HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Siglec-15を介した生体内骨吸収制御機構に関する研究
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11661
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59052
Type	doctoral thesis
File Information	Yusuke_Kameda.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

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)

2015 年 3 月

北 海 道 大 学

亀田　裕亮
Yusuke Kameda

学 位 論 文

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)

2015 年 3 月

北 海 道 大 学

亀田　裕亮
Yusuke Kameda

目　　次

発表論文目録および学会発表目録 …… 1 頁

緒言 …… 3 頁
略語表 …… 6 頁

第一章
緒言 …… 8 頁
実験方法 …… 10 頁
実験結果 …… 13 頁
考察 …… 15 頁

第二章
緒言 …… 16 頁
実験方法 …… 17 頁
実験結果 …… 24 頁
考察 …… 33 頁

第三章
緒言 …… 35 頁
実験方法 …… 36 頁
実験結果 …… 40 頁
考察 …… 46 頁

第四章
緒言 …… 47 頁
実験方法 …… 49 頁
実験結果 …… 51 頁
考察 …… 63 頁

考察 …… 65 頁
総括及び結論 …… 67 頁
謝辞 …… 68 頁
引用文献 …… 69 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

1. Yusuke Kameda, Masahiko Takahata, Miki Komatsu, Shintaro Mikuni, Shigetsugu Hatakeyama, Tomohiro Shimizu, Takashi Angata, Masataka Kinjo, Akio Minami, Norimasa Iwasaki.

   Siglec-15 regulates osteoclast differentiation by modulating RANKL-induced phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Erk pathways in association with signaling adaptor DAP12.

   Journal of Bone and Mineral Research 28: 2463-75 (2013)

2. Yusuke Kameda, Masahiko Takahata, Shintaro Mikuni, Tomohiro Shimizu, Hiroki Hamano, Takashi Angata, Shigetsugu Hatakeyama, Masataka Kinjo, Norimasa Iwasaki.

   Siglec-15 is a potential therapeutic target for postmenopausal osteoporosis.

   Bone (in press)

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. 亀田　裕亮，高畑　雅彦，岩崎　倫政
   破骨細胞の分化において免疫グロブリン様受容体 Siglec-15 は DAP12 を介して細胞骨格形成を制御する
   第 30 回日本骨代謝学会学術集会
   平成 24 年 7 月 19 日-21 日
   京王プラザホテル（新宿）

2. Yusuke Kameda, Masahiko Takahata, Tomohiro Shimizu, Hiroki Hamano, Norimasa Iwasaki
   Siglec-15 is a potential therapeutic target for postmenopausal osteoporosis

Orthopaedic Research Society 2013 Annual Meeting
January 26-29, 2013
Hyatt Regency New Orleans

3. 亀田　裕亮，高畑　雅彦，三國　新太郎，畠山　鎮次，清水　智弘，濱野　博基，安形　高志，金城　政孝，岩崎　倫政
破骨細胞誘導因子 Siglec-15 は閉経後骨粗鬆症の治療ターゲットとなり得るか？
第 34 回日本骨形態計測学会
平成 26 年 6 月 12 日-14 日
さっぽろ芸文館

4. 亀田　裕亮，高畑　雅彦，三國　新太郎，畠山　鎮次，清水　智弘，濱野　博基，安形　高志，金城　政孝，岩崎　倫政
破骨細胞誘導因子 Siglec-15 は閉経後骨粗鬆症の治療ターゲットとなり得るか？
第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会
平成 26 年 10 月 9 日-10 日
城山観光ホテル（鹿児島）

緒 言

破骨細胞は骨吸収をつかさどる細胞であり，骨形成を行う骨芽細胞とともに骨の恒常性を維持している．生体内では，骨リモデリングと呼ばれる骨の再構築が常に行われており，破骨細胞が古い骨基質を吸収した後に，骨芽細胞により骨が新生される．骨リモデリングは巧妙に制御されており，生理的環境下においては，骨吸収と骨形成は均衡のとれた状態に保たれている．

骨吸収と骨形成が均衡を保つメカニズムについては未だ不明な点が多いが，破骨細胞と骨芽細胞の相互作用によってバランスが保たれている．例えば，骨吸収によって骨基質から放出される transforming growth factor β (TGF-β)や insulin-like growth factor-1 (IGF-1)は骨芽細胞の活性化に寄与するが[1,2]，破骨細胞自身が産生する Semaphorin-4D は骨芽細胞の機能を抑制する[3]．また，骨芽細胞は破骨細胞の分化や活性化に必須である macrophage colony stimulating factor (M-CSF)と receptor activator of NF-κB ligand (RANKL)を分泌するとともに，RANKL のデコイレセプターである osteoprotegrin (OPG)を分泌して破骨細胞の分化を抑制している[4]．このように，破骨細胞と骨芽細胞はお互いの機能や活性を調整することで緻密に骨の恒常性を維持している．

しかし，骨粗鬆症や関節リウマチ，感染性骨髄炎，悪性腫瘍の溶骨性骨転移などの疾患では炎症性サイトカイン等の破骨細胞活性化因子の分泌増加により骨吸収が過剰となり，骨形成との均衡がくずれるために骨量が減少し，骨破壊が進行する[5-8]．そのため, これらの疾患に対する治療には, 破骨細胞の機能を制御する事が重要であり, 新たな治療法開発のためには破骨細胞の分化・活性化機構を明らかにすることが必要不可欠である．

破骨細胞は，造血幹細胞由来の単球・マクロファージ系細胞であり， M-CSF と RANKL の存在下で，破骨細胞に分化する[4]．M-CSF は主にマクロファージの増殖や破骨細胞の生存に必要であり，RANKL は破骨細胞への分化，活性化に働くことがわかっている．RANKL の受容体は tumor necrosis factor (TNF)受容体スーパーファミリーに属する receptor activator of NF-κB ligand (RANK)である. RANKL 欠損マウスならびに RANK 欠損マウスでは破骨細胞が完全に消失し, 大理石骨病を呈する事が報告され[9,10], RANKL-RANK が破骨細胞分化に必須の分子であることが証明されている．さらに, RANK には細胞内で TNF receptor associated factor (TRAF)と会合するドメインがあり, TRAF6 が RANK と会合する. TRAF6 欠損マウスも RANKL や RANK 欠損マウスと同じように破骨細胞形成障害と大理石骨病を呈する事が報告されている[11]．TRAF6 の下

流では mitogen-activated protein kinase (MAPK)や nuclear factor-κB (NF-κB)が活性化され, 最終的に破骨細胞分化のマスター転写因子と呼ばれる nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1)の発現が誘導され，破骨細胞への分化が進行する [4].

破骨前駆細胞は M-CSF と RANKL が存在すれば破骨細胞へと分化する事から，破骨細胞分化には M-CSF と RANKL によるシグナルのみで十分であると考えられてきた. しかし, 上述の破骨細胞のマスター転写因子である NFATc1 の発現及び増幅には, 実は immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)を介したシグナルが重要である事が近年明らかとなってきた [12-14]. NFATc1 はカルシウムシグナルにより活性化される因子であるが，ITAM を有する DNAX-activating protein 12 (DAP12)と Fc receptor common γ chain (FcRγ)が, このカルシウムシグナルの動員と NFATc1 の発現を制御する分子である事が明らかとなった [12, 13].

DAP12 と FcRγのダブルノックアウトマウスは NFATc1 の発現と活性化が障害される事から，破骨細胞を形成できず重度の大理石骨病を呈する [13]．また，FcRγノックアウトマウスは正常な骨表現型を示すが, DAP12 ノックアウトマウスは軽度の大理石骨病となる事から, これらの ITAM アダプター分子は互いの機能を相補的に補うが, DAP12 はより優位に破骨細胞の分化を制御していると考えられている [13, 15-17]．DAP12 は上述の通りカルシウムシグナルを動員し NFATc1 の発現を制御する分子であるとともに, 近年では M-CSF やインテグリンシグナルを制御して細胞骨格の形成も制御する分子である事が明らかとなっている [17-20].

これら ITAM アダプター分子は細胞外ドメインが小さく，外部からのシグナルを認識できない．そのため，免疫受容体群と会合する事で外部シグナルを認識し，破骨細胞の分化調節を行っていると考えられている．会合する免疫受容体の候補として, osteoclast-associated receptor (OSCAR)[13, 21] や paired Ig like receptor A (PIR-A)[22]，triggering receptor expressed in myeloid cells 2 (TREM-2)[14]，signal regulatory protein beta 1 (SIRPb1)[23], myeloid DAP12-associating lectin-1 (MDL-1)[24-26] などが報告されているが，これらの受容体がそれぞれどのように破骨細胞分化を制御しているかは未だ明らかとなっていない.

sialic acid binding Ig-like lectin (Siglec)-15 は近年 DAP12 と会合する事が報告された受容体であり, 酸性単糖であるシアル酸を認識する [27]. Siglec は 1 型膜貫通蛋白であり, 主に単球，マクロファージ，ナチュラルキラー細胞等に発現し，その殆どは細胞膜貫通領域に immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)を有し細胞内へ抑制性のシグナルを伝達して免疫細胞の活性を負に制御している [28]. しかし, Siglec-15 は DAP12

と会合しており，ITAM を介して細胞内へ興奮性のシグナルを伝達する分子と考えられている．また，Siglec-15 は免疫系に発現する Siglec の中では唯一，全ての脊椎動物で保存されており，生体内で何らかの普遍的な役割を担っている事が示唆されている[27].

我々が研究を開始した段階では，Siglec-15 の生体内での機能は明らかではなかったが，我々の研究と同時期に，他の研究グループによって Siglec-15 が骨腫瘍の一種である骨巨細胞種の組織中に発現する事が見出され，抗 Siglec-15 抗体の投与により破骨細胞分化が障害される事が報告された[29]. また, Siglec-15 ノックアウトマウス(*Siglec-15*$^{-/-}$)が破骨細胞の機能不全により軽度の大理石骨病を呈する事が報告され，生体内で Siglec-15 が破骨細胞分化に重要な働きを持つことが明らかとなった[30]. しかしながら，Siglec-15 がどのように破骨細胞分化を制御するか，その詳細は不明であった.

我々は，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスの解析により Siglec-15 が生体内において破骨細胞分化に必須の分子であること，更にそのメカニズムが DAP12 を介した RANKL シグナルの調節によるものであることを明らかにした．興味深い事に，Siglec-15 は成長軟骨より離れた二次海綿骨領域での破骨細胞分化を特異的に制御していた．また，我々はマウス卵巣摘出モデルを用いて *Siglec-15*$^{-/-}$マウスが卵巣摘出後の骨量減少に抵抗性を示し，Siglec-15 が閉経後骨粗鬆症の治療ターゲットとなり得る事を明らかとしたので報告する.

略 語 表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

α-MEM	alpha minimum essential medium
CTR	calcitonin receptor
DAP12	DNAX-activating protein 12
DAPI	4’,6-diamidino-2-phenylindole
DARs	DAP12-associated receptors
DC-STAMP	dendritic cell–specific transmembrane protein
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
FBS	fetal bovine serum
FcRγ	Fc receptor common γ chain
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IκBα	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha
IL-1	interleukin-1
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
MAPK	mitogen-activated protein kinase
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MDL-1	myeloid DAP12-associating lectin-1
NFATc1	nuclear factor of activated T cells c1
NF-κB	nuclear factor-kappa B
OSCAR	osteoclast-associated receptor
Ovx	ovariectomy
PBS	phosphate-buffered saline
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIR-A	paired Ig like receptor A
preOC	preosteoclast
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RANK	receptor activator of NF-κB
RANKL	receptor activator of NF-κB ligand
SHP-1	src homology region 2 domain-containing phosphatase-1
Siglec	sialic acid binding Ig-like lectin

shRNA	short hairpin RNA
SIRPb1	signal-regulatory protein-beta 1
TGF-β	transforming growth factor β
TNFα	tumor necrosis factor alpha
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAP	tartrate-resistant acid phosphatase
TREM-2	triggering receptor expressed in myeloid cells 2
UBMC	unfractionated bone marrow cells

第 一 章
破骨細胞分化に関与する Siglec の同定

緒 言

破骨細胞は単球・マクロファージ系細胞であり，M-CSF と RANKL の存在下で互いに融合，多核化して成熟破骨細胞へと分化する．多核化，巨大化する事により効率的に骨吸収を行う事が可能となる (Fig. 1)[31].

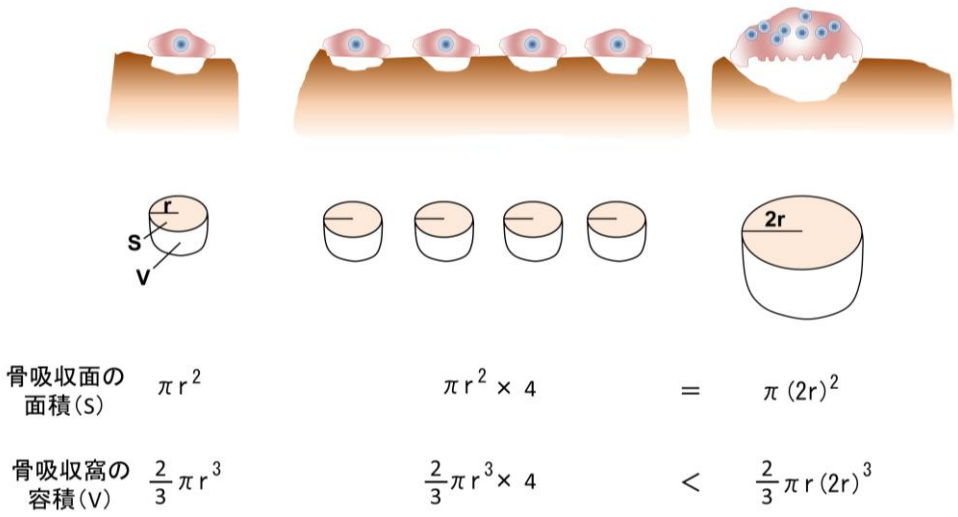

Fig.1．破骨細胞は多核化により効率的に骨吸収を行う (Ishii et al. Mod. Rheumatol 18, 220-227, (2008)より改変.)

多核化した破骨細胞は骨表面に接着して骨吸収を行うが，骨面から遊離して存在する破骨細胞や偽足を伸ばして遊走している破骨細胞もあり，多様な形態を示す[20]．骨への接着は sealing zone と呼ばれる構造を介して行われ，sealing zone の内側には波状縁が形成され, 酸や cathepsin K などの蛋白分解酵素が分泌されて骨吸収が行われる[4]. Sealing zone にはアクチンフィラメントが網目状に発達しており, 破骨細胞をファロイジン染色した際は sealing zone がリング状に染色される. アクチンリングの形成は破骨細胞の骨基質への接着，及び骨吸収に重要である[32].

Siglec はシアル酸を認識する受容体であり，破骨前駆細胞である単球/マクロファージにおいても Siglec-1，3，5(-F)，H，15 といった複数の Siglec が発現する事が知られ

ている[28]．高畑らは，破骨細胞の分化過程において細胞表面に存在するシアル酸が重要な役割を果たす事を報告したが[33]，一方でシアル酸を認識する Siglec と破骨細胞分化の関連については明らかとなっていない．

Siglec family の多くは細胞内ドメインに ITIM を有し，チロシンホスファターゼ SHP-1 との相互作用を通じて免疫細胞に抑制性シグナルを伝達するが，一方，Siglec-14 と-15 は，膜貫通領域で ITAM を有する DAP12 と会合し，活性化シグナルに関与することが示されている[27,28,34,35]．DAP12 は破骨細胞分化，細胞骨格形成に必須の分子であり[13,16-19]，我々はマクロファージに発現する Siglec family のうち，Siglec-15 に特に着目した．

我々は，マクロファージを破骨細胞へと分化させる過程における Siglec family の発現を検証し，Siglec-15 のみが破骨細胞分化に伴い発現が上昇する事を見出した．Siglec-15 は多核破骨細胞に特に強く発現し，興味深い事に偽足を伸ばし移動を行っている破骨細胞においては細胞膜上に強く発現するのに対し，アクチンリングを形成し骨吸収を行う破骨細胞においては細胞質内にも多く分布しており，Siglec-15 が破骨細胞の分化，機能に重要な役割を担っている事が示唆された．

実 験 方 法

倫理規定

本研究のために実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した.

