



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Histochemical assessment of osteoclast-like giant cells in Rankl-/- mice [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	宮本, 幸奈
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15495号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89593
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yukina_Miyamoto_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 宮 本 幸 奈

学 位 論 文 題 名

Histochemical assessment of osteoclast-like giant cells in *Rankl*^{-/-} mice
(*Rankl* 遺伝子欠損マウスにおける破骨細胞様細胞の組織学的検索)

キーワード（5つ） RANKL, c-fos, 破骨細胞, 骨芽細胞, siglec-15

破骨細胞の分化過程には、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), c-fos, receptor activator of nuclear factor- β (RANK)/receptor activator of nuclear factor- β ligand (RANKL)などのいくつかの因子が関与する。M-CSF は単球・マクロファージ／破骨細胞共通の前駆細胞の分化形成に作用し、c-fos は単球・マクロファージ／破骨細胞共通前駆細胞から破骨細胞への分化を開始する初期段階で作用することが知られている。一方、RANK/RANKL シグナルは、破骨細胞前駆細胞に存在する RANK と、主に骨芽細胞系細胞に存在する RANKL の結合により破骨細胞分化誘導とその後の骨吸収を促進する。これらの因子は、破骨細胞の各分化段階で作用すると考えられているため、RANK/RANKL シグナルが作用する直前の前駆細胞には、ある程度、破骨細胞または前破骨細胞の特徴が備わっている可能性があるが、その詳細は不明な点が多い。そこで、本学位研究では、*Rankl* 遺伝子欠損マウス (*Rankl*^{-/-}マウス) において、破骨細胞としての特徴を一部獲得している細胞が果たして存在するのか、組織化学的・微細構造学的に検索した。

生後 10 週齢雄性 *Rankl*^{-/-}マウス、*c-fos*^{-/-}マウスおよび野生型マウスを、麻酔下にて 4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定し、大腿骨・脛骨を摘出した。その後、脛骨を 10% EDTA 溶液にて脱灰し、通法に従ってパラフィン包埋し、薄切切片を作成した。これらパラフィン切片を用いて、HE 染色、osteocalcin, F4/80, 組織非特異型アルカリホスファターゼ (TNALPase), siglec-15, galectin-3, vacuolar H⁺-ATPase (H⁺-ATPase) の $\alpha 3$ サブユニット, cathepsin K, MMP-9, MA1, EphB4, ephrinB2, Runx2 免疫組織化学、ならびに、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 酵素組織化学を行った。一方、大腿骨は、固定の 72 時間および 24 時間前にカルセイン溶液を皮下投与した後、未脱灰のまま MMA 樹脂に包埋して切片を作成し、カルセイン標識の観察を行った。また、一部の大腿骨は、1/2 Karnovsky 固定後、5% EDTA 溶液で脱灰し、エポキシ樹脂に包埋した。その後、準超薄切片のトルイジンブルー染色、および、超薄切片の透過型電子顕微鏡観察を行った。

Rankl^{-/-}マウスの脛骨近位端では、TRAP 陽性を示す破骨細胞は認められず、骨髓腔を多量の骨梁が満たしていた。しかし、塊状の細胞外基質を取り込んでいる 2 個以上の核を有

する大型細胞が認められた。多核大型細胞に取り込まれた細胞外基質は、トルイジンブルー異染色性、カルセイン標識、かつ、osteocalcin 陽性を示したことから、軟骨やその周囲に骨基質が沈着した石灰化基質である可能性が強く示唆された。そこで、透過型電子顕微鏡にて微細構造観察を行ったところ、*Rankl*^{-/-}マウスの大型細胞は、野生型マウスでみられる破骨細胞の明帯に類似した構造によって軟骨基質や骨基質を取り込んでいたが、波状縁の形成は認められなかった。また、細胞内部に多数のミトコンドリアや小胞・空胞が認められた。従って、*Rankl*^{-/-}マウスで認められる多核大型細胞は、不完全ながらも破骨細胞のいくつかの特徴的な微細構造や機能を有することが確認された（以下、*Rankl*^{-/-}マウスの大型細胞を破骨細胞様大型細胞と記す）。

Rankl^{-/-}マウスの破骨細胞様大型細胞において、破骨細胞またはマクロファージの各種マーカーの局在を検索した。その結果、*Rankl*^{-/-}マウスの破骨細胞様大型細胞は、野生型マウス破骨細胞と同様に、DAP12 を介して破骨細胞融合やアクチンリング形成・骨吸収に関与する siglec-15, phagocytosis に関与する galectin-3, そして、酸分泌を担う vacuolar H⁺-ATPase 陽性を示した。しかし、破骨細胞様大型細胞は、TRAP, cathepsin K, MMP-9 などの破骨細胞マーカー、ならびに、F4/80 や MA1 などのマクロファージマーカーを示さなかった。以上の所見から、*Rankl*^{-/-}マウスでは、RANK/RANKL シグナルが作用する段階まで分化した破骨細胞前駆細胞は、明帯の形成や石灰化基質の取り込み能など破骨細胞の特徴を一部有していることが推測された。

さらに、成熟破骨細胞だけでなく破骨細胞前駆細胞も存在しないことが知られている *c-fos*^{-/-}マウス、および、*Rankl*^{-/-}マウス、野生型マウスにおける骨芽細胞を検索した。*c-fos*^{-/-}マウスでは、骨幹端から骨端部にかけて TNALPase 陽性/Runx2 陽性骨芽細胞がごくわずかにしか観察されなかったのに対し、野生型マウスや *Rankl*^{-/-}マウスでは、多数の TNALPase 陽性/Runx2 陽性骨芽細胞が認められた。EphB4/ephrinB2 の局在を検索すると、野生型マウスでは、EphB4 陽性を示す血管および骨芽細胞と ephrinB2 陽性破骨細胞が観察されたのに対し、*c-fos*^{-/-}マウスでは EphB4 陽性血管は局在するものの、ephrinB2 陽性破骨細胞や EphB4 陽性骨芽細胞はほとんど認められなかった。一方、*Rankl*^{-/-}マウスでは、野生型マウスと同様に、破骨細胞様大型細胞が ephrinB2 陽性反応を示し、EphB4 陽性を示す血管と骨芽細胞が観察された。*Rankl*^{-/-}マウスでは、破骨細胞様大型細胞の周囲に活性型骨芽細胞に近接して局在したことから、*Rankl*^{-/-}マウスの破骨細胞様大型細胞が EphB4/ephrinB2 を介して骨芽細胞を活性化する可能性が推察された。

以上より、*Rankl*^{-/-}マウスでは、RANK/RANKL シグナルが作用する前の段階まで分化した破骨細胞前駆細胞が存在すること、また、それらの前駆細胞は siglec-15, galectin-3, H⁺-ATPase 陽性を示し、破骨細胞の明帯に類似した構造、ならびに、骨・軟骨基質の取り込み能を獲得している可能性が示唆された。