

学位論文題名

免疫グロブリン様レクチンSiglec-15を介した
共刺激シグナルによる破骨細胞分化制御機構に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】破骨細胞の分化・活性化制御機構の解明は骨破壊性疾患の病態と治療を考える上で必要不可欠である。破骨細胞は、造血細胞を起源とする単球/マクロファージ系の細胞であり、Macrophage colony stimulating factor (M-CSF)存在下で、Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)の刺激により、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 陽性の多核巨細胞(破骨細胞)へと分化する。RANKLは、TRAF6,c-fos,カルシウムシグナルなど様々な刺激経路を介して、破骨細胞分化のマスター転写因子である Nuclear factor of activated T cells (NFATc1)を誘導するが、このうちカルシウムシグナルを介した刺激経路についてはまだ不明の点が多い。近年の研究により、免疫グロブリン様受容体と immunoreceptor tyrosine-based activation motif(ITAM)をもつアダプター蛋白を介した共刺激が、カルシウムシグナルを賦活化すると考えられているが、そのリガンドやメカニズムの詳細は不明のままである。

免疫グロブリン様受容体の一種である Siglec ファミリーは、特定のシアリル糖鎖と結合する内因性レクチンであり、血球系細胞に広く発現しているが、その機能の多くは未解明のままである。我々は、過去の研究において破骨細胞前駆細胞に発現するシアリル糖鎖がその分化に関与することを見出していたことから、Siglec が共刺激経路を介して破骨細胞分化を制御しているという仮説を立てた。

本研究では、この仮説を検証するため、破骨細胞分化における Siglec の発現、分布の解析および共刺激経路への関与を調査した。

【方法と結果】マウスの骨髄系細胞に存在が示されている Siglec-1, -3, -5(F), -15, -H に関して、破骨細胞分化過程における遺伝子発現の経時的変化を real-time qPCR を用いて調査した。初代培養細胞である骨髄マクロファージ (BMM) およびマウスマクロファージ株化細胞株 RAW264.7 において、Siglec-1, -3, -5, -H は分化に伴って遺伝子発現が減少もしくは不変であったが、唯一 Siglec-15 は分化に伴って発現が増加した。

次に免疫染色を行ったところ、Siglec-15 は前駆細胞では細胞膜にわずかに発現を認めるのみであったが、前破骨細胞および成熟破骨細胞では細胞膜および核周囲に強く発現していた。興味深いことに RANKL 刺激後、細胞融合過程にある前破骨細胞など一部の細胞には強い発現がみられたが、発現が弱い単核の細胞も混在していた。フローサイトメトリー法を用いて Siglec-15 陽性細胞の分布変化を調査したところ、RANKL 刺激後、Siglec-15 陽性細胞は 17.1%から 37.5%に増加し、平均蛍光強度の増強が確認された。また、異なる蛍光強度のピークが複数混在していたことから、RANKL 刺激後には Siglec-15 の発現量が異なるヘテロジニアスな細胞群が形成されることも裏付けられた。

Siglec-15 遺伝子を過剰発現させた安定化細胞株 (RAW.Siglec-15(+)) を作成し、Siglec-15 の破骨細胞分化に及ぼす影響を調査した。RAW.Siglec-15(+)を用いて RANKL 刺激後に TRAP 染色を行ったところ、コントロールの RAW264.7 (RAW.Ctl) に比べ非常に多くの核を内包する巨大な破骨細胞の形成がみられた。またピットフォーメーションアッセイを行う

と RAW.Siglec-15(+)は RAW.Ctl に比べ有意に大きな吸収窩を形成した。破骨細胞分化マーカーの遺伝子発現量は全て RANKL 刺激後 RAW.Siglec-15(+)において上昇した。また細胞融合関連遺伝子のうち CD44 と SIRP α の遺伝子発現は不変であったが DC-STAMP と CD9 は上昇した。