試薬

抗マウス Siglec-15 ポリクローナル抗体は，Angata により作製され[27]，独立行政法人産業総合研究所より供与された．破骨細胞の分化には，PeproTech 社製 (London, U.K.) のヒト M-CSF およびヒト RANKL を用いた.

細胞培養

野生型マウス(C57BL/6J)は日本クレア株式会社(東京，日本)より購入した．マウスの大腿骨および脛骨を無菌的に摘出し，骨髄腔を α-minimum essential medium (α-MEM) でフラッシュして骨髄細胞を採取した．骨髄細胞を α-MEM で洗浄後，0.727% NH_4Cl-0.017 % Tris-HCl (pH 7.2)-PBS 溶液で赤血球を除去し，10 % Fetal Bovine Serum (FBS) および M-CSF (50 ng/ml) 含有の α-MEM で，浮遊細胞培養用ディッシュ上で 3 日間培養し，増殖した接着細胞を骨髄マクロファージとして用いた.

骨髄マクロファージを用いた破骨細胞分化誘導には，10 % FBS, 30 ng/ml M-CSF, および 100 ng/ml RANKL 含有の α-MEM を培地として用い， 3 日間培養した．培養は全て 37 ℃，5 % CO_2 下で行い，培地には 100 IU/ml ペニシリン G (Meiji Seika, Tokyo, Japan)，100 µg/ml ストレプトマイシン(Meiji Seika)を添加した．培地は，2 日毎に交換した.

quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Total RNA を Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)を用いて採取し，1 μg の Total RNA から ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Fitchburg, WI)を用いて逆転写にて cDNA を合成した．PCR DNA Engine Opticon 2 System (MJ Research, Hercules, CA)を使用し，DyNAmo™ HS SYBR Green qPCR Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて DNA 合成の検出に用いた. 使用したマウス Siglec-1, -3, -5(-F), -15, -H, および glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)のプライマーのシークエンスを Table 1.に示す． mRNA の発現量は全て GAPDH の発現量により標準化した.

Gene	Forward primers (5'-3')	Reverse primers (5'-3')	Amplicon (bp)	Accession number
Siglec-1	CACCTGCCCAGCTAACTCTC	CTCCCTCGGGTACACTACCA	228	NM_011426
Siglec-3 (CD33)	GATTCTTGGGCTCTGTCTCG	TGGACACTGCTCTGTTCCTG	186	NM_021293
Siglec-5 (Siglec-F)	CGGACGGTTATTCGCTCTC	ACTGGACTTGGCAGGCTACA	81	NM_145581
Siglec-15	ACACCCCTCCACGGTCTC	CTCACAGCAAACACGTGGCA	95	NM_001101038
Sigelc-H	CCTGCTTCTTGGGATCTGC	TGGATCCCTGGTGTAATGCC	149	NM_178706
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA	95	NM_008084

Table. 1. qPCR に用いた Primer 配列一覧.

免疫染色

プラスティックディッシュ，カバーガラス，もしくは牛皮質骨切片上で培養した細胞を 4 %パラホルムアルデヒドを用いて室温で 5 分間固定し，0.1 %Triton X-100 で透過処理を行った．5 %BSA でブロッキングした後，抗マウス Siglec-15 ポリクローナル抗体 (1:500 dilution)を反応させ，次いで Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体(1:500 dilution; Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA)を反応させた. 細胞骨格の染色には Alexa Fluor 633 ファロイジン (1:40 dilution; Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA)を用い，核染色には DAPI reagent (1:1000 dolution; 同仁化学研究所，熊本，日本)を用いた．カバーガラス及び牛皮質骨切片はスライドガラスにマウントし，共焦点走査型レーザー顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)を用いて観察した.

フローサイトメトリー

破骨細胞分化に伴う細胞膜上の Siglec-15 発現変化を定量評価するため，骨髄マクロファージを M-CSF および RANKL 存在下に 3 日間培養した．培養した細胞を 0.25 %トリプシン-EDTA 溶液 (和光純薬株式会社，大阪，日本)を用いて 37 ℃で 3 分間処理した．前破骨細胞は容易にディッシュより遊離するが，骨髄マクロファージは接着性が強く遊離しにくいため，更にスクレーパーを用いてディッシュより遊離させ回収した．10 %FBS 含有αMEM に懸濁，遠心し，上清を除去した．4 %パラホルムアルデヒドを用いて，37 ℃で 10 分間固定し，1 分間氷上で冷却した．細胞を FACS Buffer (0.1%アジ化ナトリウム，3 %FBS 含有 PBS 溶液)で懸濁し，抗マウス FcγII/III Receptor Block (10 μg/ml; Mouse BD Fc Block™, CD16/CD32, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey)を加えて氷上で 10 分間処理した．抗 Siglec-15 抗体 (1:1000 dilution)と反応させ，Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体 (1:1000 dilution; Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA) で標識した後，フローサイトメトリーを行った(BD FACS Canto™ II, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey).

イムノブロット解析

骨髄マクロファージを一定期間 M-CSF 及び RANKL の存在下で培養し，前破骨細胞 (day2)，もしくは破骨細胞 (day3-4)へと分化させた．蛋白の抽出には Phosphosafe Extraction Reagent (Novagen, Madison, WI)を用い，全細胞抽出液をイムノブロット解析に供した．抗マウス Siglec-15 ポリクローナル抗体 (1:10000 dilution)は，Angata により作製され [27]，独立行政法人産業総合研究所より供与された．抗β-Actin 抗体 (1:1000 dilution)は Cell Signaling Technology 社製 (Danvers, MA)を使用した.

実 験 結 果

Siglec-15 は破骨細胞分化に伴い発現が増加し，多核破骨細胞の細胞膜上に特に強く分布する

まず初めに，破骨細胞分化に関与する Siglec を同定するために，マウスマクロファージに発現する Siglec-1，-3，-5(-F)，-15 および-H の遺伝子発現を qPCR により評価した．骨髄由来マクロファージを RANKL 存在下に破骨細胞へと分化誘導し, Day0 (骨髄マクロファージ), Day2 (前破骨細胞), Day3 (破骨細胞)のそれぞれ 3 つの異なる分化段階の細胞を評価した．その結果，Siglec-1，-3，-5 (-F)，-H の発現量は RANKL 刺激後には減少もしくは不変であったが, 唯一 Siglec-15 のみ, その発現量が増加した (Fig. 2A)．抗 Siglec-15 抗体を用いたイムノブロット法でも同様に，Siglec-15 は RANKL 刺激後 3 日時点, すなわち破骨細胞への最終分化段階で急激にその発現が増加した (Fig. 2B).

次いで我々は抗 Siglec-15 抗体を用いて免疫染色を行い， Sigelc-15 の局在を解析した．Siglec-15 は，骨髄マクロファージの段階でもごくわずかに細胞膜上に発現がみられたが，M-CSF 及び RANKL 存在下に破骨細胞へと分化誘導すると，Siglec-15 が強く発現する細胞が観察されるようになった. Siglec-15 は単核細胞の一部にも発現したが, 特に多核化した破骨細胞において強く発現している事が確認された (Fig. 2C)．興味深い事に，偽足を伸ばして移動を行っている破骨細胞においては細胞膜上に強く発現するのに対し (Fig. 2E)，アクチンリングを形成し骨吸収を行っている破骨細胞においては細胞質内にも分布しており (Fig. 2F)，Siglec-15 は破骨細胞が移動～骨吸収とその状態を変化させる過程において異なる役割を担っている可能性が示唆された.

フローサイトメトリーで細胞膜上の Siglec-15 発現細胞の割合を確認すると，RANKL 刺激前には Siglec-15 は細胞膜上にごくわずかに発現するのみであり，低い蛍光強度を示したが，RANKL 刺激により高い蛍光強度を示す細胞と低い蛍光強度を示す細胞とが混在するようになり，RANKL 刺激後 3 日で Siglec-15 陽性細胞の割合は 0.59 %から 14.07 %へ増加した (Fig. 2D).

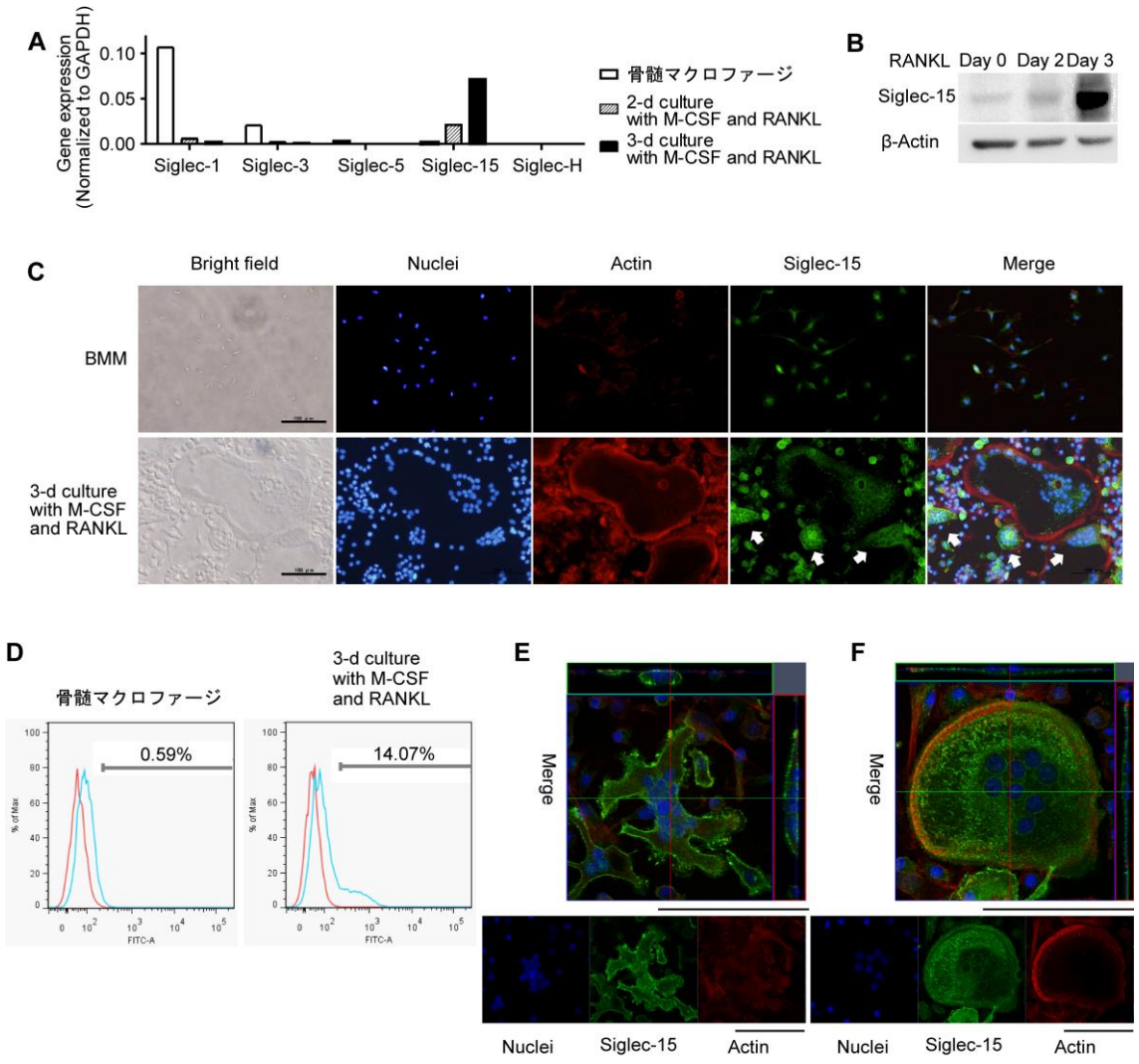

Fig. 2. 破骨細胞分化にともなう Siglec-15 の発現増加と，ユニークな細胞内分布．骨髄マクロファージを M-CSF(30 ng/ml) と RANKL(100 ng/ml)存在下に破骨細胞へと分化誘導した．(A) Siglec-1, 3, 5(-F), 15, H の mRNA 発現を qPCR で定量評価した．それぞれ，ハウスキーピング遺伝子である GAPDH の発現量で標準化した．B) イムノブロット法により，Siglec-15 の蛋白発現量を評価した．C) 抗 Siglec-15 抗体による免疫染色．2 次抗体には Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit 抗体を用い，核染色には DAPI，F-アクチン染色には Alexa Fluor 633 ファロイジンを用いた．Siglec-15 は単核の細胞にも一部発現するが，特に多核破骨細胞の細胞膜上に強く発現した．D) フローサイトメトリー法による細胞膜上の Siglec-15 陽性細胞のヒストグラム．赤のヒストグラムはコントロールを，青のヒストグラムが抗 Siglec-15 抗体及び Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit antibody により染色された細胞を示す．左は骨髄マクロファージ，右は RANKL 存在下に 3 日間培養した細胞であり，数値は示された蛍光強度の範囲に含まれる細胞数の割合を示す．E,F) スライドガラス上で RANKL 存在下に 3 日間培養し分化した破骨細胞を示す．抗 Siglec-15 抗体及び二次抗体に Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit 抗体を用い，核染色には DAPI，F-アクチンの染色には Alexa Fluor 633 ファロイジンを用いた．Siglec-15 は図 E のように偽足を伸ばす破骨細胞においては細胞膜上に，図 F のようにアクチンリングを形成する破骨細胞においては細胞質内に分布する．

考 察

マクロファージに発現する Siglec のうち，Siglec-15 だけが破骨細胞分化にともなってその発現量が増加した．Siglec-15 は免疫系細胞に発現する Siglec としては唯一，脊椎動物のすべての系統で保存されており，何らかの普遍的な機能をもっていると考えられている[27]．また，Siglec-15 は，膜貫通領域で ITAM を有する DAP12 と会合し，活性化シグナルに関与することが示されており[27]，本実験結果は Siglec-15 が DAP12 を介した骨代謝制御機構において重要な役割を果たしていることを示唆している．

本章で述べた実験結果は，本学位授与者が実際に行った実験の結果であるが，破骨細胞分化に伴う Siglec-15 の発現上昇に関しては同様の実験が我々のグループにおいて過去に行われており，小松幹の学位論文に内容が記載されている．本章では繰り返しとなる部分があるが，論文全体の背景と結果の理解を容易とするために記載する事をご了承頂きたい．

今回新たに明らかとなった，Siglec-15 の発現に関する興味深い事実は，偽足を伸ばして移動しているような破骨細胞においては細胞膜上に強く発現するが，アクチンリングを形成し，骨吸収を行っているような破骨細胞においては細胞質内に広く分布していた事である．この事は，破骨細胞が移動～骨吸収へとその状態を変化させる過程に Siglec-15 が関わっている可能性を示唆する．

一方，マクロファージに発現する Siglec のうち Siglec-15 を除いた他の Siglec-1，-3，-5，-H（Siglec-H はマウスのみに存在する Siglec）に関しては，破骨細胞分化に伴いその発現が減少した．これらの Siglec はいずれも細胞内ドメインに ITIM を有し，抑制性のシグナルを伝えるため[28]，破骨細胞分化にともなってその発現が減少することは結果的に破骨細胞分化に促進的に作用しているとも考えられるが，本研究ではこれらの Siglec family に関する検証は行っていない．

我々は，Siglec-15 と破骨細胞分化の関連を検証するために，Siglec-15 ノックアウトマウス（*Siglec-15*$^{-/-}$）を作製し，その骨表現型及び破骨細胞分化能について解析を行った．

第 二 章
Siglec-15$^{-/-}$マウスの骨表現型解析

緒 言

Siglec-15 は DAP12 と会合する免疫受容体の一つであるが，DAP12 には Siglec-15 以外にも TREM-2 [14]，SIRPb1 [23]，MDL-1 [24-26] といった受容体が会合している事が報告されている．DAP12 は細胞外ドメインが小さく，外部シグナルを認識できないため，DAP12 の機能にはこれらの会合する免疫受容体が重要な役割を担うと考えられているが，これら免疫受容体の機能には未だ不明な点が多い．

DAP12 は，破骨細胞の分化及び細胞骨格形成に必須の分子であり，DAP12 ノックアウトマウスでは破骨細胞の分化障害による軽度の大理石骨病が見られる [13, 15]．しかし， DAP12 と会合する免疫受容体に関しては，TREM-2 ノックアウトマウスでは破骨細胞分化の亢進により骨粗鬆症化し [36]，MDL-1 ノックアウトマウスでは生理的条件下では骨に特別な表現型は見られないが，関節リウマチ様の炎症を誘発すると，骨破壊が抑制される事が報告されており，必ずしも DAP12 ノックアウトマウスの表現型とは合致しない [26]．これらの事実は，DAP12 と会合する免疫受容体はそれぞれが異なる機能を有し，生体内での様々な状況，病態に応じて適切に破骨細胞の分化を制御している可能性を示唆している．

我々は Siglec-15 も DAP12 を介して破骨細胞分化を制御する受容体の一つであると仮説をたて，検証のために *Siglec-15*$^{-/-}$マウスを作製し，その表現型を解析するとともに，破骨細胞分化に与える影響を調査した．

実 験 方 法

倫理規定

本研究のために実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した.

