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_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　宮本　幸奈

審 査 担 当 者
主査　教授　網塚　憲生
副査　教授　山本　恒之
副査　教授　飯村　忠浩
副査　准教授　長谷川　智香

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）

審査は，審査担当者全員の出席の下，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．

破骨細胞の分化過程には，M-CSF, c-fos, RANKL などの因子が関与することが知られている．そのうちの 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．RANK/RANKL シグナルが作用する直前の前駆細胞には，ある程度，破骨細胞の特徴が備わっている可能性があると考えられるが，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の脛骨の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 a3 サブユニット，cathepsin K，MMP-9，MA1，EphB4，ephrinB2，Runx2 の免疫組織化学，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，大腿骨では，カルセイン標識の観察，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なかったが，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．この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，軟骨や骨基質などの石灰化基質である可能性が強く示唆された．透過型電子顕微鏡で観察すると，*Rankl*$^{-/-}$マウスの大型細胞は，波状縁を形成しないが，破骨

細胞の明帯に類似した構造や、細胞内に多数のミトコンドリアや小胞・空胞を持つことから，不完全ながらも破骨細胞のいくつかの微細構造的特徴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は，TRAP，cathepsin K などの破骨細胞マーカー，および，F4/80，MA1 などのマクロファージマーカー陽性を示さなかった．一方，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．以上から，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．

Rankl$^{-/-}$マウスの破骨細胞様大型細胞が骨芽細胞系細胞に与える影響を明らかにする目的で破骨細胞が存在しない *c-fos*$^{-/-}$マウスを検索したところ，*c-fos*$^{-/-}$マウスではごくわずかな TNALPase 陽性/Runx2 陽性骨芽細胞しか観察されなかったのに対し，野生型マウスと *Rankl*$^{-/-}$マウスでは，多数の TNALPase 陽性/Runx2 陽性骨芽細胞を認めた．また，野生型マウスと *Rankl*$^{-/-}$マウスでは，破骨細胞様大型細胞が ephrinB2 陽性反応を示し，EphB4 陽性を示す血管と細胞体のふくよかな活性型骨芽細胞が観察された。一方，*c-fos*$^{-/-}$マウスの骨芽細胞は EphB4 陽性を示さず扁平化しており，休止期骨芽細胞の状態を示していた．よって，破骨細胞様大型細胞は 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．

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）　破骨細胞様大型細胞が分泌している酵素について
（２）　*Rankl* 遺伝子欠損マウスの骨芽細胞の形態について
（３）　*Rankl* 遺伝子欠損マウスの作成における遺伝子改変について
（４）　*Rankl* 遺伝子欠損マウスにおける肝臓などでの造血について
（５）　破骨細胞様大型細胞における RANKL 欠損を補償する因子などについて
（６）　骨細胞特異的に RANKL を欠損させた場合の破骨細胞について

上記の質疑応答から，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値するものと認めた．