富な靱帯組織においても、デコリンが靱帯骨化に何らかの役割を果たしていると推測された。

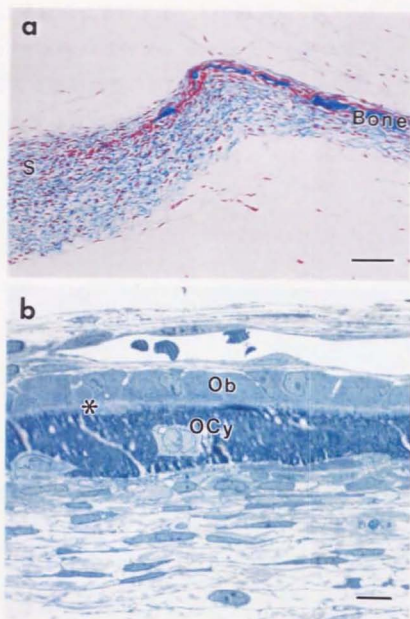


图 1 7

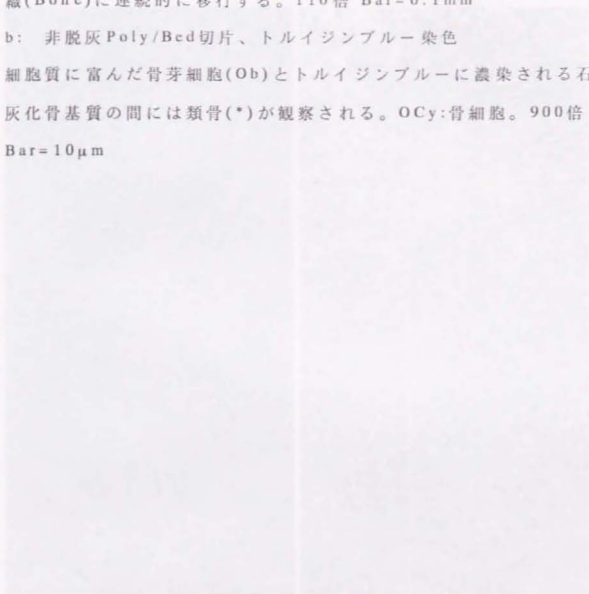
図17 胎生19日のラット頭蓋骨の組織学的所見

a: パラフィン切片、Azan染色。矢状縫合部(S)の線維組織が骨組織(Bone)に連続的に移行する。110倍 Bar=0.1mm

b: 非脱灰Poly/Bed切片、トルイジンブルー染色

細胞質に富んだ骨芽細胞(Ob)とトルイジンブルーに濃染される石灰化骨基質の間には類骨(\*)が観察される。OCy:骨細胞。900倍

Bar=10 $\mu$ m



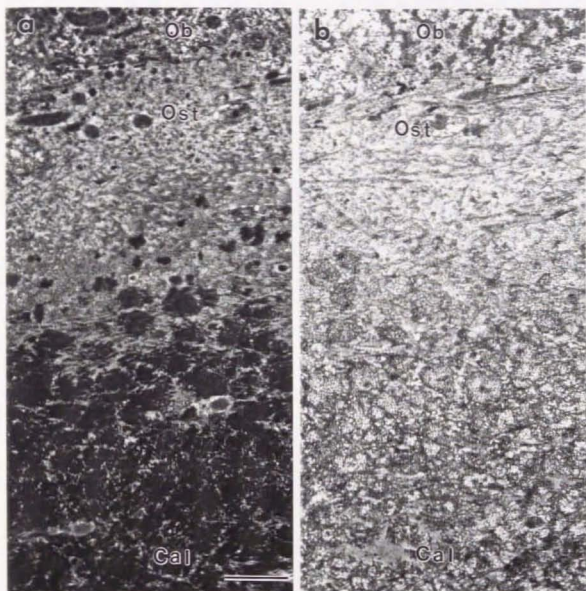


图 18

図18 骨芽細胞に近接する骨基質のTEM像、16000倍

Bar=1 $\mu$ m

a: 非脱灰、無染色。類骨(OS)より徐々に電子密度の高い石灰化領域が拡大し、石灰化骨基質(Cal)が形成される。

b: 脱灰、3重染色。石灰化骨基質(Cal)側でコラーゲン細線維が密に観察される。

Ob:骨芽細胞。



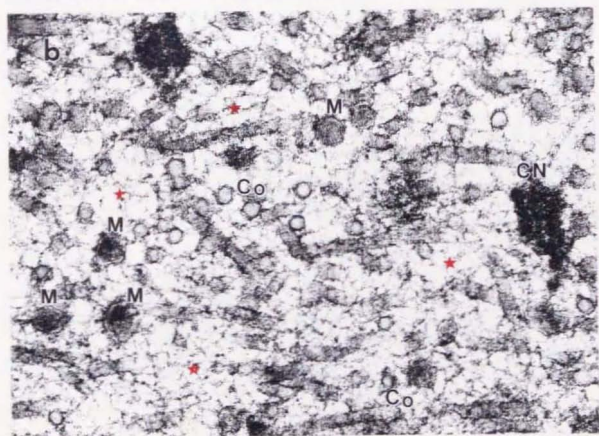
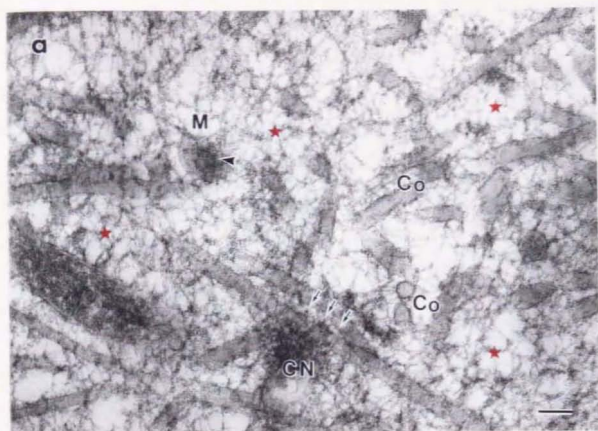