試薬

牛皮質骨薄切切片は北海道立工業試験場 (札幌, 日本)赤澤俊之先生よりご提供頂いた. レトロウイルスベクターpMX-Puro(Cell Biolabs Inc. San Diego, CA)は東京大学医科学研究所 (東京, 日本)北村敏雄先生よりご提供頂いた.

Siglec-15 targeted allele の作製

Siglec-15 をターゲットとしたベクターは Siglec-15 の機能的領域の大部分を占めるエキソン 2-5 をネオマイシン耐性遺伝子と置き換えるように設計した (Fig. 3A). 設計したプラスミドを C57BL/6 由来の ES 細胞にエレクトロポレーション法で導入した. ES 細胞に相同組み換えが起こった事をサザンハイブリダイゼーション法により確認した (Fig. 3B).

キメラマウスを作製するため, この ES 細胞クローンを Balb/c マウス未分化胚盤胞に注射した. 得られた雄キメラマウスを雌 C57BL/6 マウスと交配し, *Siglec-15*$^{+/-}$ヘテロマウスを作製した. ヘテロマウス同士を交配し, *Siglec-15*$^{-/-}$ホモマウスを作製した.

Genotyping は, 共通のプライマー (WT-R)と, wild-type Siglec-15 alleles (WT-F)もしくは targeted alleles (Neo-F)を認識するプライマーを使用して PCR にて確認した. ネオマイシン耐性遺伝子の導入の確認には Neo-f 及び Neo-r の 2 種類のプライマーを使用した (Fig. 3C). Genotyping に使用したプライマーの配列は以下の通りである.

WT-F: CTGGTTCCTCAAACTTATCAAACAT
WT-R: TATGCCTGCTTTTTCTCTGTGAACT
Neo-F: CGTGCAATCCATCTTGTTCAAT
Neo-f: GAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCG
Neo-r: GTAGCCAACGCTATGTCCTGATAG

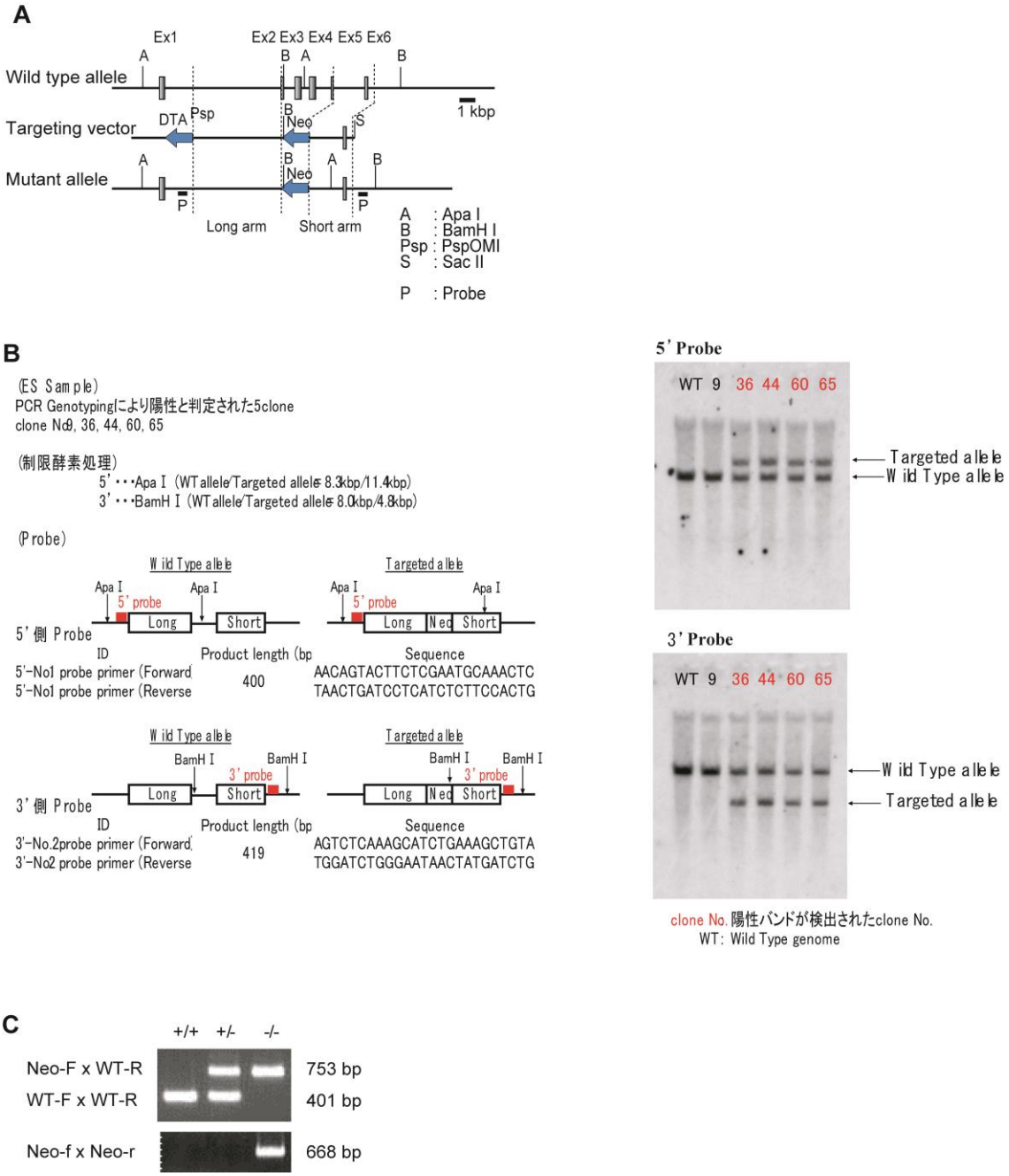

Fig. 3. Siglec-15$^{-/-}$マウスの作製．A) Siglec-15 遺伝子配列 (上段)，targeting vector (中段)，mutant allele (下段) のシェーマを示す．Siglec-15 の Exon (Ex)1-6 は黒い四角形で表した．ネオマイシン耐性遺伝子 (Neo)，サザンハイブリダイゼーション用のプローブ (P)をそれぞれ示す．Neo cassette は Exon2-5 を置き換えるように挿入された．B) サザンハイブリダイゼーション法により相同組み換えの起きた ES 細胞クローンを確認した．C) PCR による genotyping．WT (+/+)，ヘテロ (+/-)，ホモ (-/-)マウスそれぞれに対して，共通の primer (WT-R)と，WT-F もしくは Neo-F primer を使用して PCR を行った．Neo cassette の確認には Neo-f と Neo-r primer を使用した．

マイクロ CT

WT 及び *Siglec-15*$^{-/-}$それぞれの左脛骨，および第 5 腰椎をマイクロ CT (CT, R_mCT2; Rigaku, Tokyo, Japan)を用いて 1 ピクセルあたり 10 μm の解像度で撮影した．骨微細構造の解析は TRI/3D-BON (Ratoc System Engineering 社, Tokyo, Japan)を用いて行った．

組織解析

9 週齢の雄マウスより採取した脛骨を 4 %パラホルムアルデヒドで固定, EDTA 脱灰しパラフィン包埋した．作製したパラフィン切片を TRAP（酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ）およびメチルグリーンで染色，破骨細胞を観察した．

破骨細胞は酵素組織化学的には強い TRAP 活性を示す事から，この酵素は組織染色法による破骨細胞のマーカーとして用いられている．以下に概略を述べる．

・Basic stock incubation medium (下記を混合し，pH5.0 に調整した．)

蒸留水	1000 ml
無水酢酸ナトリウム	9.2 g
L-(+)-酒石酸	11.4 g
氷酢酸	2.8 ml

・Naphtol ether solution

Naphtol AS-BI phosphate	0.1 g
エチレングリコールモノエチルエーテル	5 ml

・亜硝酸ナトリウム溶液

亜硝酸ナトリウム	1 g
蒸留水	25 ml

・ベーシックフクシン溶液

ベーシックフクシン	1 g
2N 塩酸	20 ml

切片をキシレンに浸してパラフィンを除去し，100 %，95 %，70 %，50 %エタノールに順次浸して加水処理を行った．Basic stock incubation medium150 ml に 1.5 ml の naphtol-ether solution を加え，37 ℃で 1 時間インキュベートした．新たな Basic stock incubation medium150 ml に亜硝酸ナトリウム溶液 1 ml とベーシックフクシン溶液 1 ml を混合したものを加え，切片を溶液内で破骨細胞が赤く染色されるまで 37 ℃で 20-40 分間インキュベートした．

骨形態学的な解析のためには，14 週齢の雄マウスより脛骨を採取し，70 %エタノールで 3 日間脱水処理後，Villaneuva Bone 染色を行い，非脱灰骨組織標本を作製した．骨標識のため，屠殺する 4 日前にテトラサイクリン (20 mg/kg)を，2 日前にカルセイ

ン (20 mg/kg) をそれぞれ皮下投与した．標本の作製と解析は伊藤骨形態計測研究所(新潟，日本)にて行って頂いた．

Villaneuva Bone 染色は非脱灰骨組織標本の染色法として用いられ，類骨や石灰化骨の観察に適している．また，カルセインやテトラサイクリンで標識する事により，骨形成の動的な指標の測定が可能である．本研究においては，主に骨形成の評価のために本標本を作製したが，破骨細胞や骨芽細胞の数や面積についても測定を行った．以下に標本の作製方法の概略を述べる．

摘出した脛骨を Villaneuva Bone Stain に 4 日間浸透させる．Villaneuva Bone stain の調整は以下の通りである．

Azull II	1.5 g
酢酸 Na 三水和物	13.6 g
ベーシックフクシン	5 g
Fast Green FCF	1.5 g
Orange G	3.75 g
95 %エタノール	100 ml
酢酸	6 ml
蒸留水	900 ml

染色後，エタノールで脱水し，メチルメタクリレートモノマー樹脂に包埋し，30-40 ℃で約 10 日間重合させる．出来上がったブロックを成型し，ミクロトームを用いて厚さ 5μm の薄切切片を切り出し，封入する．

マウス一次海面骨および二次海面骨それぞれにおいて単核及び多核破骨細胞数，破骨細胞面，骨吸収面，骨芽細胞面，骨標識幅，一重および二重標識面，骨石灰化面，組織量，骨面を測定した．得られたパラメーターから，破骨細胞数/骨面，骨吸収面/骨面，骨芽細胞面，骨石灰化速度，骨形成速度/骨面，骨石灰化面/骨面を算出した．破骨細胞数/骨面成長板から 250 μm の範囲を一次海面骨，250-1000 μm の範囲を二次海面骨と定義した．

骨吸収面は実際に骨吸収が活発に行われている領域を差し，骨吸収の指標として重要である．破骨細胞面は破骨細胞により覆われている領域を差し，破骨細胞が骨の上で大きく広がっている事の指標として用いた．テトラサイクリンやカルセインを投与すると，骨の石灰化が起きている部位に沈着し，テトラサイクリンは黄色に，カルセインは緑に標識される事から，骨形成を測定する事ができる．どちらか一色のみで標識された部位が一重標識面，二色で標識された部位が二重標識面である．骨石灰化速度は，テトラサイクリンとカルセインを皮下投与したインターバル（本実験では 2 日間）にどの程度骨石灰化が起きたかを算出したもので，二重標識の幅をインターバル

（2 日間）で除した値である．骨形成速度は 365 日間に起きる骨形成を算出したもので，骨形成速度＝（二重標識面+1/2×一重標識面）×骨石灰化速度×365 である．これらのパラメーターは，骨面が多いと増加するため，骨面で除して補正した値で比較する．

骨吸収能の測定

骨吸収能の測定のため破骨細胞を牛皮質骨切片上で 10 %FBS，M-CSF (30 ng/ml)および RANKL (100 ng/ml)含有αMEM で 10 日間培養した．培地は 2 日毎に交換した．骨皮質切片を PBS で洗浄して細胞を除去し，20 μg/ml peroxidase conjugated wheat germ agglutinin (Sigma)および 3,3’-diaminobendzidine で処理し，骨吸収窩を染色した．骨吸収窩の定量には Image J (National institute of Feakth (NIH), Bethesda, MD)を使用した．画像を Image J を用いて骨吸収窩が黒くなるに閾値を設定して 2 値化し，10 以上のピクセルサイズを有する部分を骨吸収窩として定量した．

レトロウイルスによる Siglec-15 導入

マウス Siglec-15 全長 cDNA を pMX-Puro (Cell Biolabs Inc. San Diego, CA)にサブクローニングした．マウス Siglec-15 全長 cDNA が pcDNA3.1(-) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)にサブクローニングされたプラスミド（安形高志先生より提供：現 associate research fellow, Academia Sinica, Taipei, Taiwan)を鋳型とし, 以下のプライマーを用いて PCR を行った．

Forward: ATAGAATTCGAAATGGAGGGGTCCCTCC

Reverse: TATC CTCGAGTTTCTCATGGTGAATGACTAGATGG

PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し，Siglec-15 全長 cDNA を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Fitchburg, WI)を使用して抽出した．抽出した Siglec-15 全長 cDNA を制限酵素 EcoRI および XhoI で処理し，pcDNA3.1/myc-His A ベクター (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)に挿入した. 次いで Siglec-15 myc-His sequence を制限酵素 EcoRI と PmeI で切り出し，pMX-Puro に挿入した．pMX-Puro には PmeI サイトが存在しないが，PmeI が平滑断端である事を利用して，pMX-Puro の 3’マルチクローニングサイトを XhoI で切断した後に Klenow fragment を用いて平滑断端を作製した．その後，5’マルチクローニングサイトを EcoRI で切断した．得られた EcoRI 断端と平滑断端を持つ pMX-Puro ベクターに, EcoRI と PmeI 断端を持つ Siglec-15 myc-His sequence を挿入した．Siglec15 の遺伝子変異株である，R143A および K273A mutant は QuikChange kit (Stratagene, La Jolla, CA)を使用して作製した (Fig. 4). Mutant 作製のため使用した primer は以下の通りである．

R143A Forward: GCCGCTACTTCTGCGCCGTGGAGTTCACCG

R143A Reverse: CGGTGAACTCCACGGCGCAGAAGTAGCGGC

K273A Forward: GCAGCAGCAAGGCCGCGAGGCCCAGCGCGC

K273A Reverse: GCGCGCTGGGCCTCGCGGCCTTGCTGCTGC

完成した Vector をそれぞれ Plat-E 細胞 (Cell Biolabs. Inc, San Diego, CA)に Lipofectamine LTX plus Reagent (Invitrogen)を用いて導入した．Plat-E 細胞は 293T 細胞をベースに作られたレトロウイルス産生用の細胞株であり，gag-pol, ecotropic env を発現しているためパッケージングベクターの導入により高濃度のレトロウイルスが作製できる．ベクターの導入後，48 時間後に培養上清を回収し，レトロウイルスとして使用した．レトロウイルスによる骨髄マクロファージへの遺伝子導入は M-CSF (30 ng/ml)と polybrene (4 μg/ml)の存在下に 6-12 時間かけて行った．

