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_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　宗山　昂史

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　田村　正人
副査　准教授　長谷川　智香

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）

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．

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．特に，Toll 様受容体 2 遺伝子欠損マウス(*TLR2*$^{-/-}$マウス)に細菌感染させた歯周病モデルを用いた実験により，TLR2 は破骨細胞の歯槽骨吸収に関与することが報告されている．しかし，非感染状態，即ち，正常な生体内で TLR2 が破骨細胞の分化・機能に及ぼす影響については明らかにされていない．そこで本研究では，*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 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，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．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$^{-/-}$マウスでは，野生型マウスに比べて，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 TRAP 陽性破骨細胞数が有意に増加しており，また，*Dc-Stamp* と *Oc-Stamp* の発現が上昇していたにも関わらず，多核を示す TRAP 陽性破骨細胞は少なく，単核で小型の TRAP 陽性細胞が有意に増加していた．近年，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報告されていることから，siglec-15 と RANK の局在を検索した．その結果，*TLR2*$^{-/-}$マウスの多核 TRAP 陽性破骨細胞および単核の TRAP 陽性細胞ともに siglec-15 陽性，ならびに，RANK 陽性を示しており，*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*$^{-/-}$マウスでは，TRAP 陽性破骨細胞は siglec-15 陽性/RANK 陽性を示しながらも単核で小型の細胞が多く，骨量も有意に増加する可能性が示唆された．

TLR2$^{-/-}$マウスにおける TRAP 陽性単核細胞は，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．しかし，一部の TRAP 陽性細胞は cathepsin K 陽性反応を示さず，発達した波状縁も有していなかった．従って，TLR2 欠損状態では，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*$^{-/-}$マウスは，野生型マウスに比べて，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，骨芽細胞の活性化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が，その多くは単核かつ小型の破骨細胞であること，また，cathepsin K 産生や波状縁の発達が乏しいことが示唆された．以上より，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．

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）破骨細胞の融合と波状縁形成に対する TLR2 の関与について
（２）破骨細胞における TLR2 の発現・局在について
（３）TLR2 欠損状態にて単核の破骨細胞が増加する理由について
（４）TLR2 欠損状態における破骨細胞と骨芽細胞のカップリングについて
（５）マクロファージまたは破骨細胞の分化に対する TLR2 の関与について
（６）TLR2 欠損マウスにおける骨芽細胞による石灰化について

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．