图 19

図19 類骨領域のTEM像、88000倍 Bar=100nm

a: 非脱灰切片、無染色、b: 脱灰切片、3重染色。2重膜に包まれた基質小胞(M)内には針状結晶(矢頭)が観察される。断面が円形の直径40nm程度のコラーゲン細線維(Co)周囲には、網目状の線維構造(赤星)が観察される。石灰化球(CN)から成長した石灰化結晶はコラーゲン細線維まで及んでいる(矢印)。



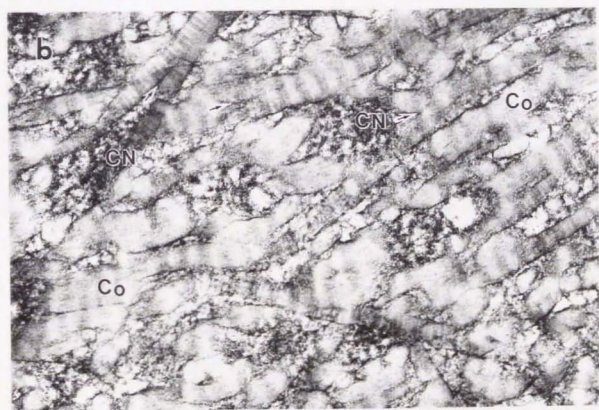
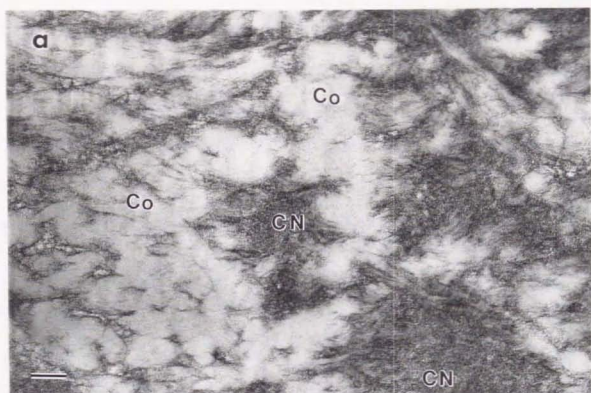
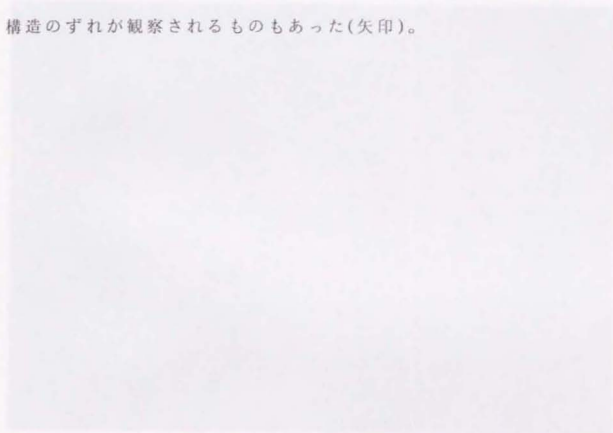


图 20

図20 石灰化骨基質のTEM像、88000倍 Bar=100nm

a: 非脱灰切片、無染色、b: 脱灰切片、3重染色。。類骨で見られたような網目状の線維構造の領域は消失し、コラーゲン細線維(Co)は断面が不定形で直径も100nm程度に増加しているものも見られる。一部のコラーゲン細線維は分枝しており、約67nmの周期構造のずれが観察されるものもあった(矢印)。