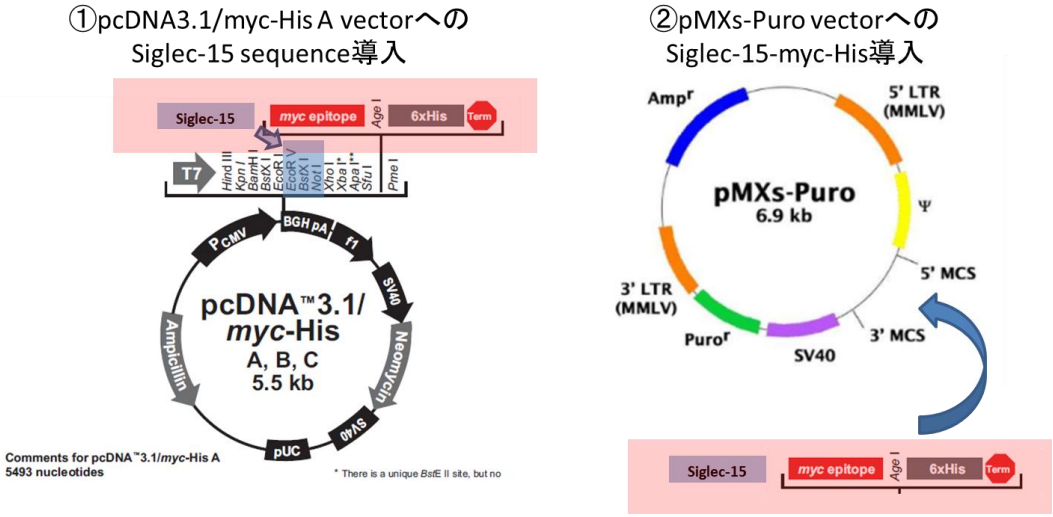

Fig. 4. pMX-Siglec-15 ベクターの作製．マウス Siglec-15 遺伝子配列を pcDNA3.1/myc-His A ベクターに挿入し，Siglec-15-myc-His 配列を pMX-puro ベクターへ挿入した．

TRAP（酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ）染色

破骨細胞は TRAP 染色によって確認した．培地を除去後，PBS で洗浄，4 %ホルムアルデヒド, アセトン, クエン酸緩衝液で固定した．TRAP 染色キット (Sigma-Aldrich) を使用し，2-5 分間，37 ℃でインキュベートした．TRAP 陽性でかつ 3 つ以上の核を含有する細胞を多核破骨細胞としてカウントした．

骨芽細胞の採取及び石灰化結節の形成

生後 3 日以内の新生児マウス約 10 匹より頭蓋骨を採取した．細かく分割し，PBS で 2 回洗浄した後，digestion solution (0.64 mg/ml collagenase type II (GIBCO)，0.05 %トリプシン-PBS 溶液)に入れ，37 ℃温浴層で 20 分間振盪した．上清を回収し，これを population 1 とした．再び digestion solution を加えて同様の操作を繰り返し，population 5

及び population 6 を混合し，100 mm dish で 10 % FBS 含有αMEM でコンフルエントまで培養し，トリプシン処理により細胞を回収，実験に用いた.

石灰化結節の形成のためには, 骨芽細胞を 24-well plate に 5×10^5 個/well で蒔き, 10 % FBS, 50 μg/ml アスコルビン酸及び 10 mM β-glycerophosphate 含有α-MEM で 21 日間培養した．培地は 2-3 日毎に交換した．形成された石灰化結節をコスモバイオ社製の石灰化結節染色キット (東京，日本)を使用して染色し，評価した.

免疫沈降法とイムノブロット解析

骨髄マクロファージを一定期間 M-CSF 及び RANKL の存在下で培養し，前破骨細胞 (day2)，もしくは破骨細胞 (day3-4)へと分化させた．蛋白の抽出には Phosphosafe Extraction Reagent (Novagen, Madison, WI)を用い，全細胞抽出液を免疫沈降とイムノブロット解析に供した．免疫沈降には Immunoprecipitation Kit Dynabeads Protein G (Invitrgen, Carlsbad, CA)を使用した.

使用した抗体は抗 Myc 抗体 (1:1000 dilution; Cell Signaling Technology, Danvers, MA), 抗 DAP12 抗体(1:1000 dilution; Exalpha Biological, Inc. Shirley, MA)である.

qPCR

PCR DNA Engine Opticon 2 System (MJ Research, Hercules, CA)を使用し，DyNAmo™ HS SYBR Green qPCR Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて DNA 合成の検出に用いた. 使用したマウス cathepsin K, integrinβ3, TRAP, CTR, および GAPDH のプライマーのシークエンスを Table 2.に示す． mRNA の発現量は全て GAPDH の発現量により標準化した.

Gene	Forward primers (5'-3')	Reverse primers (5'-3')	Amplicon (bp)	Accession number
Cathepsin K	CAGAAGCAGTATAACAGCAAGGT	CCCAAATTAAACGCCGAGAGA	52	NM_007802
Integrin β3	TGACTCGGACTGGACTGGCTA	CACTCAGGCTCTTCCACCACA	414	NM_016780
TRAP	TCTTCAGGACGAGAACGGTG	CCTTTCGTTGATGTCGCACA	83	NM_007388
CTR	TGGCTGTGTTTACCGACGAG	CGAGTGATGGCGTGGATAAT	146	NM_007588
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA	95	NM_008084

Table. 2. qPCR に用いた Primer 配列一覧.

統計分析

得られたデータは, 2 群間の検定には Student's T-test を, 3 群以上の検定には ANOVA を用いて有意差検定を行い，判定は P 値＜0.05 で有意差ありとした．データは mean ±SEM で表した.

実 験 結 果

Siglec-15$^{-/-}$マウスは軽度の大理石骨病を呈する

生体内での Siglec-15 の機能を明らかとするために，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスを作製し，その表現型を調査した．*Siglec-15*$^{-/-}$マウスは明らかな外観上の異常を示さず，体長・体重ともに WT と同等であった (Fig. 5)．骨表現型の解析のため，生後 9 週，6 か月，12 か月の時点で脛骨及び第 5 腰椎をマイクロ CT で撮影した．*Siglec-15*$^{-/-}$マウスは WT と比較し明らかに脛骨，第 5 腰椎の海綿骨量が増加していた (Fig. 6A)．TRI/3D-BON を用いて骨微細構造を解析すると，海綿骨の骨量，骨梁数，骨梁幅はいずれも *Siglec-15*$^{-/-}$マウスで有意に増加していた(Fig. 6B-D).

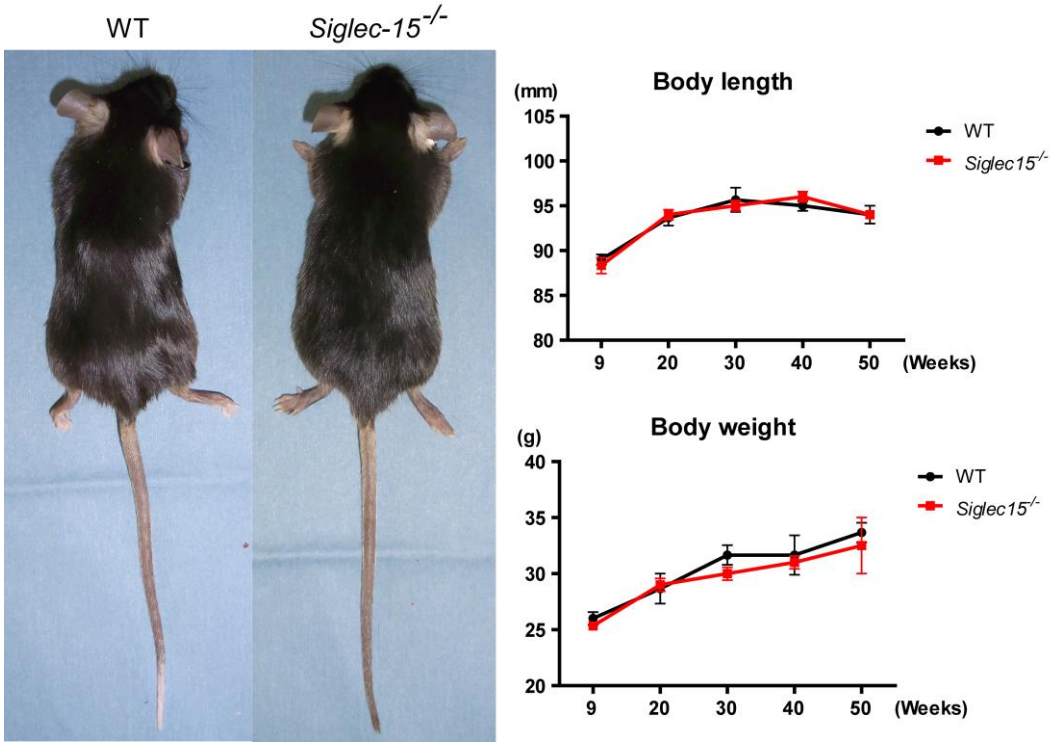

Fig. 5. *Siglec-15*$^{-/-}$マウスは正常に発育する．*Siglec-15*$^{-/-}$マウスは外観上の異常を示さず，体長・体重ともに WT と差が無い．(n = 3. Data shown are mean ± SEM).

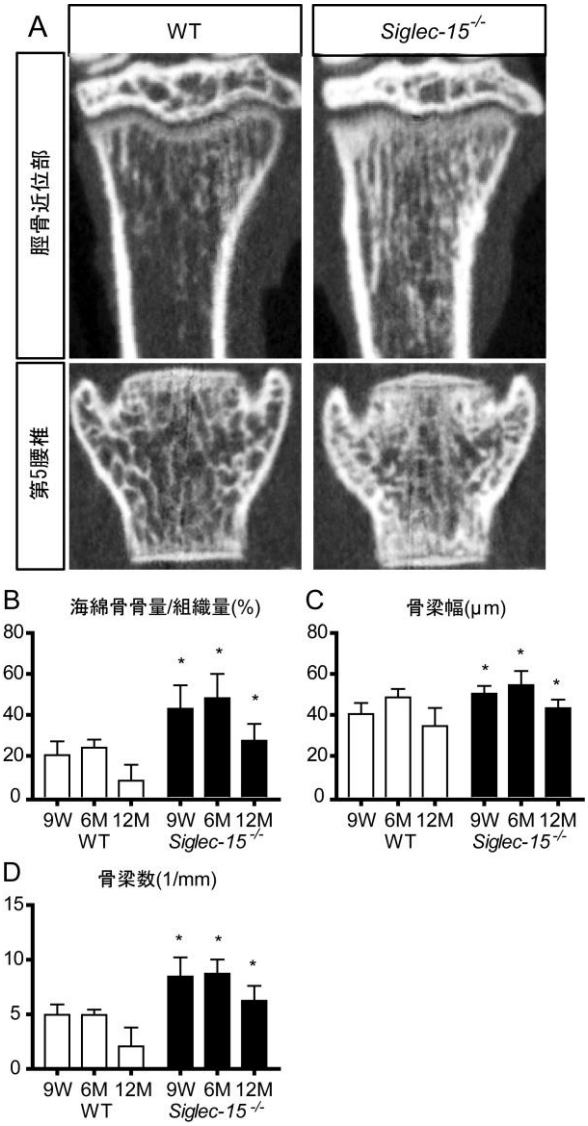

Fig. 6. *Siglec-15*$^{-/-}$マウスは軽度の大理石骨病を呈する．A) 生後 9 週齢，雄の WT 及び *Siglec-15*$^{-/-}$マウスそれぞれの脛骨，第 5 腰椎をマイクロ CT で撮影した．B-D) ラトック社 TRI/3D-BON を用いた骨微細構造の解析結果を示す．二次海綿骨領域における海綿骨の骨量，骨梁幅，骨梁数はいずれも *Siglec-15*$^{-/-}$マウスで有意に増加している．Two-way ANOVA により検定を行った．(n =4. Data shown are mean ± SEM. * = P < 0.05).

Siglec-15$^{-/-}$マウスでは破骨細胞の分化が障害される

次に，我々は *Siglec-15*$^{-/-}$マウスにおいて骨量が増加した原因を探るべく，組織切片で破骨細胞の状態を観察した．WT 及び *Siglec-15*$^{-/-}$マウスより脛骨を採取，パラフィン切片を作製し，TRAP 染色により破骨細胞を染色した（Fig. 7A）．予想された通り，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは WT と比較して有意に TRAP 陽性細胞（破骨細胞）や骨吸収面が少なかったが (Fig. 7B,C)，解剖学的な部位により異なる様相を呈した．成長軟骨より

離れた二次海綿骨領域に注目すると，WT マウスでは骨表面に広く接着する巨大な破骨細胞が形成されるのに対して，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスの破骨細胞は単核の小さなものが多く，骨表面での広がりが障害されていた (Fig. 7C)．しかし，興味深い事に，成長軟骨直下の一次海綿骨領域においては *Siglec-15*$^{-/-}$マウスでも WT と同様に巨大な多核破骨細胞が多数形成されており (Fig.7B)，生体内では部位により，Siglec-15 が破骨細胞分化に必須では無いという事が示唆された．

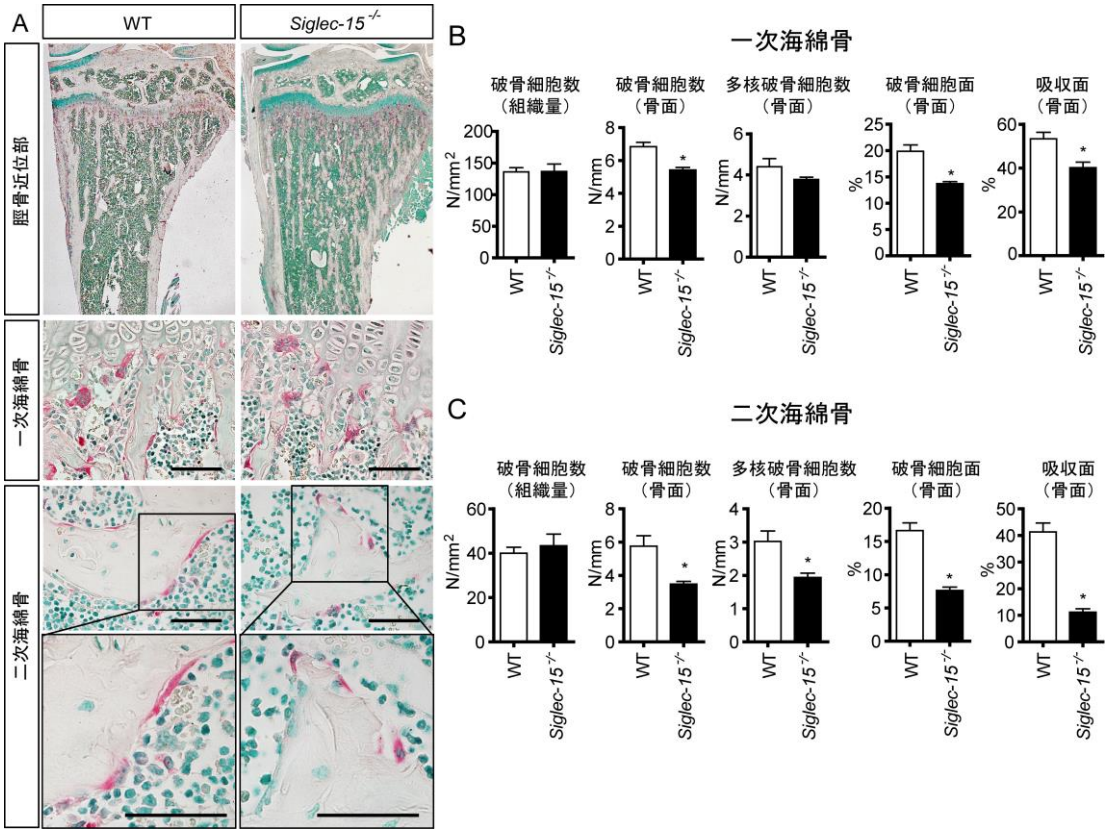

Fig. 7. *Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは破骨細胞の分化が障害される．A) WT 及び *Siglec-15*$^{-/-}$マウスそれぞれの脛骨を TRAP 及びメチルグリーンで染色した．破骨細胞は赤く染色されている．最上段が低倍率の脛骨全体像を，中段が一次海綿骨領域，下段が二次海綿骨領域の高倍率写真をそれぞれ示す．B，C) 一次海綿骨領域，二次海綿骨領域それぞれにおける骨形態計測の結果を示す．破骨細胞数/骨面，破骨細胞面/骨面，骨吸収面は *Siglec-15*$^{-/-}$マウスで少ない．多核破骨細胞数/骨面は成長軟骨より離れた二次海綿骨領域においては *Siglec-15*$^{-/-}$マウスで有意に少ないが，成長軟骨直下の一次海綿骨領域では差がみられない．(n =3. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$).

