HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Histochemical assessment of accelerated bone remodeling and reduced mineralization in IL-6 deficient mice [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	森谷, 康人
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第14539号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81284
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yasuhito_Moritani_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（歯学）　　氏　名　森谷　康人

審 査 担 当 者　　主査　教授　網塚　憲生
副査　教授　田村　正人
副査　教授　飯村　忠浩

学　位　論　文　題　名

Histochemical assessment of accelerated bone remodeling and reduced mineralization in IL-6 deficient mice

（IL-6 欠損マウスにおける骨リモデリング促進と骨基質石灰化抑制の組織学的解析）

審査は，審査担当者全員の出席の下，Zoom を用いたオンライン公聴会として実施し，はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われた。内容を以下に記す。

Gp130 ファミリーの 1 つである IL-6 は，全身の様々な組織や器官における機能調節に寄与している。これまでに IL-6 の様々な骨代謝調節作用が報告されており，IL-6 が破骨細胞形成および骨吸収を促進するという報告がある一方，骨芽細胞分化を抑制するという報告も存在し，IL-6 が骨芽細胞や破骨細胞機能に与える影響の全貌は未だ明らかにされていない。そこで，本研究では，IL-6 が骨芽細胞および破骨細胞に与える影響を明らかにする目的で，IL-6 遺伝子欠損マウスの長管骨を組織化学的に検索した。

生後 8 週齢の IL-6 遺伝子欠損マウスおよび野生型マウスの大腿骨と脛骨において，マイクロ CT を用いた骨構造解析・骨密度測定，ならびに，各種組織解析（HE 染色，組織非特異型アルカリホスファターゼ：TNALPase，sclerostin，cathepsin K，osteopontin，I型コラーゲン，V-ATPase d3 subunit，PKR，RANK，RANKL，F4/80，CD206 免疫組織化学，酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ：TRAP 酵素組織化学，von Kossa 染色），透過型電子顕微鏡による微細構造解析を施行した。また, 一部の大腿骨から total RNA を抽出し, real-time PCR 法を用いて *Runx2, Osterix, Sost, Cathepsin K, Rankl, Rank, Opg, Cd11c, Cd206, Tnfα* 遺伝子の発現量を定量的に解析した。

その結果，IL-6 遺伝子欠損マウスの大腿骨は，野生型マウスに比較して，骨量が有意に増加する一方，骨密度は有意に減少していた。また，von Kossa 染色によって，IL-6 遺伝子欠損マウスの大腿骨の骨幹端骨梁における未石灰化骨基質が増加していることが示された。IL-6 遺伝子欠損マウスでは，野生型マウスと比較して，骨幹端における TNALPase 陽性骨芽細胞領域が増加しており, 骨芽細胞分化に必須の転写因子である *Runx2* や *Osterix* の遺伝子発現が有意に上昇していた。一方で，骨芽細胞を抑制する sclerostin の免疫陽性骨細胞が増加しており, sclerostin をコードする *Sost* の発現量は IL-6 遺伝子欠損マウスで有意に上昇していた。IL-6 遺伝子欠損マウスで *Tnfα* 遺伝子の発現が有意に上昇していたが，TNFα が sclerostin 産生を促進する報告を考慮すると，IL-6 が，直接 *Sost* 発現を調節する可能性およ

び TNFα を介する可能性が推測された。さらに，sclerostin 変異が骨硬化症を誘導するという報告があることから，IL-6 欠損マウスにおける *Sost* 発現の上昇は骨基質石灰化を抑制する可能性が推察された。

IL-6 遺伝子欠損マウスの大腿骨では, TRAP 陽性破骨細胞数が有意に増加するとともに, 多数の osteopontin 陽性セメントラインが認められたことから, 活発な骨改造が推測された。cathepsin K 陽性破骨細胞および *Cathepsin K* 遺伝子発現は，いずれも IL-6 遺伝子欠損マウスで増加する傾向を示したものの有意差は得られず，また，*Rank* や *Opg* 遺伝子発現も野生型マウスと比較して有意差を示さなかった。しかしながら IL-6 遺伝子欠損マウスは，*Rankl* 遺伝子発現を有意に上昇させており，IL-6 遺伝子欠損マウスの骨芽細胞は RANKL 強陽性を呈していた。このことから，IL-6 欠損状態では，骨芽細胞における *Rankl* 発現上昇により破骨細胞形成が促進するとともに，骨芽細胞形成も促進されていることから，高骨代謝回転状態を呈することが強く示唆された。さらに，IL-6 遺伝子欠損マウスでは，骨髄内に局在する F4/80 陽性マクロファージの数に有意な変化は認められないものの，これらマクロファージが，野生型マウスに比べて，成長板軟骨と一次骨梁移行部（以下，骨・軟骨移行部）の領域に集積する傾向が認められた。また，IL-6 遺伝子欠損マウスの骨・軟骨移行部に集積したマクロファージは CD206 陽性を示しており，*Cd206* 遺伝子の発現量も有意に増加していた。近年，M2 マクロファージが RANKL 存在下で破骨細胞に分化することが報告されたことから，IL-6 遺伝子欠損マウスの骨・軟骨移行部では，CD206 陽性 M2 マクロファージが RANKL 陽性骨芽細胞と細胞間接触することにより，破骨細胞に分化する可能性が推測された。

以上のことから，IL-6 欠損状態では，骨芽細胞の RANKL 発現上昇による破骨細胞の形成促進，特に，CD206 陽性マクロファージからの破骨細胞への促進が推察され，高骨代謝回転を生ずるとともに骨基質石灰化が抑制されることが示唆された。

審査については，審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。以下のその項目を記す。

（１） 本研究における実験動物の週齢，雌雄の選択理由について
（２） 骨組織における IL-6 産生骨芽細胞の局在について
（３） IL-6 欠損状態における骨細胞分化・成熟度や機能の変化について
（４） IL-6 欠損状態における類骨形成および骨基質石灰化について
（５） IL-6 欠損状態における血清中の炎症性サイトカインやミネラル代謝調節因子の変化について

上記の質疑応答から，申請者から明快な説明と回答が得られた。申請者は本研究の内容を中心とした専門分野はもとより，関連分野について十分な理解と学識を有していることが確認された。

以上，審査担当者全員は，学位申請者が博士（歯学）の学位を授与するに相応しいと認めた。