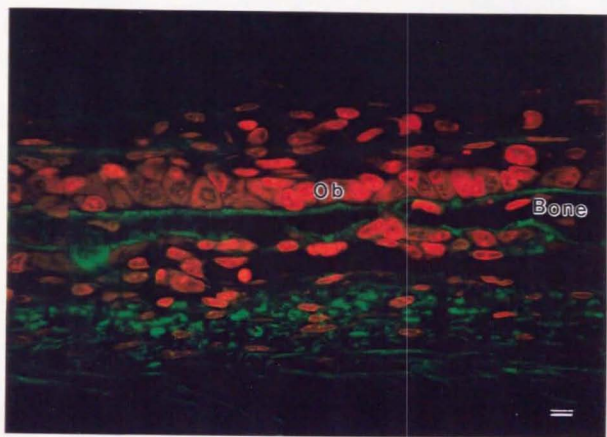


図 2 1

図21 デコリンの免疫組織化学

骨膜の線維芽細胞の細胞外基質および骨芽細胞(Ob)に近接した類骨と思われる部位に免疫反応が観察される。Bone: 骨基質。540倍 Bar=10 $\mu$ m





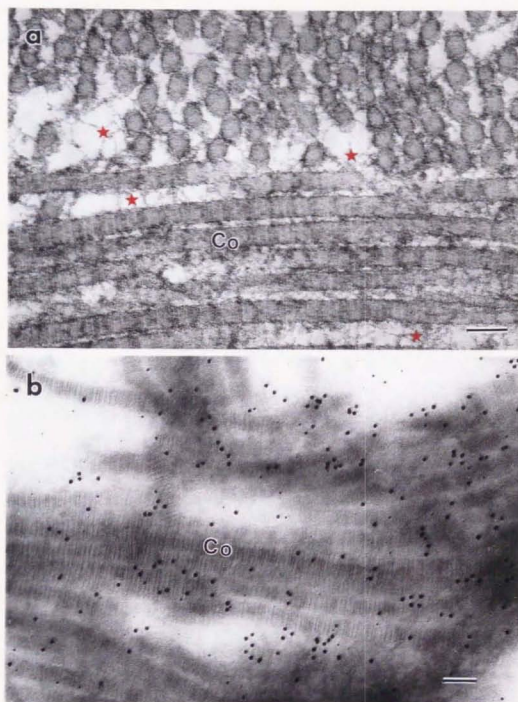


图 2.2

図22 線維組織の微細構造とデコリンの免疫電顕・凍結超薄

法 Bar=100nm

a: 矢状縫合部の細胞外基質、微細構造。

直径40nm程度のコラーゲン細線維(Co)の周囲にはプロテオグリカンと思われる網目状の線維構造が観察される(赤星)。10000倍。

b: 矢状縫合部の細胞外基質、デコリンの免疫電顕・凍結超薄法。

コラーゲン細線維(Co)の周囲ではデコリンの免疫反応が観察される。88000倍。

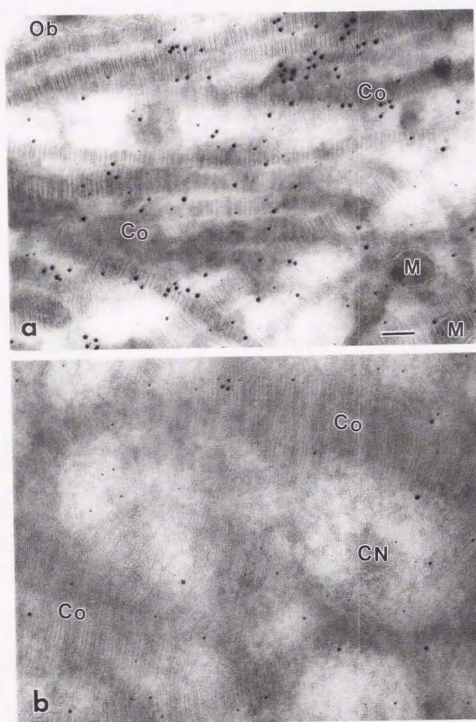


图 2 3

図23 骨基質におけるデコリンの免疫電顕・凍結超薄法、

88000倍 Bar=100nm

- a: 類骨。直径40nm程度のコラーゲン細線維(Co)の周囲に金粒子で示されるデコリンの免疫反応が見られる。M:基質小胞
- b: 石灰化骨基質。石灰化にともない径が増大したコラーゲン細線維(Co)の周囲ではデコリンの免疫反応が減少している。

## 第VI章 総括

本研究では、rhBMP-2の投与により、脊柱靱帯の靱帯細胞が、ALPase活性を獲得した後に軟骨様細胞へと分化し、軟骨内石灰化を経て、内軟骨性骨化の機序で骨へと置換されることが明らかとなった。また、靱帯線維芽細胞の軟骨細胞化に伴いBMP receptorがup-regulateされると同時に、TGF- $\beta$ が外因性BMP-2と共同でautocrine/paracrine機構により軟骨細胞の基質合成と成熟を促進するサイトカインネットワークの存在が示唆された(図24)。

一方、靱帯線維芽細胞の軟骨細胞化に先行して、ALPaseの発現が観察され、ALPaseの発現が発症機転の一つとなることが推測された。この酵素の機能は現在も不明であるが、本編で示したTNAPの免疫組織化学的局在から推測すると、骨基質上に単相配列する骨芽細胞とその血管側に近接して局在する前骨芽細胞、近位尿管の単層立方上皮、間隙に毛細胆管が存在する肝実質細胞は、それぞれ、広い意味での管腔構造を形成しており、この様な管腔構造を形成する原形質膜に局在するという傾向は、TNAPが生体膜における輸送機構に何らかの役割を果たしてる可能性を示唆している。また、TNAPのノックアウトマウスにおいて、ビタミンB6の前駆体であるピリドキサルを投与するにより痙攣発作を予防できる事実からも、TNAPにはリン酸ピリドキサルという親水性の物質からリン酸基を除去し、

ピリドキサルという疎水性の物質に変換することにより膜を貫通させるという作用があると推測され、TNAPがこの様な機序で膜の輸送に関与していることが想像できる。

したがって、TNAPが関与する輸送物質、すなわちTNAPの生体内での基質を検索することがTNAPの生理機能を解析する上で極めて重要であると思われる。また、この情報により、靱帯細胞のALPase獲得の意義が明らかになり、その抑制方法の開発により靱帯骨化の治療法を確立できる可能性を示唆している。

また、もう一つの発症機軸の生物学的石灰化の機序に関しては、胎生期ラット頭蓋骨を用いて、コラーゲン性石灰化は、コラーゲン細線維からのデコリンの脱却とコラーゲン細線維の癒合をともなう進行することを明らかにした(図25)。

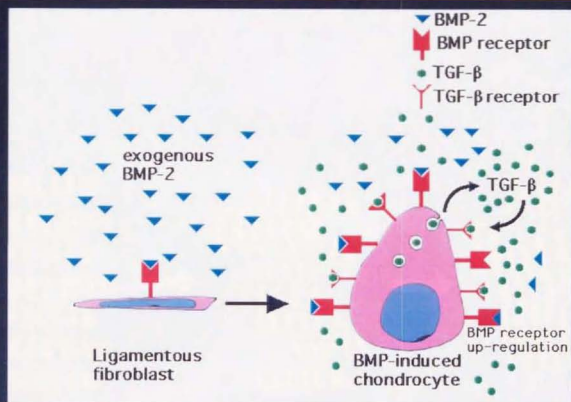
デコリンは、石灰化抑制物質であり、且つコラーゲン細線維を安定化させる機能がある。デコリンの脱却は結晶化抑制物質の除去のみならず、コラーゲン細線維の癒合を促進し、石灰化球形成のための空間を提供するとともにコラーゲン細線維内でのより大きく連続的な結晶成長を可能にすると推測された。本来、靱帯を構成しているI型コラーゲン細線維の周囲にもデコリンが豊富に存在しているので、石灰化に際しては、膜性骨化の際と同様に、デコリンの脱却が生じていると推測された。従って、石灰化に伴うデコリンの脱却機序の同定は、その予防法の開発につながり、本疾患の有効な治療法をもたらす可能性