生体内では，骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスにより骨量が調節される．すなわち，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスでみられた骨量の増加が，骨芽細胞の機能亢進によるものである可能性についても検証する必要がある．我々は，Siglec-15 が骨芽細胞機能に及ぼす影響を調査するため，WT，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスそれぞれの骨形成能を検証した．*Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは，骨石灰化速度，骨形成速度/骨面，骨石灰化面/骨

面が全てWTと比較し有意に減少していた（Fig. 8A,B）. しかし, 骨芽細胞にはSiglec-15遺伝子が発現しておらず，WT，*Siglec-15*$^{-/-}$骨芽細胞を *in vitro* で培養しても石灰化結節の形成やALP活性には差が見られなかった（Fig. 8 C,D）. すなわち，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスの生体内では骨形成が低下しているが，これはSiglec-15が直接骨芽細胞の機能を抑制する訳ではなく，破骨細胞分化の障害により低骨代謝回転となった結果，二次的に骨芽細胞の機能が抑制されたものと考えられた.

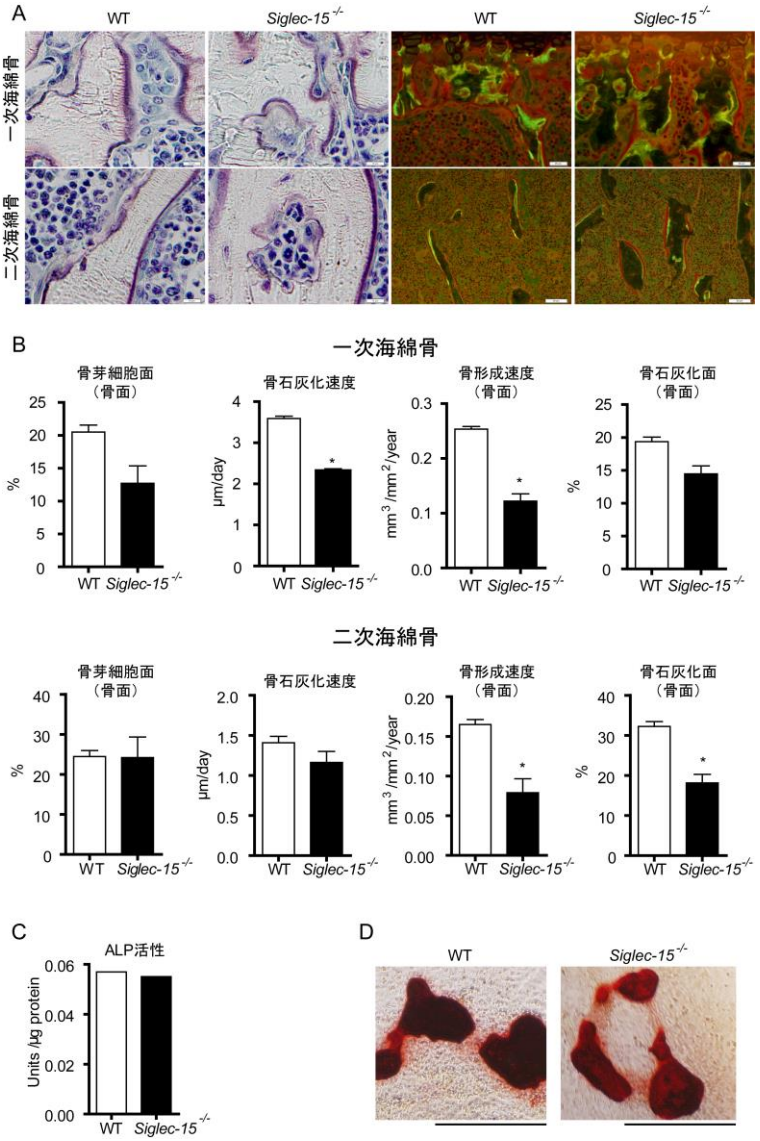

Fig. 8. *Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは破骨細胞の機能障害に伴い骨形成が低下するが，骨芽細胞機能は正常である．A) 14 週齢雄の WT 及び *Siglec-15*$^{-/-}$マウスより脛骨を採取し，Villaneuva Bone 染色を行った．屠殺する 4 日前にテトラサイクリン (20 mg/kg)を，2 日前にカルセイン (20 mg/kg) をそれぞれ皮下投与し，骨標識を行った．左：Villaneuva Bone 染色した切片を光学顕微鏡で観察した．右：蛍光顕微鏡で観察すると，テトラサイクリンで標識された部位は黄色に，カルセインで標識した部位は緑に光っている．B) 一次海綿骨領域，二次海綿骨領域それぞれにおける骨形態計測の結果を示す．*Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは骨形成が低下している．骨芽細胞面/骨面，骨石灰化速度，骨形成速度/骨面，骨石灰化面．は *Siglec-15*$^{-/-}$マウスで低下している．(n =3. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$). C) WT と *Siglec-15*$^{-/-}$新生児マウスの頭蓋骨より骨芽細胞を採取し，骨芽細胞分化培地にて 14 日間培養した後の ALP 活性を測定した．D) 骨芽細胞を骨芽細胞分化培地で 21 日間培養し，アリザリンレッドで石灰化結節を染色した．WT と *Siglec-15*$^{-/-}$骨芽細胞の骨形成能に差は無い．

Siglec-15 は機能的な破骨細胞分化に必要である

破骨細胞分化における Siglec-15 の機能を解析するために，WT 及び *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージを M-CSF 及び RANKL 存在下に破骨細胞へと分化誘導した．Plastic dish 上で培養した *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージは TRAP 陽性細胞へと分化したものの，単核の細胞がほとんどであり，わずかにみられた多核細胞も，WT と比較すると小さく，いびつな形態を呈していた（Fig. 9A）．牛皮質骨切片上で 10 日間培養し，形成された骨吸収窩の面積を測定すると，WT では 77.5 %±7.7 %の範囲で骨吸収窩が形成されたのに対し，*Siglec-15*$^{-/-}$では 8.9 %±5.3 %と，S*iglec-15*$^{-/-}$破骨細胞は骨吸収能が著しく低下していた (Fig. 9B)．破骨細胞分化マーカーである TRAP，Cathepsin K，Integrin β3，calcitonin receptor (CTR)の mRNA 発現を qPCR で確認すると，*Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞では WT と比較していずれも低下しており（Fig. 9C），*Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージでは成熟した機能的破骨細胞への分化が障害されている事がわかった．

Siglec-15$^{-/-}$破骨細胞の形態に異常が見られた事から，破骨細胞の細胞骨格を詳細に検討する事とした．破骨細胞は骨に接着する際に sealing zone を形成し，その内部に酸や蛋白分解酵素を分泌する事で骨吸収を行うが，この sealing zone にはリング状にアクチンが集積して骨格を形成し，骨基質と密に接着する事が知られている [37]．そこで，我々は培養した破骨細胞に対して F-アクチンの染色を行った．すると，WT 破骨細胞ではアクチンリングが形成されたのに対し，Siglec-15$^{-/-}$破骨細胞ではわずかにみられた多核細胞においてもリングが形成されなかった (Fig. 9D)．更に，破骨細胞は plastic dish 上では平坦な細胞となり，骨基質上では丸い立体的な形態をとる事が知られているため，我々は生体内環境に近い牛皮質骨切片上で破骨細胞を培養し，その形態を観察した．すると，牛皮質骨切片上で培養した *Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞はやはり単核の細胞が多く，巨大な多核破骨細胞を形成する事はできなかった(Fig. 9E)．また，WT 破骨細胞では一つの破骨細胞に複数のアクチンリングが形成されたが，*Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞ではアクチンリングは形成されなかった（Fig. 9F）．すなわち，Siglec-15 は破骨細胞の細胞骨格形成に重要な役割を果たす事が示された．

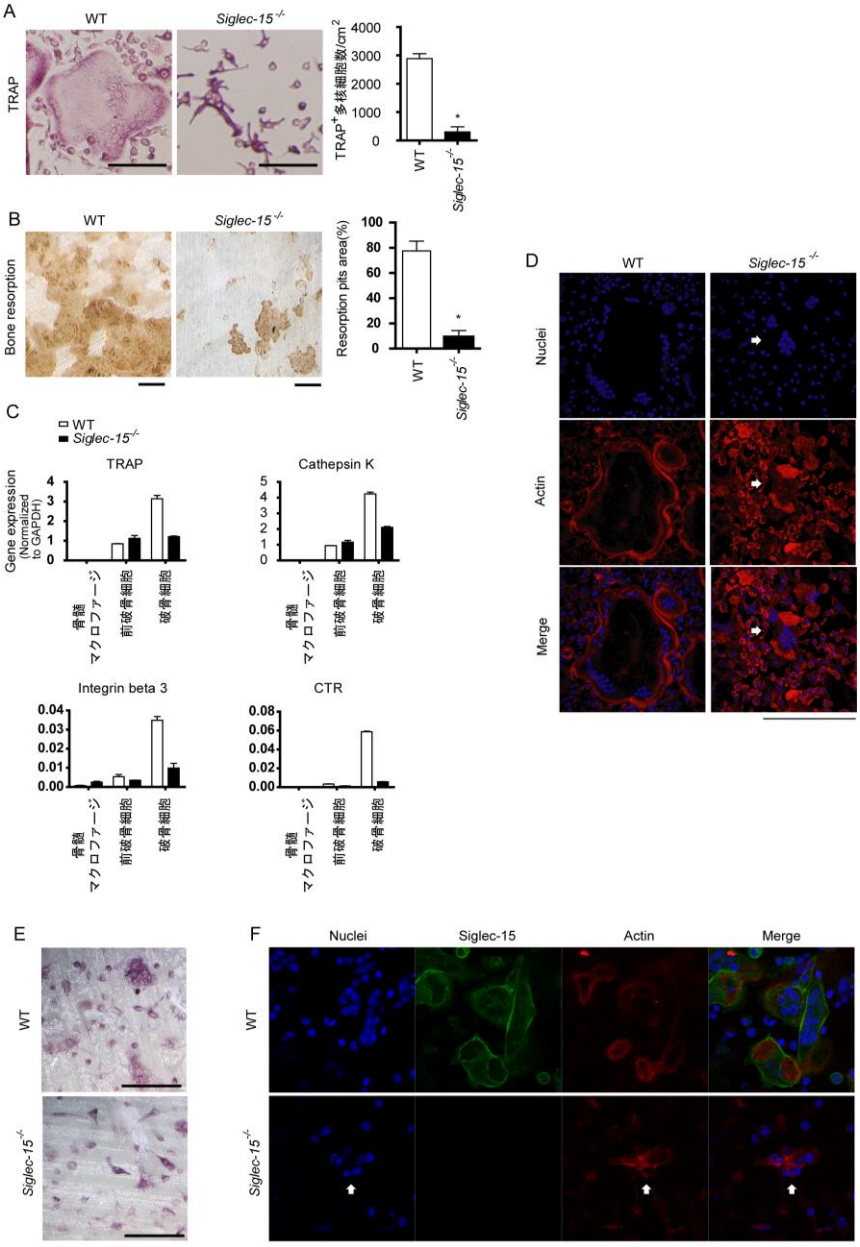

Fig. 9. Siglec-15 は機能的な破骨細胞分化に必要である．A) WT 及び *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージを M-CSF と RANKL により破骨細胞へと分化誘導し，TRAP 染色を行った．*Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージでは多核破骨細胞への分化が障害されている．核を 3 個以上有する TRAP 陽性細胞を多核破骨細胞とした．(n =3. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$). B) 牛皮質骨切片上で破骨細胞を 10 日間培養し，骨吸収窩を染色した（brown areas）. *Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞は骨吸収能が低下している. (n =3. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$). C) 破骨細胞の分化マーカーを qPCR で定量した．M-CSF 及び RANKL 存在下に 2 日間培養したものを前破骨細胞，3 日間培養したものを破骨細胞とした．D) 骨髄マクロファージをスライドガラス上で M-CSF 及び RANKL 存在下に 4 日間培養し，Alexa Fluor 633 ファロイジンにより F-アクチンの染色を行った．矢印は *Siglec-15*$^{-/-}$でわずかにみられた多核破骨細胞を示す．アクチンリングは形成されていない． E) 牛皮質骨切片上で培養した破骨細胞の TRAP 染色．F) 牛皮質骨切片上で破骨細胞を培養し，抗 Siglec-15 抗体による免疫染色を行った．2 次抗体には Alexa Flour 488 goat anti-rabbit 抗体を用い，核染色には DAPI，F-アクチン染色には Alexa Fluor 633 ファロイジンを用いた．矢印は *Siglec-15*$^{-/-}$でわずかにみられた多核破骨細胞を示す．アクチンリングは形成されていない.

Siglec-15 の機能にはシアル酸の結合及び DAP12 との会合が必須である

Siglec-15 はシアル酸を認識する受容体であるが，Siglec-15 のリガンドであるシアル酸の役割を検証するために，Siglec-15 のシアル酸認識領域であるアルギニン残基をアラニンへと変異させた Siglec-15 point mutant (R143A)を作製した[27]．レトロウイルスベクターを用いて野生型 Siglec-15 を *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージに導入すると，破骨細胞分化が回復した．しかし，この R143A mutant を導入しても *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージの破骨細胞分化は回復しなかったため，Siglec-15 の機能にはシアル酸との結合が必須である事が示された(Fig. 10A, B).

Siglec-15 は 1 型膜貫通蛋白であり，膜貫通領域で DAP12 と会合する．DAP12 との会合には Siglec-15 膜貫通領域に存在するリジン残基 (K273)が必須である事が報告されており[27]，我々は Siglec-15 の機能における DAP12 の関わりを検証するためにこのリジン残基をアラニンへと変異させた Siglec-15 point mutant（K273A）を作製した．この K273A mutant を導入しても分化は回復しなかった事から, Siglec-15 による破骨細胞分化には DAP12 との会合が必須である事が示された（Fig. 10A, B）.

K273A mutant が DAP12 との会合を失活している事は導入した細胞より蛋白を抽出し，全細胞抽出液を抗 myc 抗体による免疫沈降に引き続き抗 DAP12 抗体，抗 Myc 抗体によるイムノブロットを行い確認した（Fig. 10C）.

