



Title	Siglec-15を介した生体内骨吸収制御機構に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	亀田, 裕亮
Description	配架番号 : 2143
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11661号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59051
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yusuke_Kameda_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 亀田 裕亮

学 位 論 文 題 名

Siglec-15 を介した生体内骨吸収制御機構に関する研究
(Studies on regulatory mechanism of osteoclast development and
bone resorption by Siglec-15)

【背景と目的】

骨吸収を司る破骨細胞の分化には、M-CSF と RANKL の二つのサイトカインが必須であるが、近年、第 3 のシグナルとして immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) を介した共刺激シグナルの重要性が明らかとなってきた。ITAM を含有する DAP12 と FcR γ がこの共刺激シグナルに関与するが、これらのアダプター蛋白と会合し、その賦活化に関与する免疫受容体の機能や役割についてはまだ不明な点が多い。Siglec-15 はシアル酸を認識する免疫グロブリン様受容体であり、DAP12 と会合する事が報告された新しい分子である。我々は Siglec-15 と破骨細胞分化の関連を調査するとともに、Siglec-15 の生体内での生理機能を明らかにするために Siglec-15 欠損マウス (*Siglec-15*^{-/-}) の表現型を調査した。また、閉経後骨粗鬆症において Siglec-15 が治療ターゲットとなり得るか検証する目的で、野生型 (WT) と *Siglec-15*^{-/-} マウス卵巣摘出モデルを用いて骨量の変化を調査し、閉経後骨粗鬆症の key molecule である TNF α による破骨細胞分化誘導能を検証した。

【方法と結果】

・骨表現型の解析

WT、及び *Siglec-15*^{-/-} マウスの骨表現型をマイクロ CT 及び脛骨組織切片にて検討した。*Siglec-15*^{-/-} マウスは軽度の大理石骨病を呈したが、骨組織中には TRAP 陽性細胞が多数認められた。しかし、詳細に観察すると *Siglec-15*^{-/-} マウスの TRAP 陽性細胞は単核の小さなものが多く、成熟多核破骨細胞の形成が阻害されていた。興味深い事に、成長軟骨直下の一次海綿骨においては *Siglec-15*^{-/-} マウスでも WT と同様に巨大な多核破骨細胞が形成されており、生体内では部位により Siglec-15 の機能を代償する機構が存在する事が示唆された。

・破骨細胞分化能の検証

Siglec-15 が破骨細胞の分化、機能に重要であることが *Siglec-15*^{-/-} マウスの解析により明らかとなったが、その詳細なメカニズムを検証するため、*Siglec-15*^{-/-} 骨髄マクロファージ (BMM) を *in vitro* で破骨細胞へと分化誘導した。すると、*Siglec-15*^{-/-} BMM は M-CSF と RANKL 存在下で培養しても多核細胞を殆ど形成せず、わずかにみられた多核細胞もアクチンリングの形成が障害されていた。牛皮質骨切片上で培養し、骨吸収窩を染色すると、*Siglec-15*^{-/-} 破骨細胞の骨吸収能は著しく低下していた。レトロウイルス

を用いて *Siglec-15* を強制発現させると多核巨細胞の形成能が回復したが、一方、*DAP12* と会合できない *Siglec-15* 変異蛋白を強制発現させても多核巨細胞の形成能は回復しなかったことから、*Siglec-15* は *DAP12* を介して破骨細胞分化および細胞骨格形成を調節していることが示された。

・ *Siglec-15* による破骨細胞分化制御機構の検証

生体内では、*DAP12* の他にもう一つの ITAM アダプター蛋白である *FcR γ* を介したシグナルが存在し、*DAP12* の働きを一部代償すると考えられている。そこで、*FcR γ* シグナルの賦活化のため、骨芽細胞との共存培養および typeII collagen coat dish 上での破骨細胞分化誘導を行ったところ、いずれにおいても多核細胞形成能は改善傾向を示したもののアクチンリングは形成されなかった。しかし、意外なことに typeII collagen をコートした牛皮質骨切片上で破骨細胞の分化誘導を行うと、*Siglec-15*^{-/-}BMM も正常なアクチンリングを有する多核破骨細胞を形成するようになった。すなわち、typeII collagen により賦活化される *FcR γ* シグナル、および骨基質の両者が存在すると、*Siglec-15* の機能を代償できる事がわかった。

Siglec-15 による破骨細胞分化制御の詳細なメカニズムを明らかにするため、M-CSF、オステオポンチン、RANKL により活性化される細胞内シグナル伝達経路を検証した。すると、*Siglec-15*^{-/-}においても M-CSF、オステオポンチンによるシグナルは正常に活性化されたが、RANKL 刺激による PI3K/Akt、Erk のリン酸化が障害されていた。

・ マウス卵巣摘出モデルの検証

WT、及び *Siglec-15*^{-/-}マウスの卵巣を摘出し、手術後の骨量の変化をマイクロ CT で評価すると、両者ともに卵巣摘出後には骨量が減少したが、*Siglec-15*^{-/-}マウスでは WT と比較し骨量の減少が起りにくかった。脛骨組織切片を観察すると、WT、*Siglec-15*^{-/-}マウスいずれも卵巣摘出後には破骨細胞数が増加したが、*Siglec-15*^{-/-}マウスでは多核破骨細胞数が少なく、単核の小さなものが多く形成されていた。閉経後骨粗鬆症の key molecule である TNF α による破骨細胞分化誘導能を検証すると、*Siglec-15*^{-/-}BMM は TNF α の存在下でも正常な破骨細胞に分化できなかった。

【考察】

本研究の結果から、*Siglec-15* は生体内において破骨細胞の分化に必須な分子であることが示された。*Siglec-15* は *DAP12* を介して RANKL シグナルを調節する事で破骨細胞分化を制御していた。*Siglec-15*^{-/-}破骨細胞は RANKL シグナルの障害により正常な細胞骨格を形成できず、骨吸収能が低下するが、typeII collagen 及び骨基質の両者が存在下する状況においては *Siglec-15* の機能が代償された。この事より、*Siglec-15* は生体内では特に二次海綿骨の領域において破骨細胞分化に重要な役割を果たしている事が示された。*Siglec-15*^{-/-}マウスは卵巣摘出後の骨量減少に抵抗性を示し、TNF α の存在下でも正常な破骨細胞を形成できなかったことから、*Siglec-15* をターゲットとした破骨細胞制御が閉経後骨粗鬆症の治療に有効である可能性が示された。

【結論】

Siglec-15 は RANKL シグナルを調節する事で破骨細胞分化及び細胞骨格形成を制御している。

Siglec-15 は生体内では特に二次海綿骨領域における骨代謝制御に重要な役割を果たす。

Siglec-15 は閉経後骨粗鬆症を始めとした、骨破壊性疾患の治療ターゲットとして有用である。