もあると推測された。



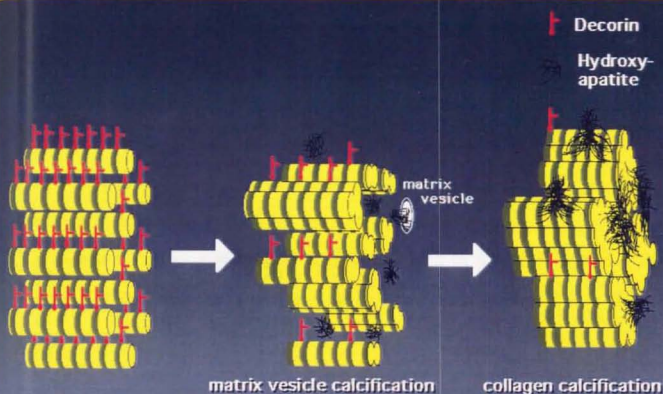
## BMP-induced chondrification in concert with TGF- $\beta$



*Niigata University School of Dentistry*

图 2 4

## まとめ



*Niigata University School of Dentistry*

図 2 5

## 謝 辞

稿を終えるに当たり、終始ご懇篤なご指導とご校閲を賜りました新潟大学歯学部第一口腔解剖講座、小澤英浩教授ならびに東京大学医学部整形外科学教室、黒川高秀教授に心より御礼申し上げます。

また、実験遂行、結果のまとめ及び投稿原稿作成に当たり、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました新潟大学歯学部第一口腔解剖講座、網塚憲生博士に深謝いたします。

本研究を行う上で多大のご指導、ご助言を賜りました鹿児島大学医学部整形外科学講座、酒匂 崇教授、新潟大学歯学部口腔生化学講座、織田公光教授、福岡大学医学部生化学第二講座、池原征夫教授に心より感謝いたします。

rhBMP-2は山之内製薬株式会社より、ご供与いただきました。ご供与に際しご助力を賜りました山之内製薬株式会社、高橋浩一郎様に、厚く御礼申し上げます。ALPase cDNAはMerck Sharap and Dohme Research Laboratories, Department of Bone Biology and Osteoporosis ResearchのGideon A. Rodan博士より、抗BMP receptor抗体は鹿児島大学医学部整形外科学講座、酒匂 崇教授より、TGF- $\beta$ 関連抗体(Ab96、Ab94、Ab95、VPN)は癌研究所生化学部部長、宮園浩平博士より、兔抗ラットTNAP血清は福岡大学医学部生化学第二講座、池原征夫教授より、兔抗マウスデ

コリン抗体(LF113)はNational Institutes of Health、  
National Institutes of Dental ResearchのLarry W.  
Fisher博士にご供与いただきました。心より御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Wood GWII Spinal stenosis. Crenshaw AH, Ed  
Campbell's Operative Orthopaedics 8th ed, vol 5 St.  
Louis, MO: Mosbey Year Book:pp3836-3845:1992
2. Liu KC 1990 Epidemiological study on ossification  
of the posterior longitudinal ligament in the cervical  
spine -comparison onf the prevalency between Japanese  
and Taiwanese. J Jpn Orhtop Assoc 64:401-408
3. 大塚訓喜 柳原光圀 1987 脊柱靱帯骨化症の疫学と統計 整  
形外科MOOK 50 金原出版 pp85-100
4. 山浦伊娑吉 1993 椎間板変性とOPLLの局所要因 脊椎脊  
椎 6:795-801
5. 阪元政郎 武者芳郎 藤田隆一 茂手木三男 古府照男 田  
部英山 池田勝 長谷川和寿 1986 OPLL家系発生例の性ホルモ  
ン 整形外科 37:1555-1563
6. 山浦伊娑吉 黒佐義郎 岡本昭彦 大川淳 1988 頸椎後縦  
靱帯骨化の発生進展機序-臨床・病理面からの検討 臨整外  
23:403-410



7. Kawaguchi H, Kurokawa T, Hoshino Y, Kawahar H, Ogata E, Matsumoto T 1992 Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- $\beta$  in the ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine.

Spine 17:S33-S36

8. 武者芳郎 1990 脊柱靱帯骨化の成因に関する研究-患者の食品摂取傾向と性ホルモンについて 日整会誌 64:1059-1071

9. Ono K, Ota H, Tada K, Hamada H, Takaoka K 1977

Ossified posterior longitudinal ligament, a clinicopathologic study. Spine 2:126-138

10. Okada K, Oka S, Tohge K, Ono K, Yonenobu K, Hosoya T 1991 Thoracic myelopathy caused by ossification of the ligamentum flavum. Clinicopathologic study and surgical treatment. Spine 16:280-287

11. Hattori A, Endoh H, Suzuki K, Kaneda M 1976

Ossification of the thoracic ligamentum flavum with compression of the spinal cord, a report of six cases. J Jap Orthop Ass 50:1141-1146

12. 丹野隆明 1992 遺伝性骨軟骨異常マウス(twy/twyマウス)  
脊椎骨病変の進展およびethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate  
(EHDP)による進展抑制効果に関する実験的研究-脊柱靱帯骨化症  
の発生病態に関連して 日整会誌 66:1073-1083

13. Alpaslan C, Irie K, Takahashi K, Ohashi N, Sakai H,  
Nakajima T, Ozawa H 1996 Long-term evaluation of  
recombinant human bone morphogenetic protein-2 induced  
bone formation with a biologic and synthetic delivery  
system. Brit J Oral Max Surg 34:414-418

14. Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME 1990  
Transforming growth factor-b and the initiation of  
chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur J Cell  
Biol 110:2195-2207

15. Noda M, Camilliere JJ 1989 In vivo stimulation of  
bone formation by transforming growth factor-b.  
Endocrinology 124:2991-2994