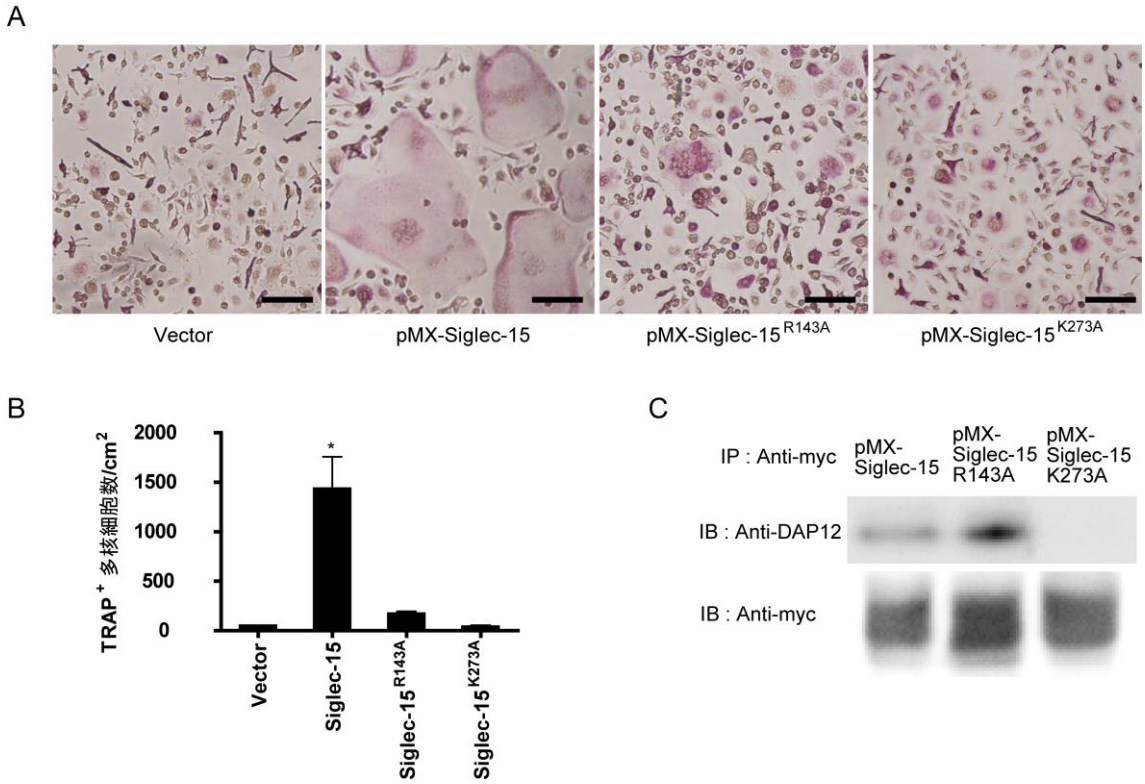

Fig. 10. Siglec-15 の機能にはシアル酸の結合及び DAP12 との会合の両者が必須である．A) *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージにレトロウイルスを用いて野生型もしくは変異型の Siglec-15 を導入し，破骨細胞へと分化誘導した．野生型 Siglec-15 の導入により，破骨細胞分化は回復した．一方で R143A，K273A mutant では破骨細胞分化は回復しなかった． B) 多核破骨細胞数（核≧3 個）をカウントした. (One-way ANOVA により検定． n =4. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$).

C) 抗 Myc 抗体による免疫沈降後, 抗 DAP12 抗体及び抗 Myc 抗体によるイムノブロットを行った. K273A mutant では DAP12 との会合が失われている.

考 察

本章の結果から，Siglec-15 は生体内で破骨細胞の分化及び機能に重要な役割を果たす分子である事が明らかとなった. *Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは機能的な多核破骨細胞の形成が障害されており，骨量が増加した．しかし，興味深い事に，一次海綿骨の領域では *Siglec-15*$^{-/-}$マウスでも WT と同様の巨大な多核破骨細胞が多数形成されていた. この事は生体内では部位により Siglec-15 が必ずしも必要ではない事を示唆している.

Siglec-15$^{-/-}$マウスの表現型は DAP12 ノックアウトマウスと類似しており，DAP12 ノックアウトマウスでも同様に破骨細胞分化の障害に伴い骨量が増加する [13, 15]．DAP12 が機能するには会合する免疫受容体群が重要な役割を果たすと考えられており，DAP12 には，Siglec-15 の他に TREM2 [14]，SIRPb1，MDL-1 [26] 等の免疫受容体が会合する．しかしながら，Siglec-15 以外の免疫受容体のノックアウトマウスでは骨量の増加は見られず，TREM2 のノックアウトマウスでは反対に骨粗鬆症化がみられる事 [36]，MDL-1 ノックアウトマウスでは生理的条件下では骨に特別な表現型は見られないが，関節リウマチ様の炎症性骨破壊が抑制される事が報告されている [26]．すなわち，これらの受容体群はそれぞれ特有な機能を持ち，様々な環境の変化に応じて破骨細胞分化を緻密かつ適切にコントロールしているものと思われる．本研究の結果からは，生理的環境下における破骨細胞分化には，免疫受容体群の中でも Siglec-15 が最も重要な役割を担っている事が示唆される.

In vitro で破骨細胞分化を誘導すると，Siglec-15$^{-/-}$骨髄マクロファージからは TRAP 陽性細胞までは分化するものの，成熟した多核破骨細胞の形成が障害され，わずかに形成された多核細胞も小さくいびつな形態を示した．また，破骨細胞が効率的に骨吸収を行うために必要なアクチンリングの形成が障害されていた．これらの事実は，Siglec-15 が破骨細胞の最終分化段階で特に重要な役割を果たし，特に細胞融合や細胞骨格の形成過程に重要な分子である事を示唆している．その詳細なメカニズムは不明であるが，レトロウイルスを使用した実験結果から，Siglec-15 の機能にはシアル酸の結合及び DAP12 との会合の両者が必須である事が明らかとなった．すなわち，Siglec-15 はリガンドであるシアル酸が結合する事により機能を発揮し，DAP12 を介して細胞内に興奮性シグナルを伝達して破骨細胞の分化を促進していると考えられる.

DAP12 は破骨細胞の分化を誘導するためのマスター転写因子である NFATc1 の増幅を促す分子として考えられてきたが [13]，近年では M-CSF やインテグリンシグナルを制御して細胞骨格の形成も制御する分子である事が明らかとなっている．[17-19]．*Siglec-15*$^{-/-}$

破骨細胞では多核破骨細胞への分化と，細胞骨格形成が障害されていた事は，Siglec-15 が DAP12 を介してこれらの経路を制御している可能性を示唆している．

次章では，Siglec-15 がどのように破骨細胞分化を制御しているのか，そのメカニズムを詳細に検討したので，その結果を論述する．

第 三 章
Siglec-15 による破骨細胞分化制御機構の解明

緒 言

これまでの結果から，Siglec-15 は DAP12 を介して破骨細胞の分化及び細胞骨格形成を制御していると考えられる．DAP12 は細胞内カルシウムシグナルを誘導し，破骨細胞のマスター転写因子である NFATc1 の核内移行および自己増幅を促し，破骨細胞分化を誘導する分子と考えられてきたが [13]，近年の研究により M-CSF やインテグリンのシグナル調節にも関与し [17-19,38-40]，破骨細胞の細胞骨格形成を制御する分子であることも明らかとなってきている．すなわち，Siglec-15 は DAP12 を介してこれらシグナルの活性化に寄与している可能性が高い．

また，生体内においてはもう一つの ITAM アダプター分子である FcRγが存在する事に留意する必要がある．FcRγシグナルは，DAP12 と同様に会合する免疫受容体を介して活性化されると考えられているが，その活性化メカニズムは未だ不明な点が多い．従来は骨芽細胞が何らかのリガンド分子を産生し FcRγシグナルを活性化すると考えられてきたが [13]，近年ではコラーゲンに存在するペプチド構造の一部が FcRγと会合する免疫受容体の一つである osteoclast associated receptor (OSCAR)と結合し，FcRγシグナルを活性化する事が報告された [41]．

Siglec-15$^{-/-}$マウスにおいては，興味深い事に一次海綿骨領域においては WT 同様に巨大な多核破骨細胞が誘導されていた．すなわち生体内においては Siglec-15 の機能を代償する機構が存在する事が明らかである．生体内での Siglec-15 の機能を考えるためには，この代償機構を明らかにする必要がある．

我々は，Siglec-15 がどのように破骨細胞分化を制御するのかを明らかとするため，DAP12 下流のシグナル伝達経路の検証を行うとともに，FcRγシグナルの活性化により *Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞分化がどのように変化するかを検証した．

実 験 方 法

試薬

使用した抗体は，Exalpha Biological 社製 (Shirley, MA) 抗 DAP12 抗体，Santa Cruz Biotechnology 社製 (Santa Cruz, CA, USA) 抗 vav3 抗体, Abcam 社製 (Cambridge, UK) 抗 Syk 抗体, Upstate 社製 (Billerica, MA, USA) 抗 phosphotyrosine 抗体，Acris 社製 (Herford, Germany)抗 NFATc1 抗体，Cell Signaling Technology 社製 (Danvers, MA) 抗 phospho-Erk (p-Erk), 抗 Erk, 抗 phospho-Akt (p-Akt), 抗 Akt, 抗 phospho-Phosphatidylinositol 3-Kinase (p-PI3K) p85，抗 PI3K p85，抗 phospho-JNK (p-JNK)，抗 JNK，抗 phospho-p38 (p-p38)，抗 p38，抗 phospho-Iκβα (p-Iκβα)，抗 Iκβα，抗 phospho-Syk，抗 Myc 抗体である.

ラット type I collagen coat plate は BD Falcon (Tokyo, Japan)，chicken type II collagen は Sigma-Aldrich (Tokyo, Japan)から購入した．マウスオステオポンチン (osteopontin (OPN))は PeproTech 社 (London, UK)より購入した.

Collagen，オステオポンチンコーティング

Chicken type II collagen は 0.1M 酢酸で 100 μg/ml に溶解し， 3 μg/cm^2 となるようにディッシュまたは牛皮質骨切片に添加し，4 ℃，overnight でコーティングした ．溶液を吸引し，PBS で 3 回洗浄後に乾燥させ，実験に使用した． マウスオステオポンチンは PBS で 5 μg/ml に溶解，ディッシュに溶液を添加し，4 ℃，overnight でコーティングした.

骨髄マクロファージと骨芽細胞の共培養系

骨髄マクロファージとマウス頭蓋由来骨芽細胞の共培養は 48well plate を用いた. WT もしくは *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージを 2.5×10^4 個/well, WT 骨芽細胞を 2×10^4 個/well の密度で蒔き, 10 %FBS, 50 μg/ml アスコルビン酸, 10nM 1,25-dihydroxyvitamine D3 および 1 μM dexamethazone 含有α-MEM で 7 日間培養した. 培地は 2 日毎に交換した.

RNA 干渉による OSCAR 遺伝子の発現抑制

マウス OSCAR をターゲットとした short hairpin RNAs (ShRNAs)を Takara Bio 社のソフトを使用して設計した．設計したオリゴはカートリッジ精製したものを Sigma Genosys 社 (Spring, TX)より購入した．100μM に溶解したオリゴを混合し，95 ℃で 30 秒，72℃で 2 分，37℃で 2 分，25℃で 2 分反応させ，アニーリングを行った．アニーリングしたオリゴは BamHI と EcoRI の断端を有しており，pSIREN Retro Q vector (Takara Bio)に挿入した (Fig. 11)．以下に設計した shRNA sequence を示す．

TOP strand: GATCCGTCTTATTCTGTAATGTAATTCAAGAGATTACATTACAGAATAA GACTTTTTTACGCGTG.

Bottom strand: AATTCACGCGTAAAAAAGTCTTATTCTGTAATGTAATCTCTTGAATTA CATTACAGAATAAGACG.

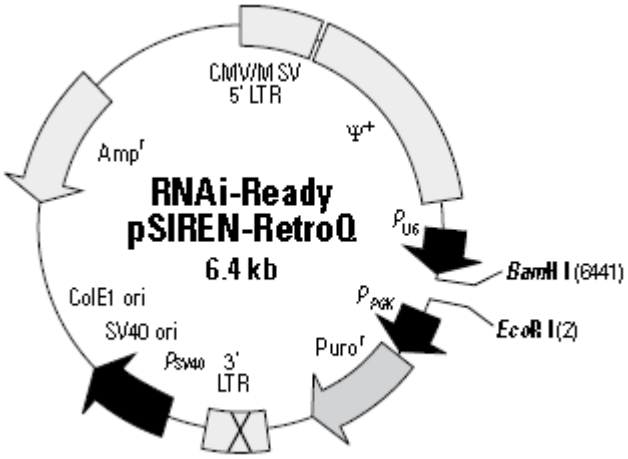

Fig. 11. pSIREN Retro Q Vector のベクターマップを示す.

免疫沈降法とイムノブロット解析

骨髄マクロファージを一定期間 M-CSF 及び RANKL の存在下で培養し，前破骨細胞 (day2)，もしくは破骨細胞 (day3-4)へと分化させた．蛋白の抽出には Phosphosafe Extraction Reagent (Novagen, Madison, WI)を用い，全細胞抽出液を免疫沈降とイムノブロット解析に供した.

使用した抗体は，Exalpha Biological 社製 (Shirley, MA) 抗 DAP12 抗体 (1:1000 dilution)，Santa Cruz Biotechnology 社製 (Santa Cruz, CA, USA) 抗 vav3 抗体 (1:1000 dilution)，Abcam 社製 (Cambridge, UK) 抗 Syk 抗体(1:1000 dilution)，Upstate 社製 (Billerica, MA, USA) 抗 phosphotyrosine 抗体 (1:1000 dilution)，Acris 社製 (Herford, Germany)抗 NFATc1 抗体 (1:1000 dilution), Cell Signaling Technology 社製 (Danvers, MA) 抗 phospho-Erk (p-Erk) (1:1000 dilution)，抗 Erk (1:1000 dilution)，抗 phospho-Akt (p-Akt) (1:1000 dilution), 抗 Akt (1:1000 dilution), 抗 phospho-Phosphatidylinositol 3-Kinase (p-PI3K)

p85 (1:1000 dilution)，抗 PI3K p85 (1:1000 dilution)，抗 phospho-JNK (p-JNK) (1:1000 dilution)，抗 JNK (1:1000 dilution)，抗 phospho-p38 (p-p38) (1:1000 dilution)，抗 p38，抗 phospho-Iκβα (p-Iκβα) (1:1000 dilution)，抗 Iκβα (1:1000 dilution)，抗 phospho-Syk (1:1000 dilution)，抗 Myc 抗体 (1:1000 dilution)である．

カルシウムオシレーション測定

骨髄マクロファージを RANKL (100ng/ml) 存在下に 72 時間培養し，カルシウムオシレーション測定に供した．培養した細胞を 5 μM fluo-4 AM, 2.5 mM probenecid，および 0.05% pluronic F127 含有 DMEM で 37℃，30 分間インキュベートし，DMEM で 3 回洗浄後，37℃にプレインキュベートした DMEM (10 %FBS，30 ng/ml M-CSF，100 ng/ml RANKL)を加え共焦点走査型レーザー顕微鏡(Carl Zeiss) で観察した．Fluo-4 は 488 nm で励起し，発せられた蛍光を 5 秒毎に検出し，画像を取得した．取得した画像を用いて，細胞それぞれにつき，ROI を設定して蛍光強度を測定し，得られた経時的な fluo-4 蛍光強度を，一定時間計測後にイオノマイシン(10 μM)を添加し得られた fluo-4 蛍光強度の最大値で除し，割合として算出した．

免疫染色

カバーガラス上で培養した細胞を 4 %パラホルムアルデヒドを用いて室温で 20 分間固定し，0.2 %Triton X-100 で透過処理を行った．5 %BSA でブロッキングした後，抗 NFATc1 抗体 (1:1000 dilution; Acris, Herford, Germany)を反応させ，次いで Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体(1:500 dilution; Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA)を反応させた．核染色には DAPI reagent (1:1000 dilution 同仁化学研究所，熊本，日本)を用いた．カバーガラスはスライドガラスにマウントし，共焦点走査型レーザー顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)を用いて観察した．

GST pull down assay

骨髄マクロファージを Type II collagen coat dish 上で M-CSF 及び RANKL 存在下に 4 日間培養し，多核破骨細胞へと分化させた．1 時間 α MEM で血清飢餓の後，100 ng/ml M-CSF で 5 分刺激した． 蛋白の抽出には Phosphosafe Extraction Reagent (Novagen, Madison, WI)を用いた．Rac 及び cdc42 の活性はそれぞれ Rac1 Activation Assay Biochem Kit (Cytoskeleton, Inc. Denver, CO)及び CDC42 Pull-down Activation Assay Biochem Kit (Cytoskeleton, Inc. Denver, CO)を用いて評価した．

qPCR

PCR DNA Engine Opticon 2 System (MJ Research, Hercules, CA)を使用し，DyNAmo™ HS SYBR Green qPCR Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて DNA 合成の検出に用いた．使用したマウス NFATc1，OSCAR，および GAPDH のプライマーのシークエンスを Table 3.に示す． mRNA の発現量は全て GAPDH の発現量により標準化した.

Gene	Forward primers (5'-3')	Reverse primers (5'-3')	Amplicon (bp)	Accession number
NFATc1	CCTGGAGATCCCGTTGCT	GGTGTTCTTCCTCCCGATGT	135	AF239169
OSCAR	CCGTGCTGACTTCACACCAA	GGGGTGACAAGGCCACTTTT	165	NM_175632
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA	95	NM_008084

Table. 3. qPCR に用いた Primer 配列一覧.