Siglec-15 遺伝子をノックダウンした安定化細胞株 (RAW.Siglec-15(-)) を作成し、同様に破骨細胞分化に及ぼす影響を調査した。RAW.Siglec-15(-)では RANKL 刺激後も TRAP 陽性多核巨細胞はほとんどみられなかった。ピットフォーメーションアッセイでも吸収窩をほとんど形成せず、破骨細胞分化マーカーの遺伝子発現もそれぞれ抑制されていた。

次に免疫沈降法を用いて破骨細胞内で Siglec-15 が ITAM モチーフを持つ細胞内アダプター蛋白 DAP12 と会合している事を確認した。更に DAP12 の下流シグナルであるリン酸化蛋白 PLC γ 1,2 のリン酸化やその下流のカルシウムシグナルが RAW.Siglec-15(-)では抑制され、RAW.Siglec-15(+)では賦活化されていることを、それぞれウェスタンブロッティングと蛍光イメージング法を用いて明らかにした。また免疫染色を行うと NFATc1 の核内移行は RAW.Siglec-15(-)でほとんどみられず、RAW.Siglec-15(+)で賦活化された。

【考察】本研究により我々は、Siglec-15 が DAP12 と会合しカルシウムシグナルを介した共刺激経路を賦活化することで破骨細胞分化を制御していることを明らかにした。Siglec-15 は骨髄細胞に発現する Siglec としては唯一、ITAM をもつ DAP12 と会合していることから、Siglec-15 が破骨細胞分化に促進的に制御している事が想定されたが、このことは本研究における遺伝子改変細胞を用いた PLC γ のリン酸化、カルシウムシグナル、NFATc1 の核内移行に関する実験結果によって証明された。

RANKL 刺激後に異なる Siglec-15 発現量のヘテロジニアスな細胞群を形成したことは非常に興味深い結果である。過去の報告でも骨髄マクロファージは RANKL 刺激後に、偽足を伸ばし周囲の細胞を取り込もうとする細胞と、取り込まれてゆく細胞とでヘテロジニアスな細胞群を形成するといわれている。本研究においても Siglec-15 の高発現細胞は細胞融合過程の細胞であった。このことは Siglec-15 が破骨細胞分化のうち細胞融合という過程で特に重要な役割を果たしていることを示唆していると考えている。

一方で本研究には疑問点も残されている。破骨細胞には、今回我々が見出した Siglec-15 の他にも、TREM2 や SIRP- β などアダプター蛋白 DAP12 と会合する免疫グロブリン様受容体 (DARs) の存在が知られている。これらの DAP12 を介した共刺激経路により RAW.Siglec-15(-)においても成熟破骨細胞が少なからず形成されるだろうと想定されたが、実際には TRAP 陽性多核巨細胞は殆ど形成されなかった。この現象に対して考え得る理由としては、破骨細胞に複数存在する DARs は同時に賦活化されることでその機能が発揮されるのではないかということである。この考えは TREM2 遺伝子をノックアウトした細胞で、他の DARs が存在しているにもかかわらず、破骨細胞分化が抑制されたという過去の報告からも裏付けられる。この疑問を解決するためにも Siglec-15 のさらなる分子機構の解明が必須であると考えている。

今後の研究において、他の DARs 同様未だ明らかにされていない Siglec-15 の内因性リガンドを同定することは、Siglec-15 のさらなる分子機構の解明のためには必要不可欠である。また実際の生体内での骨代謝における役割を明らかにするためには遺伝子改変動物を用いた *in vivo* 研究も今後必須であると考えている。

【結論】我々はマウス破骨細胞前駆細胞に Siglec-15 が存在し、分化過程において発現上昇する事を明らかにした。また、Siglec-15 は DAP12 と会合し、カルシウムシグナルを介した共刺激経路により NFATc1 の核内移行を誘導することで、破骨細胞の分化を制御している事を明らかにした。