16. Tanaka T, Taniguchi Y, Gotoh K, Satoh R, Inazu M,  
Ozawa H 1993 Morphological study of recombinant human  
transforming growth factor beta 1-induced

intramembranous ossification in neonatal rat parietal bone. Bone 14:117-123

17. Miyamoto S, Takaoka K, Yonenobu K, Ono K 1992 Ossification of the ligamentum flavum induced by bone morphogenetic protein. An experimental study in mice. J Bone Joint Surg 74-B:279-283

18. Robinson R 1923 The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. Biochem J 17:286-293

19. Fleisch H, Neuman FW 1961 Mechanisms of calcification: role of collagen, polyphosphates, and phosphate. Am J Physiol 200:1296-1300

20. Anderson HC 1967 Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. J Cell Biol 35:81-101

21. Bonucci E 1967 Fine structure of early cartilage calcification. J Ultrastruct Res 20:33-50

22. Ozawa, H. and T. Yajima 1972 Ultrastructure and

cytochemistry of matrix vesicles in the developing cartilage and tooth germ. Proc 4th Cong Histochem Cytochem, Kyoto, pp311.

23. 山崎正志 後藤澄雄 齊藤康文 望月真人 丹野隆明 小林康正 寺田淳 守屋秀繁 1993 twyマウスにおける脊柱靱帯骨化 整形外科 44:1114-1119

24. 三浦幸雄 田中恵 彦根亮 1993 Zucker fatty ratにおける脊柱靱帯骨化 整形外科 44:1107-1113

25. 陶山哲夫 林浩一郎 1986 頸椎後縦靱帯骨化の実験的研究 日整会誌 60:523-528

26. van de Wijngaert FP, Burger EH 1986 Demonstration of tartrate-resistant acid phosphate in undecalcified, glycolmethacrylate-embedded mouse bone: A possible marker for (pre)osteoclast identification. J Histochem Cytochem 34:1317-1323

27. Ohashi N, Ejiri S, Hanada K, Ozawa H 1997 Changes in type I, II and X collagen immunoreactivity of the mandibular condylar cartilage in a naturally aging rat model. J Bone Miner Metab 15:77-83

28. Fujimura K, Bessho K, Kusumoto K, Ogawa Y, Iizuka T 1995 Experimental studies on bone inducing activity of composites of atelopeptide type I collagen as a carrier for ectopic osteoinduction by rhBMP-2. *Biochem Bioph Res Co* 208:316-322

29. Kenley R, Marden L, Jin L, Ron E, Hollinger JO 1994 Osseous regeneration in the rat calvarium using novel delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Biomed Mater Res* 28:1139-1147

30. Lee SC, Shea M, Battle MA, Kozitza K, Ron E, Turek T, Schaub RG, Hayes WC 1994 Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by RhBMP-2 in PLGA matrix. *J Biomed Mater Res* 28:1149-1156

31. Marden LJ, Hollinger JO, Chaudhari A, Turek T, Schaub RG, Ron E 1994 Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. *J Biomed Mater Res* 28:1127-1138

32. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA 1992 The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg* 74-A:659-670

33. Yahia LH, Garzon S, Strykowski H, Rivard CH 1990 Ultrastructure of the human interspinous ligament and ligamentum flavum. A preliminary study. *Spine* 15:262-268.38

34. Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T, Yoshiki S, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Tanaka H, Omura S, Suda T 1990 The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Bioph Res Co* 172:295-299

35. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa Sehara A, Suda T 1994 Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts



into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127:1755-1766

36. Thies RS, Bauduy M, Ashton BA, Kurtzberg L, Wozney JM, Rosen V 1992 Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology* 130:1318-1324

37. Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Kahn AJ, Suda T, Yoshiki S 1991 Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol* 113:681-687

38. Bassett CAL 1962 Current concepts of bone formation. *J Bone Joint Surg* 44-A:1217-1244

39. 藤田恒夫 藤田尚男 1981 III組織 2. 支持組織 標準組織学 総論 第2版 医学書院 pp110-165

40. Robert L, Grosogeat Y, Robert AM, Robert B 1971 Mechanism of calcification of elastic tissue. Induction of a typical arteriosclerotic lesion by immunization of rabbits with purified elastin. *Israel J Med Sci* 7:431-432

41. Cooper RR, Miso S 1970 Tendon and ligament insertion. A light and electron microscopic study. *J Bone joint Surg* 52-A:1-20

42. Koenig BB, Cook JS, Wolsing DH, Ting J, Tiesman JP, Correa PE, Olson CA, Pecquet AL, Ventura F, Grant RA, Chen GX, Wrana JL 1994 Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 14:5961-5974

43. Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, ten Dijke P, Heldin CH, Miyazono K 1995 Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7632-7636

44. ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH, Miyazono K 1994 Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 269:16985-16988

45. Ishidou U, Kitajima I, Obama H, Maruyama I, Murata

F, Imamura T, ten Dijke P, Miyazono K, Sakou T 1995  
Enhanced expression of type I receptor for bone  
morphogenetic proteins during bone formation. *J Bone  
Miner Res* 10:1651-1659

46. Burstone MS 1962 Alkaline phosphatase, naphthol AS  
phosphate method. In: Burstone MS (ed) *Enzyme  
histochemistry and its application on the study of  
neoplasms*. Academic Press, New York, pp275-276

47. Olofsson A, Miyazono K, Kanzaki T, Colosetti P,  
Engstrom U, Heldin CH 1992 Transforming growth factor-  
b 1, -b 2, and -b 3 secreted by a human glioblastoma cell  
line. Identification of small and different forms of large  
latent complexes. *J Biol Chem* 267:19482-19488

48. Taketazu F, Kato M, Gobl A, Ichijo H, ten Dijke P,  
Itoh J, Kyogoku M, Ronnelid J, Miyazono K, Heldin C,  
Funa K 1994 Enhanced expression of transforming growth  
factor-b $\alpha$ s and transforming growth factor-b type II  
receptor in the synovial tissues of patients with  
rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 70:620-630