統計分析

得られたデータは, 2 群間の検定には Student's T-test を, 3 群以上の検定には ANOVA を用いて有意差検定を行い，判定は P 値＜0.05 で有意差ありとした．データは mean ±SEM で表した.

実 験 結 果

Siglec-15 はカルシウムシグナルを介した NFATc1 の増幅にわずかな影響をもつ

DAP12 はカルシウムシグナルを介した NFATc1 の増幅に重要な役割を果たすと言われている．Siglec-15 のカルシウムシグナルへの関与を検証するために，我々は WT 及び *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージを M-CSF 及び RANKL 存在下に 3 日間培養し，カルシウムオシレーションを観察した（Fig. 12A）．オシレーションの頻度は *Siglec-15*$^{-/-}$前破骨細胞で若干少なかったものの，統計学的に有意な差は無かった（Fig. 12B, C）．この結果を裏付けるように，NFATc1 の核内移行も WT と *Siglec-15*$^{-/-}$前破骨細胞の間に差は無かった（Fig. 12D）．NFATc1 の mRNA 発現は *Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞で若干少なかったが (Fig. 12 E), イムノブロット法で蛋白発現を検証すると WT と *Siglec-15*$^{-/-}$の間に差は無かった (Fig. 12 F)．以上より，Siglec-15 は破骨細胞分化におけるカルシウムシグナル及び NFATc1 の増幅には必須ではない事が示された.

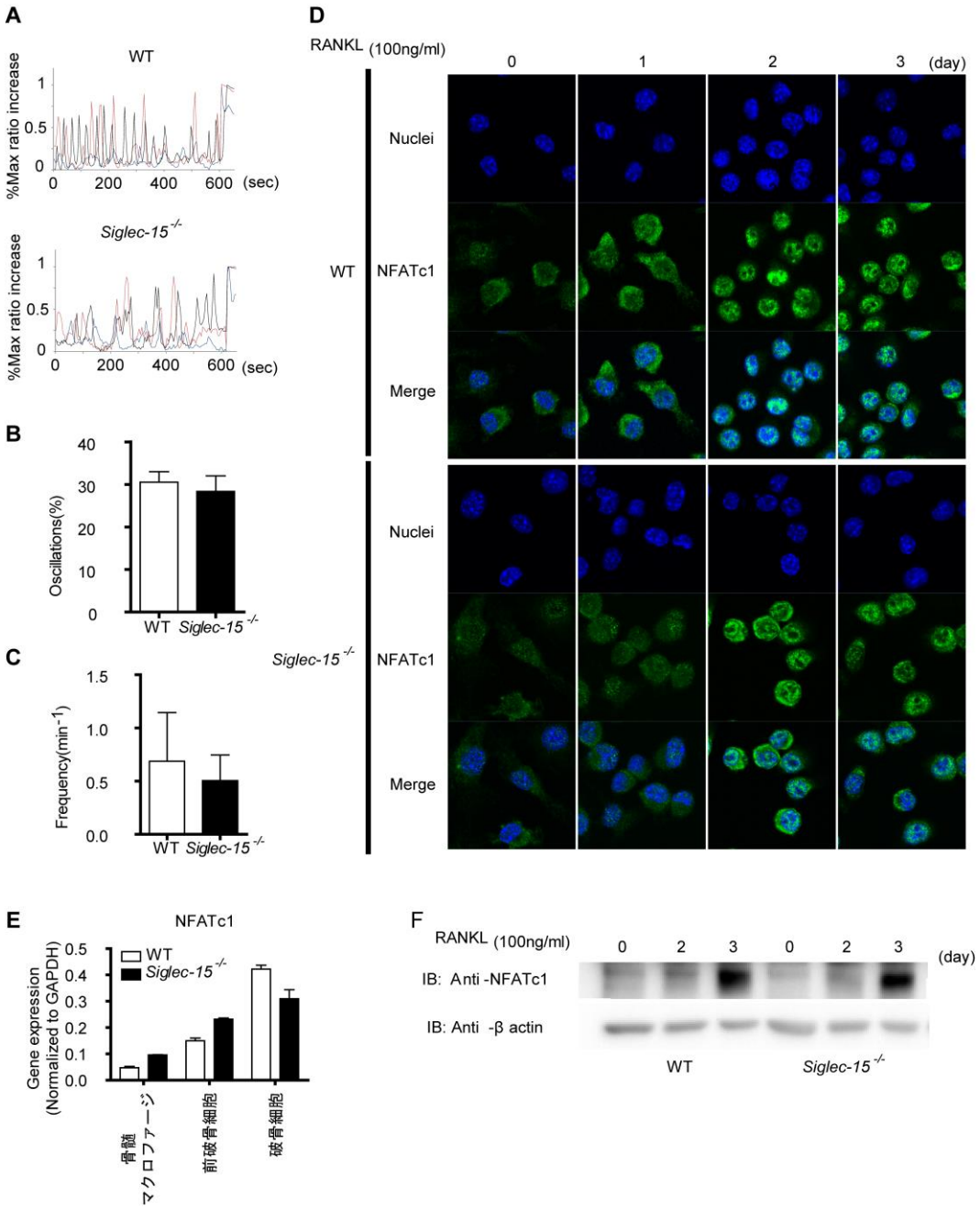

Fig. 12. Siglec-15 はカルシウムシグナルにわずかな影響を持つ．A) 骨髄マクロファージを M-CSF (30 ng/ml)及び RANKL (100 ng/ml)存在下に 3 日間培養し，カルシウムオシレーションを観察した．それぞれの線は異なる細胞の継時的なカルシウムイオン濃度の推移を示す．B）オシレーションの見られた細胞の割合を示す．(n =3. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$)．C) 1 分あたりに観察されたオシレーションの回数を示す．(n =20. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$)．D)WT，Siglec-15$^{-/-}$骨髄マクロファージを M-CSF (30ng/ml)及び RANKL (100 ng/ml)存在下に培養し，継時的に NFATc1 の発現を確認した．抗 NFATc1 抗体および Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体を用いて NFATc1 の局在を明らかにした．核染色には DAPI を用いた．E) NFATc1 遺伝子発現を qPCR を用いて計測した．ハウスキーピング遺伝子である GAPDH の発現量で標準化した．(One-Way ANOVA により検定を行った．n =3. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$). F) NFATc1 の発現をイムノブロット法で確認した．

Siglec-15 は M-CSF 及びインテグリンによる細胞骨格制御に関与しない

Siglec-15$^{-/-}$破骨細胞では正常な細胞骨格が形成されなかった事から，我々は破骨細胞の細胞骨格を制御するオステオポンチン/インテグリンや M-CSF に注目し，シグナル伝達経路の活性を検証した．しかし，*Siglec-15*$^{-/-}$破骨前駆細胞においてもオステオポンチンや M-CSF 刺激による細胞内シグナルは WT と同等に活性化されていた（Fig.13A, B）．

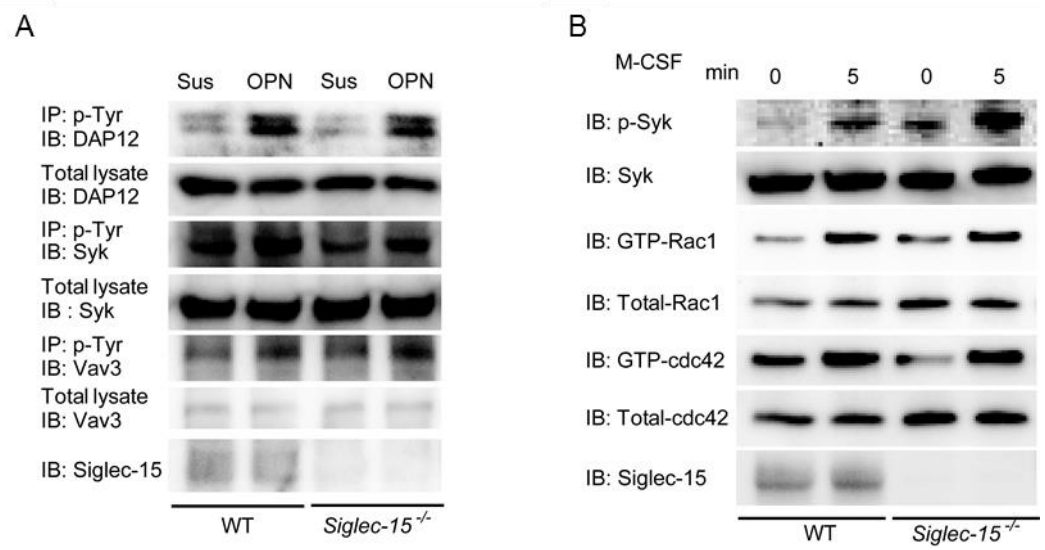

Fig. 13. Siglec-15 はインテグリン，M-CSF シグナルに関与しない．A) WT 及び Siglec-15$^{-/-}$前破骨細胞を 0.25 % Trypsin-EDTA で浮遊させ，培地にサスペンションさせた状態（Sus），もしくはオステオポンチンでコートした Dish で 30 分間培養した状態（OPN）とし，それぞれ全細胞抽出液を抽出した．DAP12, Syk, Vav3 のリン酸化を免疫沈降及びイムノブロット法で評価した． B) 骨髄マクロファージを Type II collagen coat dish 上で M-CSF 及び RANKL 存在下に 4 日間培養し，多核破骨細胞へと分化させた．1 時間 αMEM で血清飢餓の後，100 ng/ml M-CSF で 5 分刺激した．Syk のリン酸化をイムノブロット法で評価した．Rac 及び cdc42 の活性は GST pull down assay により評価した．IP; immunoprecipitation，IB; immunoblotting.

Siglec-15 は DAP12 を介して RANKL 下流の PI3K/Akt 及び Erk のリン酸化を制御する

これまでの結果からは，DAP12 を介した既知のシグナル伝達経路に明らかな異常は見られなかった．そこで，我々は破骨細胞の分化に必須な RANKL シグナルについて検証を行う事とした．RANKL シグナルは破骨細胞の分化のみならず，最終分化段階での細胞骨格形成にも重要な役割を担う事が近年の知見から明らかとなっている [42-44].

RANKL 下流のシグナル伝達経路をイムノブロット法で検証すると，*Siglec-15*$^{-/-}$前破骨細胞では，RANKL 刺激後の PI3K p85，Akt 及び Erk のリン酸化が障害されていた．このリン酸化は野生型 Siglec-15 の導入によって回復したが，K273A mutant の導入では回復しなかった事から，Siglec-15 は DAP12 を介して PI3K/Akt 及び Erk のリン酸化を

調節し, 破骨細胞分化及び細胞骨格形成を制御する分子である事がわかった (Fig. 14A, B).

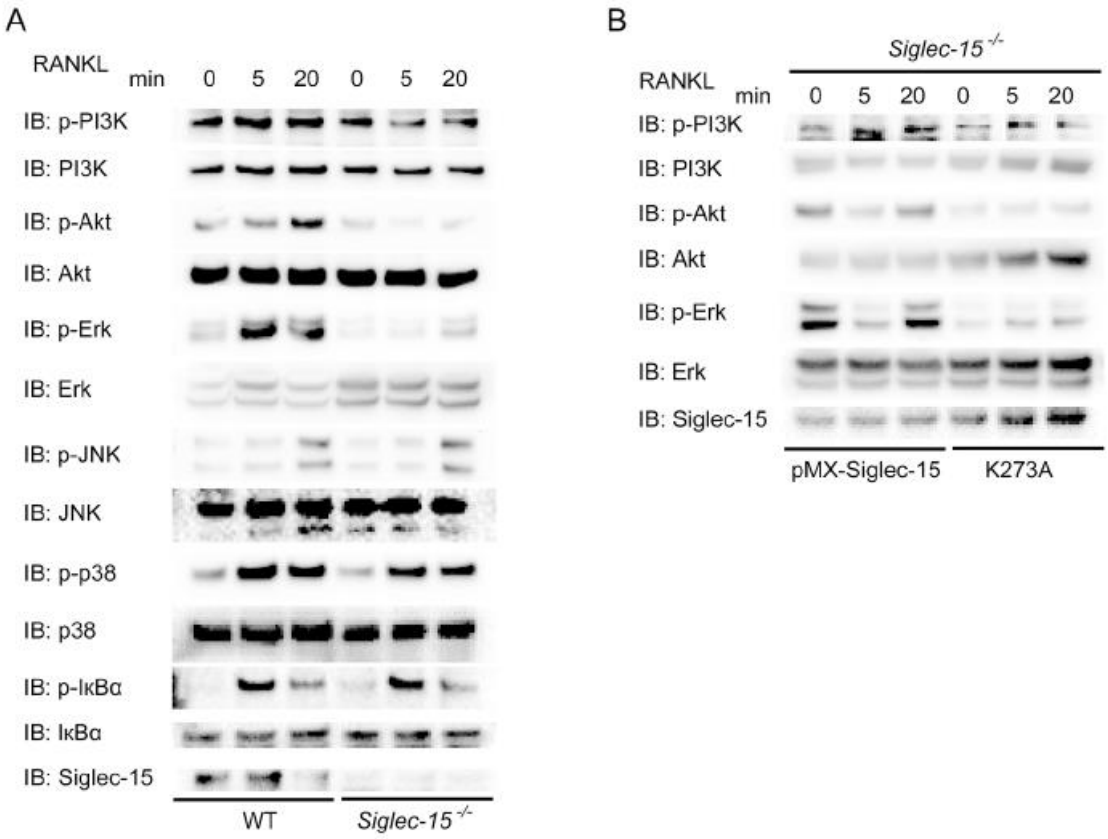

Fig. 14. Siglec-15 はDAP12 を介して RANKL シグナル下流の PI3K/Akt, Erk のリン酸化を制御する．A) 前破骨細胞を 1 時間αMEM で血清飢餓の後 100 ng/ml RANKL で刺激した．PI3K，Akt，Erk，JNK，p38，Iκβαのリン酸化をイムノブロット法で検証した． B) Siglec-15$^{-/-}$前破骨細胞に野生型 Siglec-15 もしくは K-273A mutant を導入し，1 時間αMEM で血清飢餓の後 100 ng/ml RANKL で刺激した.

OSCAR/FcRγシグナル及び骨基質の存在下では Siglec-15 の機能は代償される

ここまでの研究結果からは，*in vitro* と *in vivo* で *Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞の分化の程度に差がある事がわかった．すなわち，*in vitro* においては *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージは殆ど多核の破骨細胞を形成しないのに対し，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスの組織切片においては特に成長軟骨の直下では巨大な多核破骨細胞が多数形成されていた．この現象を説明する上で，我々は生体内には Siglec-15 の機能を代償する機構が存在すると考え，検証を行った.

ITAM アダプター分子には DAP12 以外に FcRγが存在する．FcRγは DAP12 の機能を

一部代償する事が知られているため我々はFcRγシグナルの賦活化が *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージの破骨細胞分化に与える影響を検討した．FcRγシグナルの賦活化がどのように起きるか，詳細なメカニズムは未だ明らかとなっていないが，過去の研究からは骨芽細胞がFcRγシグナルを賦活化する役割を担う事が明らかとなっている[13]. 更に，近年コラーゲンに存在する構造の一部がFcRγに会合する免疫受容体であるOSCARと結合し，FcRγシグナルを賦活化する事が明らかとなった[41]．そこで，我々は *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージと骨芽細胞との共培養を試み，更にtype I，type II collagenをコートしたディッシュ上での破骨細胞分化を検討する事とした.

骨芽細胞との共培養系において，*Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージは多数の多核破骨細胞を形成するようになった (Fig. 15A)．しかしながらWTと比較するとその形態は小さくいびつであり，大きく広がる正常な細胞骨格を形成する事はできなかった．Type I collagenコートディッシュ上で培養しても *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージの破骨細胞分化に大きな変化はみられなかったが (Fig. 15B)，type II collagenコートディッシュ上で培養すると *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージでも非常に巨大化した多核破骨細胞を形成するようになった (Fig. 15C)．しかしながら，形成された多核破骨細胞はWTのような円形の細胞とはならず，偽足を多数形成するいびつな形態をとっていた．F-アクチンの染色を行うと，type II collagen上で巨大化した *Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞はアクチンリングを形成できていない事がわかった (Fig. 15E).

