HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Increased numbers but reduced resorption activity of osteoclasts in toll-like receptor 2 (TLR2) deficient mice [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	宗山, 昂史
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15496号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89620
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takafumi_Muneyama_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　宗 山　昂 史

学　位　論　文　題　名

Increased numbers but reduced resorption activity of osteoclasts in toll-like receptor 2 (TLR2) deficient mice

（Toll 様受容体 2 (TLR2)欠損マウスの破骨細胞数増加と骨吸収能低下について）

キーワード（５つ）　破骨細胞，Toll-like receptor 2 (TLR2)，骨組織，siglec-15，RANK

Toll 様受容体(Toll-like receptor: TLR)は，種々の病原体関連分子パターン(pathogen-associated molecular patterns: PAMPs)やダメージ関連分子パターン(damage-associated molecules patterns: DAMPs)を感知し自然免疫に関与する．Toll 様受容体 2（TLR2）は, 単球, マクロファージ, 樹状細胞, 血管内皮細胞などに存在し, lipopolysaccharide, peptidoglycans，lipopeptides など様々な病原体に関連した分子パターンを認識する．TLR2 は TLR1 または TLR6 と heterodimer を形成し, NF-κB と MAP キナーゼ活性を介したシグナル伝達を行うことが知られている．一方で，破骨細胞は，単球・マクロファージと共通の前駆細胞に由来することから, 特に細菌感染による歯周病モデルにおいて, 一部の PAMPs が TLR2 や TLR4 を介して破骨細胞の歯槽骨吸収を調節する可能性が報告されてきた．しかしながら，非感染状態，すなわち，PAMPs が存在しない状態で，TLR2 が破骨細胞の分化や機能に及ぼすか否かについては未だ明らかにされていない. そこで, 本研究では, *TLR2* 遺伝子欠損マウス(*TLR2*$^{-/-}$マウス)の大腿骨や脛骨を組織化学的・微細構造学的に検索した．

生後 8 週齢雄性 *TLR2*$^{-/-}$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固定し，大腿骨と脛骨を採取した．左大腿骨は，マイクロ CT を用いて骨構造解析と骨密度測定を行った後，EDTA 脱灰し，通法にてパラフィン切片を作製した．これらの切片を用いて，siglec-15，RANK，RANKL，CD206，F4/80，cathepsin K，vacuolar type H^+-ATPase (a3 subunit)，MMP-9，組織非特異型アルカリホスファターゼ(TNALPase)，PHOSPHO1 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)酵素組織化学を実施した．大腿骨遠位部の成長板直下 600×600μm の領域において，Bone Volume/Tissue Volume (BV/TV)，TNALPase 陽性骨芽細胞領域，PHOSPHO1 陽性骨芽細胞領域, ならびに, TRAP 陽性破骨細胞数を計測し，Student's *t-test* による統計解析を実施した．一方，右脛骨は未脱灰のまま，また，左脛骨は EDTA 脱灰後にエポキシ樹脂に包埋した．未脱灰試料は準超薄切片による von Kossa 染色に，脱灰試料は超薄切片による透過型電子顕微鏡解析に供した．右大腿骨からは，total RNA を抽出し，逆転写反応後，RT-PCR 法お

よび real time-PCR 法を用いて *Dc-stamp, Oc-stamp, Trap, Cathepsin K, Siglec-15, Rank, Rankl, F4/80, Cd206* 遺伝子発現を検索した．

TLR2$^{-/-}$マウスの大腿骨遠位部では，野生型マウスに比較して，骨幹端の BV/TV が有意に増加しており，石灰化した骨梁が成長板軟骨から骨幹部にかけて連続性を保って伸長していた．*TLR2*$^{-/-}$マウスでは，野生型マウスと比べて，TRAP 陽性破骨細胞数が有意に増加していた．しかし，*TLR2*$^{-/-}$マウスでは，破骨細胞の融合因子である *Dc-Stamp* と *Oc-Stamp* の発現が上昇していたにもかかわらず，多核を示す TRAP 陽性破骨細胞は少なく，単核の TRAP 陽性細胞が有意に増加していた．近年，シアル酸結合免疫グロブリン様レクチンの一つである siglec-15 が破骨細胞の細胞融合や RANKL シグナルを調節する可能性，さらに，TLR2 が siglec-15 の内因性リガンドである可能性が見いだされたことから，siglec-15 と RANK の局在を検索した．その結果，*TLR2*$^{-/-}$マウスで観察された多核 TRAP 陽性破骨細胞および単核の TRAP 陽性細胞ともに siglec-15 と RANK を発現しており，その周囲には RANKL 陽性骨芽細胞系細胞が観察された．また，*Siglec-15* 発現は野生型マウスと *TLR2*$^{-/-}$マウスで有意差は認められなかった．よって，*TLR2* 遺伝子の欠損環境では，siglec-15 陽性/RANK 陽性を示す多数の単核破骨細胞が形成されること，また，内因性リガンドである *Siglec-15* 発現には影響を及ぼさない可能性が示唆された．

TLR2$^{-/-}$マウスにおいて，いくつかの細胞マーカーや基質分解酵素について検索を行った．*TLR2*$^{-/-}$マウスでは，単球・マクロファージのマーカーである *F4/80* と *Cd206* 遺伝子発現が有意に低下したが，一部の TRAP 陽性細胞は F4/80 陽性を示した．また，*TLR2*$^{-/-}$マウスの TRAP 陽性細胞は，野生型マウスと同様に，MMP-9 や vacuolar type H^+-ATPase の陽性反応を示したが，一部の TRAP 陽性細胞は cathepsin K 陽性反応を示さず，発達した波状縁も認められなかった．従って，*TLR2*$^{-/-}$マウスでは，骨吸収能が低下した小型の破骨細胞が形成される可能性が推測された．一方，*TLR2*$^{-/-}$マウスの骨芽細胞について，骨芽細胞・前骨芽細胞のマーカー酵素である TNALPase，ならびに，骨基質石灰化を行う骨芽細胞に局在する PHOSPHO1 を指標として検索したところ，*TLR2*$^{-/-}$マウスでは，野生型マウスに比較して，TNALPase 陽性骨芽細胞領域および PHOSPHO1 陽性骨芽細胞領域が有意に高い値を示した．このことから，*TLR2*$^{-/-}$マウスで増加した小型の破骨細胞は，骨吸収能は低下しているものの，骨芽細胞活性に関与する可能性が示唆された．

以上より，非感染状態にある *TLR2*$^{-/-}$マウスの骨組織では，TRAP 陽性破骨細胞が増加するものの，多核の成熟破骨細胞は減少し，cathepsin K 産生や波状縁の発達が乏しい小型の TRAP 陽性細胞が増加することが明らかとなった．従って，TLR2 は，非感染下でも破骨細胞の細胞融合や骨吸収能に関与する可能性が推測された．