49. Henriksen R, Gobl A, Wilander E, Oberg K,

Miyazono K, Funa K 1995 Expression and prognostic significance of TGF- $\beta$  isotypes, latent TGF- $\beta$ 1 binding protein, TGF- $\beta$  type I and type II receptors, and endoglin in normal ovary and ovarian neoplasms. *Lab Invest* 73:213-220

50. Raqib R, Lindberg AA, Bjork L, Bardharn PK, Wretling B, Anderson U, Andersson J 1995 Down-regulation of gamma interferon, tumor necrosis factor type I, interleukin 1 (IL-1) type I, IL-3, IL-4, and transforming growth factor  $\beta$  type I receptors at the local site during the acute phase of *Shigella* infection. *Infect Immun* 63:3079-3087

51. Amizuka N, Karaplis AC, Henderson JE, Warshawsky H, Lipman ML, Matsuki Y, Ejiri S, Tanaka M, Izumi N, Ozawa H, Goltzman D 1996 Haploinsufficiency of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) results in abnormal postnatal bone development. *Dev Biol* 175:166-176

52. Yamada M 1976 Ultrastructural and cytochemical studies on the calcification of the tendon-bone joint. *Arch Histol Jap* 39:347-378

53. Hattori H, Kawai M, Yasue K, Mizutani H, Kobayashi M, Kaneda T, Hoshino T 1993 A correlative immuno-light and electron microscopic study on the type I collagen in the bone morphogenetic protein-induced cartilage. *J Electron Microsc* 4:400-406

54. Mizutani H, Hattori H, Yasue K, Senga K, Kawai M, Ueda M, Hoshino T, 1996 The hypertrophic chondrocytes of the bone morphogenetic protein induced cartilage. *Jpn J Oral biol* 38:309-316

55. Horisaka Y, Okamoto Y, Matsumoto N, Yoshigimura Y, Hirano A, Nishida M, Kawada J, Yamashita K, Takagi T 1994 Histological changes of implanted collagen material during bone induction. *J Biomed Mater Res* 28:97-103

56. Seyedin SM, Thompson AY, Bentz H, Rosen DM, McPherson JM, Conti A, Siegel NR, Galluppi GR, Piez KA 1986 Cartilage-inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 261:5693-5695

57. Hiraki Y, Inoue H, Hirai R, Kato Y, Suzuki F 1998  
Effect of transforming growth factor beta on cell  
proliferation and glycosaminoglycan synthesis by rabbit  
growth-plate chondrocytes in culture. *Biochim Biophys  
Acta* 969:91-99

58. Ballock RT, Heydemann A, Wakefield LM, Flanders  
KC, Roberts AB, Sporn MB 1993 TGF- $\beta$  1 prevents  
hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of  
gene expression for cartilage matrix proteins and  
metalloproteases. *Dev Biol* 158:414-429

59. Kato Y, Iwamoto M, Koike T, Suzuki F, Takano Y  
1998 Terminal differentiation and calcification in rabbit  
chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes:  
regulation by transforming growth factor  $\beta$  and serum  
factors. *Proc Nat Acad Sci USA* 85:9552-9556

60. Thorp BH, Anderson I, Jakowlew SB 1992  
Transforming growth factor- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 and - $\beta$ 3 in cartilage  
and bone cells during endochondral ossification in the  
chick. *Development* 114:907-911



61. Schmid P, Cox D, Bilbe G, Maier R, McMaster GK, 1991 Differential expression of TGF b1, b2 and b3 genes during mouse embryogenesis. *Development* 111:117-130
62. Franzen P, ten Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schulz P, Heldin C, Miyazono K 1993 Cloning of a TGFb type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGFb type II receptor. *Cell* 75:681-692
63. Attisano L, Carcamo J, Ventura F, Weis FM, Massague J, Wrana JL 1993 Identification of human activin and TGFb type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75:671-680
64. Kam W, Clauser E, Kim YS, Kan YW, Rutter WJ 1985 Cloning, sequencing, and chromosomal localization of human term placental alkaline phosphatase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8715-8719
65. Weiss MJ, Henthorn PS, Lafferty MA, Slaughter C, Raducha M, Harris H 1986 Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7182-7186

66. Henthorn PS, Raducha M, Edwards YH, Weiss MJ, Slaughter C, Lafferty MA, Harris H 1987 Nucleotide and amino acid sequences of human intestinal alkaline phosphatase: close homology to placental alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1234-1238

67. Millan JL, Manes T 1988 Seminoma-derived Nagao isozyme is encoded by a germ-cell alkaline phosphatase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3024-3028

68. Terao M, Mintz B 1987 Cloning and characterization of a cDNA coding for mouse placental alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7051-7055

69. Manes T, Glade K, Ziomek CA, Millan JL 1990 Genomic structure and comparison of mouse tissue-specific alkaline phosphatase genes. *Genomics* 8:541-554

70. Noda M, Yoon K, Thiede M, Buenaga R, Weiss M, Henthorn P, Harris H, Rodan GA 1987 cDNA cloning of alkaline phosphatase from rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. *J Bone Miner Res* 2:161-164

71. Thiede MA, Yoon K, Golub EE, Noda M, Rodan GA 1988 Structure and expression of rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) alkaline phosphatase: product of a single copy gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:319-323
72. MacGregor GR, Zambrowicz BP, Soriano P 1995 Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. *Development* 121:1487-1496
73. Waymire KG, Mahuren JD, Jaje JM, Guilarte TR, Coburn SP, MacGregor GR 1995 Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nature Genetics* 11:45-51
74. Takami N, Oda K, Fujiwara T, Ikehara Y 1990 Intracellular accumulation and oligosaccharide processing of alkaline phosphatase under disassembly of the Golgi complex caused by brefeldin A. *Eur J Biochem* 194:805-810