学位論文審査の要旨

主査	教授	上出利光
副査	教授	三浪明男
副査	教授	藤田博美
副査	教授	久下裕司
副査	准教授	遠山晴一

学位論文題名

免疫グロブリン様レクチンSiglec-15を介した 共刺激シグナルによる破骨細胞分化制御機構に関する研究

申請者は、先ず、破骨細胞の分化および Siglec ファミリー分子の説明を行い、本研究の実施に至った背景を明確に説明した。本研究において、マクロファージ細胞株である RAW 細胞を用いて、糖結合能を有する Siglec ファミリー分子群の中で、Siglec-15 分子に着目し、その破骨細胞分化における役割およびその分化制御機序について明らかにした。RAW 細胞に Siglec-15 を遺伝子導入した RAW.Siglec-15(+)細胞株を用いて、遺伝子導入前の細胞 RAW.Ctl を対象群にして実験を進めた。RAW.Siglec-15(+)において RAW.Ctl と比べ破骨細胞分化は亢進する事を明らかにした。更に、破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 の発現が亢進し、カルシトニンレセプター、カテプシン K、インテグリン β 、TRAP 等の既知の破骨細胞分化マーカー群の遺伝子発現も亢進している事を示した。Siglec-15 分子による破骨細胞分化の制御機序に関して、申請者は、Siglec-15 が DAP12 と会合し、共刺激経路を介して破骨細胞分化を制御していることを明らかにした。

発表後、主査の上出教授からは、ヒトにおいて遺伝的な Siglec の異常が原因となる疾患は存在しているのかと質問がなされた。申請者は、現在の所、未だそのような疾患は報告されていないが、特に Siglec-15 は 2007 年に発見された比較的新しい Siglec であることから今後発見される可能性があるかと返答した。さらに申請者は、Siglec のリガンドであるシアリル糖鎖が、喘息や悪性腫瘍、ウイルス感染などさまざまな疾患に関与する分子である事から Siglec もヒトの疾患と関係が深い事が考えられる旨の説明をなした。Siglec-15 遺伝子の過剰発現系を用いた実験を行っており、その結果下流のシグナルが亢進しているが、これは Siglec-15 分子のアグリゲーションによる結果であり、真のリガンドが作用した結果だと言えるのかと質問に対し、申請者は、リガンドが同定されていないために本研究においてはそれを証明することは現段階ではできないとの返答をなした。加えて現在進行中の研究を引用し Siglec-15KO マウスを用いた系において、Siglec-15 全長 cDNA を導入することで、破骨細胞分化がレスキューされており、さらに Siglec-15 のリガンド結合部位にミューテーションを組み込んだ Siglec-15-R143A の導入ではレスキューされないことから、Siglec-15 の外因性導入においてもリガンドが作用してシグナルを活性化していると考えていると明確に回答した。最後に本研究では RAW264.7 細胞を用い

た実験であることから、マクロファージの RANKL 誘導性の破骨細胞分化過程の検討を行っているが、骨髄細胞から破骨細胞への分化においては Siglec-15 がどのような役割を果たしているかとの質問を受けた。申請者は、既に Siglec-15KO マウスを用いた実験で骨髄細胞培養などは計画していると回答した。

更に、副査の藤田、久下、三浪の各教授および遠山准教授から多くの質問があり、活発な質疑応答があった。即ち、破骨細胞における Siglec-15 の局在について、作成した RAW.Siglec-15(+)細胞でも細胞膜上に Siglec-15 が発現していたかどうか。NFATc1 の結合実験などを行ったか。他の DAP12 会合受容体の影響についてはどうか。Siglec-15 のリガンドはどの細胞が発現しているのか。RANK-RANKL シグナルによって Siglec-15 の発現が上昇する機序は明らかになっているのか等の質問である。これらの質問に対して申請者は、自らの実験結果やこれまでの論文報告および自己の未発表の実験結果を引用しつつ概ね妥当な回答を成し得た。

この論文は、Siglec-15 を介した共刺激シグナルが破骨細胞の分化に極めて重要な役割を果たしている事を明らかにした点で高く評価され、今後の異常な破骨細胞活性化による骨吸収を示す骨疾患の新たな治療法の開発の糸口となる事が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。