

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 小松 幹

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

【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-κB 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】 マウスの骨髓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变であったが、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、発現が弱い单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も、 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窓を形成した。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 SIRPa の遺伝子発現は不变であったが 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つた。ピットフォーメーションアッセイでも吸収窓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 は骨髓細胞に発現する 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。過去の報告でも骨髓マクロファージは 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つた。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。