75. Oda K, Cheng J, Saku T, Takami N, Sohda M, Misumi Y, Ikehara Y, Millan JL 1994 Conversion of secretory proteins into membrane proteins by fusing with a glycosylphosphatidylinositol anchor signal of alkaline phosphatase. *Biochem J* 301:577-583

76. Ali NN, Rowe J, Teich NM 1996 Constitutive expression of non-bone/liver/kidney alkaline phosphatase in human cell lines. *J Bone Miner Res* 11:512-520

77. Miki A, Tanaka Y, Ogata S, Ikehara Y 1986 Selective preparation and characterization of membranous and soluble forms of alkaline phosphatase from rat tissues. A comparison with the serum enzyme. *Eur J Biochem* 160:41-48

78. Mayahara H, Hirano H, Saito T, Ogawa K 1967 The new lead citrate method for the ultracytochemical demonstration of activity of non-specific alkaline phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolase). *Histochemie* 11:88-96

79. Yoshiki S, Kurahashi Y 1971 A light and electron microscopic study of alkaline phosphatase activity in the

early stage of dentinogenesis in the young rat. Arch Oral Biol 16:1143-1154

80. Matsuzawa T, Anderson HC 1971 Phosphatases of epiphyseal cartilage studied by electron microscopic cytochemical methods. J Histochem Cytochem 19:801-808

81. de Bernard B, Bianco P, Bonucci E, Costantini M, Lunazzi GC, Martinuzzi P, Modricky C, Moro L, Panfili E, Pollesello P, Stagni N, Vittur F 1986 Biochemical and immunohistochemical evidence that in cartilage an alkaline phosphatase is a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding glycoprotein. J Cell Biol 103:1615-1623

82. Takahashi R 1972 Electron microscopic study of the osteogenic cells in alveolar bone of rat, with special reference to the localization of alkaline and acid phosphatase activity. Shikagakuho 72:1437-1467 (In Japanese)

83. Morris DC, Masuhara K, Takaoka K, Ono K, Anderson HC 1992 Immunolocalization of alkaline phosphatase in osteoblasts and matrix vesicles of human fetal bone. Bone Miner 19:287-298

84. Pinero GJ, Farach CM, Devoll RE, Aubin JE, Brunn JC, Butler WT 1995 Bone matrix proteins in osteogenesis and remodelling in the neonatal rat mandible as studied by immunolocalization of osteopontin, bone sialoprotein, alpha 2HS-glycoprotein and alkaline phosphatase. Arch Oral Biol 40:145-155

85. Weinreb M, Shinar D, Rodan GA 1990 Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. J Bone Miner Res 5:831-842

86. Kurahashi Y, Yoshiki S 1972 Electron microscopic localization of alkaline phosphatase in the enamel organ of the young rat. Arch Oral Biol 17:155-63

87. Deporter DA, Ten Cate A 1976 Fine structural localization of alkaline phosphatase in relation to enamel formation in the mouse molar. Arch Oral Biol 21:7-12

88. Takano Y, Ozawa H, Crenshaw MA 1986 Ca-ATPase and ALPase activities at the initial calcification sites of dentin and enamel in the rat incisor. Cell Tissue Res



89. Al Kawas S, Amizuka N, Bergeron JJM, Warshawsky H 1996 Immunolocalization of cation-independent mannose 6-phosphate receptor and cathepsin B in the enamel organ and alveolar bone of the rat incisor. *Calcif Tissue Int* 59:192-199

90. Sandstrom B 1970 On the specificity of histochemically demonstrable bile canalicular phosphatase activities. *Histochemie* 22:316-323  
Scott JE 1988 Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochemical J* 252:313-323.

91. Johansson S, Wide M 1994 Changes in the pattern of expression of alkaline phosphatase in the mouse uterus and placenta during gestation. *Anat Embryol* 190:287-296

92. Brandes D, Zetterqvist H, Sheldon H 1956 Histochemical techniques for electron microscopy: Alkaline phosphatase. *Nature* 177:382-383

93. Garrett JR, Harrison JD 1971 Alkaline-phosphatase and adenosine-triphosphatase histochemical reactions in

the salivary glands of cat, dog and man, with particular reference to the myoepithelial cells. *Histochemie* 24:214-229

94. Zhang Y, Shao JS, Xie QM, Alpers DH 1996  
Immunolocalization of alkaline phosphatase and  
surfactant-like particle proteins in rat duodenum during  
fat absorption. *Gastroenterology* 110:478-88

95. Neuman WF, Newman BF 1958 The chemical dynamics  
of bone mineral. In: eds. University of Chicago Press,  
Chicago

96. Solomon GF, Neuman WF 1960 *J Biol chem* 235:2502.

97. Fitton-Jackson S 1957 *Proc Roy Soc B* 146:270

98. Christoffersen J, Landis WJ 1991 A contribution  
with review to the description of mineralization of bone  
and other calcified tissues in vivo. *Anat Rec* 230:435-450

99. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM,  
McGarvey ML, Martin GR 1981 Osteonectin, a bone-  
specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26:99-

100. Dean DD, Schwarz Z, Muniz OE, Gomez R, Swain LD, Howell DS, Boyan BD 1992 Matrix vesicles are enriched in metalloproteinases that degrade proteoglycans. *Calcif Tissue Int* 50:342-349

101. Traub W, Arad T, Weiner S 1989 Three-dimensional ordered distribution of crystals in turkey tendon collagen fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9822-9826

102. Landis WJ, Hodgins KJ, Arena J, Song MJ, McEwen BF 1996 Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography. *Micros Res Techniq* 33:192-202

103. Decker JD, Hall SH 1985 Light and electron microscopy of the new born sagittal suture. *Anat Rec* 212:81-89

104. Scott JE, Orford CR 1981 Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the d band in the gap region. *Biochem J* 197:213-216.

105. Pulkkinen L, Alitalo T, Krusius T, Peltonen L 1992 Expression of decorin in human tissues and cell lines and defined chromosomal assignment of the gene locus (DCN). *Cytogenet Cell Genet* 60:107-11.
106. Chen CC, Boskey AL 1985 Mechanisms of proteoglycan inhibition of hydroxyapatite growth. *Calcif Tissue Int* 37:395-400
107. Boskey AL, Maresca M, Armstrong AL, Ehrlich MG 1992 Treatment of proteoglycan aggregates with physcal enzymes reduces their ability to inhibit hydroxyapatite proliferation in a gelatin gel. *J Orthop Res* 10:313-319
108. Cribb AM, Scott JE 1995 Tendon response to tensile stress: an ultrastructural investigation of collagen:proteoglycan interactions in stressed tendon. *J Anat* 187:423-428
109. Hahn RA, Birk DE 1992 beta-D xyloside alters dermatan sulfate proteoglycan synthesis and the organization of the developing avian corneal stroma.

110. Fisher LW, Termine J D, Dejter S, Whitson SW, Yanagishita M, Kimura JH, Hascall VC, Kleinman HK, Hassell JR, Nilson B 1983 Proteoglycans of developing bone. J Biol Chem 258:6588-6594

111. Fisher LW, Hawkins GR, Tuross N, Termine JD 1987 Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. J Biol Chem 262:9702-9708

112. Takeuchi Y, Kodama Y, Matsumoto T 1994 Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity. J Biol Chem 269:32634-32638

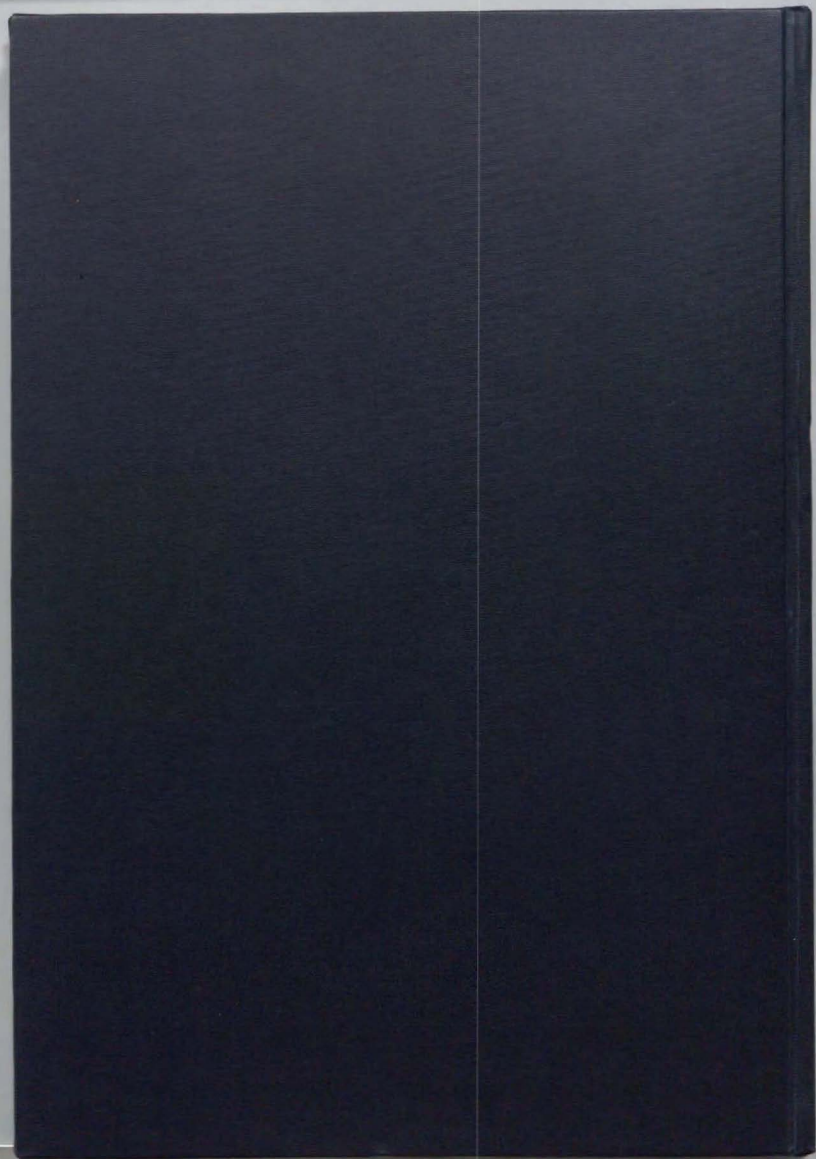
113. Tokuyasu KT, 1986 Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry. J Microsc 143:139-149

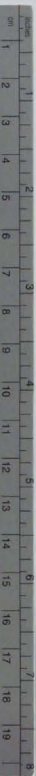
114. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG 1990 Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. J Histochem Cytochem

115. Fleischmajer R, Olsen BR, Timpl R, Perlish JS, Lovelace O 1983 Collagen fibril formation during embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3354-3358
116. Giraud-Guille MM 1988 Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcif Tissue Int* 42:167-180
117. Katz EP 1969 The kinetics of mineralization in vitro. I. The nucleation properties of 640-angstrom collagen at 25 degrees. *Biochim Biophys Acta* 194:121-129.
118. Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV 1997 Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 136:729-743
119. Suzuki T, Yamamoto T, Toriyama M, Nishizawa K, Yokogawa Y, Mucalo M, Kawamoto Y, Nagata F, Kameyama T 1997 Surface instability of calcium phosphate ceramics in tissue culture medium and the effect on adhesion and growth of anchorage-dependent



animal cells. J Biomed Mater Res 34:507-517





# Kodak Color Control Patches

© Kodak 2007 TM Kodak

Blue

Cyan

Green

Yellow

Red

Magenta

White

3/Color

Black



## Kodak Gray Scale



© Kodak 2007 TM Kodak

A

1

2

3

4

5

6

M

8

9

10

11

12

13

14

15

B

17

18

19