このtype II collagenの作用がOSCARを介したものであると証明するために，shRNAを用いてOSCAR遺伝子のノックダウンを試みた．すると，OSCAR遺伝子をノックダウンした *Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞ではtype II collagenによる多核化が見られなくなった (Fig. 15D).

次に，生体内での一次海綿骨領域を模倣するために，我々はtype II collagenをコートした牛皮質骨切片上で *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージを破骨細胞へと分化誘導した．すると，驚くべきことに *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージからも多核化した破骨細胞が形成され (Fig. 15F)，かつ，これらの細胞はWT同様にアクチンリングを形成している事が明らかとなった (Fig. 15G)．すなわち，OSCAR/FcRγシグナル，及び骨基質の両者が存在する環境ではSiglec-15の機能が完全に代償される事がわかった.

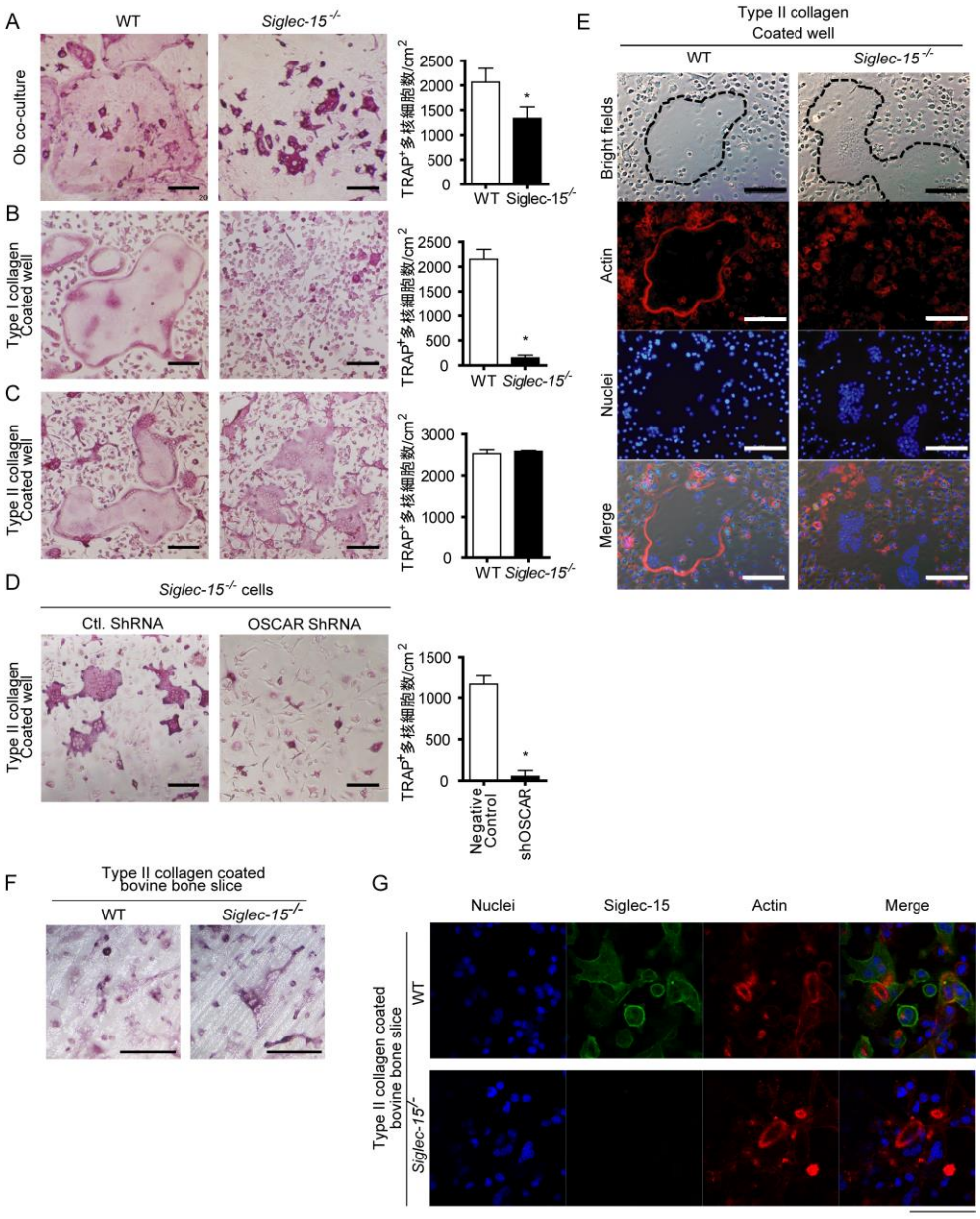

Fig. 15. Siglec-15 の機能は OSCAR/FcRγシグナル及び骨基質の存在下で代償される．A-D) 推定される OSCAR/FcRγリガンドの存在下で，骨髄マクロファージを破骨細胞へと分化誘導した． A)骨芽細胞との共培養．(n =3. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$)B) Type I collagen コートディッシュでの培養．(n =4. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$)C) Type II collagen coat dish での培養．(n =3. Data shown are mean ± SEM.)D) shRNA により OSCAR 遺伝子をノックダウンした骨髄マクロファージを type II collagen コートディッシュ上で培養した．(n =3. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$). E) Type II collagen コートディッシュ上で分化した破骨細胞の F-アクチンを Alexa Fluor 633 ファロイジンで染色した．*Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞は多核化しているが，アクチンリングは形成できない．F) Type II collagen をコートした牛皮質骨切片上で骨髄マクロファージを破骨細胞へと分化させた．*Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージからも多核破骨細胞が形成されている．G) Type II collagen をコートした牛皮質骨切片上で破骨細胞を分化誘導し，F-アクチンの染色を行った．*Siglec-15*$^{-/-}$でもアクチンリングの形成が見られる．

考 察

本章では，Siglec-15 が DAP12 を介して RANKL 下流の PI3K/Akt および Erk のリン酸化を促す事により破骨細胞の分化と細胞骨格形成を制御する分子である事が明らかとなった. これまでに DAP12 が RANKL シグナルを調節すると報告した文献はなく，本研究は Siglec-15/DAP12 複合体のもつ新たな機能を明らかとした. RANKL 刺激による Erk のリン酸化は破骨細胞分化を促進し，PI3K/Akt のリン酸化は破骨細胞の細胞骨格形成に働く事が知られており [42-44]，*Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞が多核化できず，アクチンリングを形成できなかった結果と合致する．興味深い事に，DAP12 を介したカルシウムシグナルの活性化や，M-CSF，インテグリンを介した細胞骨格形成には関与せず，Siglec-15 は DAP12 の機能の一部のみを担う分子である事がわかった.

また，Siglec-15 の機能は typeII コラーゲンによる FcRγシグナル活性化及び骨基質の両者が存在下する場合には完全に代償された．この事は生体内において，一次海綿骨領域においては Siglec-15 が無くても正常に破骨細胞分化が起きる事を示し，Siglec-15 は二次海綿骨領域における骨吸収制御に重要な分子である事がわかった.

総合すると，Siglec-15 は生体内において RANKL シグナルを調節する事により，特に二次海綿骨領域における破骨細胞分化を制御する分子であり，生理的環境下においては Siglec-15 を阻害する事により骨量の増加がみられる事が明らかとなった．しかしながら，病的な骨吸収亢進状態，すなわち閉経後骨粗鬆症，転移性骨腫瘍，関節リウマチ, 感染などで見られる骨破壊においても Siglec-15 が破骨細胞分化を制御するかどうかは未だ不明である.

そこで, 我々は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を検証すべく，マウス卵巣摘出モデルを用いて検討を行った．次章にてその詳細を述べる.

第 四 章
閉経後骨粗鬆症における Siglec-15 の役割

緒 言

閉経後にはエストロゲン欠乏によって骨代謝回転が亢進し，骨吸収および骨形成の両者が亢進するが，骨吸収の亢進が骨形成を上回るため，結果として急速に骨量が減少する[5]．エストロゲン欠乏により，骨芽細胞から M-CSF や RANKL 等の破骨細胞誘導因子の分泌が増加する他，単球，T 細胞からは IL-1，TNFαといった炎症性サイトカインの分泌が亢進し，これらは破骨細胞の分化，機能を促進する[5]．また，破骨細胞そのものにもエストロゲン受容体が存在し，エストロゲンは直接破骨細胞の活性を抑制し，アポトーシスを促す事で骨吸収を抑制している[5]．

閉経後にはエストロゲンによる破骨細胞の抑制機構が無くなることにより，急速な骨量減少が起こるわけであるが，これら多岐にわたる機構の中でも TNFαが最も重要な因子であると言われている[45-47]．TNF 欠損マウスでは卵巣摘出後にも骨量の減少が起こらず，このことは閉経後の骨粗鬆症においては炎症性サイトカインである TNFαの分泌亢進が主な役割を担っている事を示している[45]．

TNFαは破骨前駆細胞に作用して RANK の発現を上昇させるとともに，間葉系細胞の RANKL 発現も増加させることで破骨細胞分化を促進する[48,49]．更に，TNFαは破骨前駆細胞の RANKL への感受性を著しく上昇させるため，TNFαの存在下では破骨前駆細胞はごく微量の RANKL によっても破骨細胞へと分化するようになる[50,51]．

RANKL 欠損マウス，RANK 欠損マウスにおいて TNFαが破骨細胞分化を誘導したという報告から，TNFαには RANKL 非依存的な破骨細胞誘導能があるとも考えられている[52]. しかし, これについては相反する意見もあり未だ結論が出ていない. RANKL 欠損マウスと TNFαトランスジェニックマウスを交配しても大理石骨病が改善しなかったという報告は，TNFα単独での破骨細胞分化を否定するものである[53]．

TNFαが破骨細胞分化を制御する詳細なメカニズムは不明であるが，TNFαは破骨前駆細胞に存在する tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1)に結合し，NFκβ，JNK，p38, Erk, Akt といった分子を活性化し, 破骨細胞分化に寄与していると考えられている[54]．

我々のこれまでの研究結果から，Siglec-15 は生理的環境下において RANKL シグナルを調節し破骨細胞分化を制御する分子であることが明らかとなったが，果たして閉経後骨粗鬆症のように RANKL 以外の炎症性サイトカインが破骨細胞の分化を促進する状況においても骨吸収を制御し得るのかは未だ不明である．

そこで，我々は WT 及び *Siglec-15*$^{-/-}$マウス卵巣摘出モデルを用いて Siglec-15 が閉経後骨粗鬆症に対する治療ターゲットとなり得るかを検証するとともに，閉経後の骨量減少において主たる役割を果たす TNFαによる破骨細胞分化に与える影響を検証した．

実 験 方 法

使用動物及び卵巣摘出モデルの作製

本研究のために実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した．14 週齢，雌の WT，及び *Siglec-15*$^{-/-}$マウスを手術した．両側の卵巣を摘出する群（Ovx）と腹膜切開のみを行う群（Sham）とに分け，手術後 4 週時点で脛骨を採取し，パラフィン組織切片を作製した．手術後 8 週時点で脛骨及び腰椎のマイクロ CT を撮影し，骨量の変化を観察した．

組織解析

手術後 4 週で採取した脛骨を 4 %パラホルムアルデヒドで固定，EDTA 脱灰しパラフィン包埋した．作製したパラフィン切片を TRAP（酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ）およびメチルグリーンで染色，破骨細胞を観察した．

骨形態学的な解析のためには，手術後 2 週のマウスより脛骨を採取し，Villaneuva Bone 染色を行った非脱灰骨組織標本を作製した．屠殺する 5 日前と，2 日前にカルセイン (20 mg/kg) を皮下投与した．標本の作製は新潟骨の科学研究所（新潟，日本）にて行って頂いた．

細胞培養

骨髄マクロファージを用いた破骨細胞分化誘導には, 10 % FBS, 30 ng/ml M-CSF, 100 ng/ml TNFα含有の α-MEM を培地として用い， 3-5 日間培養した．実験により，100 ng/ml RANKL もしくは 500 ng/ml OPG を追加した．

マウス全骨髄細胞（unfractionated bone marrow cells; UBMC）は Ovx もしくは Sham 手術後 2 週の時点でマウス大腿骨, 脛骨髄腔をフラッシュし, α-MEM で洗浄後, 0.727 % NH4Cl-0.017 % Tris-Cl (pH7.2)-PBS 溶液で赤血球を除去して採取した．UBMC は骨髄マクロファージと異なり，骨髄内の血球系，間葉系細胞全てを含む細胞群である．

UBMC を 10 %FBS, 50 μg/ml アスコルビン酸及び 20 nM 1,25-dihydroxyvitamin D3 含有α-MEM で培養し破骨細胞へと分化誘導した．

石灰化結節の形成

UBMC を 48-well plate に 10^6 個/ml の濃度で 10 % FBS, 50 μg/ml アスコルビン酸及び 10 mM β-glycerophosphate 含有α-MEM で 14 日間培養した．石灰化結節染色キット（コスモバイオ社製，東京，日本）を使用して染色し，評価した．

qPCR

PCR DNA Engine Opticon 2 System (MJ Research, Hercules, CA)を使用し，DyNAmo™ HS SYBR Green qPCR Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて DNA 合成の検出に用いた．使用したマウス Siglec-15, cathepsin K，integrinβ3，TRAP，CTR，DC-STAMP，および GAPDH のプライマーのシークエンスを Table 3.に示す． mRNA の発現量は全て GAPDH の発現量により標準化した.

Gene	Forward primers (5'-3')	Reverse primers (5'-3')	Amplicon (bp)	Accession number
Siglec-15	ACACCCCTCCACGGTCTC	CTCACAGCAAACACGTGGCA	95	NM_001101038
Cathepsin K	CAGAAGCAGTATAACAGCAAGGT	CCCAAATTAAACGCCGAGAGA	52	NM_007802
Integrin β3	TGACTCGGACTGGACTGGCTA	CACTCAGGCTCTTCCACCACA	414	NM_016780
TRAP	TCTTCAGGACGAGAACGGTG	CCTTTCGTTGATGTCGCACA	83	NM_007388
CTR	TGGCTGTGTTTACCGACGAG	CGAGTGATGGCGTGGATAAT	146	NM_007588
DC-STAMP	GCACAGAGATGTTCGGAACC	CTACATGGATGCAGCGTAGC	74	NM_029422
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA	95	NM_008084

Table. 4. qPCR に用いた Primer 配列一覧.

免疫染色

牛皮質骨切片上で培養した細胞を 4 %パラホルムアルデヒドを用いて室温で 5 分間固定し，0.1 %Triton X-100 で透過処理を行った．5 %BSA でブロッキングした後，抗マウス Siglec-15 ポリクローナル抗体 (1:500 dilution)を反応させ, 次いで Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体(1:500 dilution; Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA)を反応させた．細胞骨格の染色には Alexa Fluor 633 ファロイジン (1:40 dilution; Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA)を用い, 核染色には DAPI reagent (1:1000 dilution; 同仁化学研究所, 熊本，日本)を用いた．牛皮質骨切片はスライドガラスにマウントし，共焦点走査型レーザー顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)を用いて観察した.

統計分析

得られたデータは, 2 群間の検定には Student's T-test を, 3 群以上の検定には ANOVA を用いて有意差検定を行い，判定は P 値＜0.05 で有意差ありとした．データは mean ±SEM で表した.

実 験 結 果

Siglec-15$^{-/-}$マウスは卵巣摘出後の骨量減少に抵抗性を示す

WT 及び *Siglec-15*$^{-/-}$マウスそれぞれについて，Ovx および Sham 手術後 8 週時点で，マイクロ CT により脛骨と第 5 腰椎の骨微細構造を評価した (Fig. 16A,C)．WT, *Siglec-15*$^{-/-}$マウスいずれにおいても Ovx 後は Sham 手術と比較して骨量が減少していた．しかし，Sham と比較した際の減少率は脛骨では WT で-50.7 %，*Siglec-15*$^{-/-}$で-20.2 %，第 5 腰椎では WT で-27.4 %，*Siglec-15*$^{-/-}$で-12.1 %といずれも *Siglec-15*$^{-/-}$マウスで低い傾向にあった (Fig. 16B,D).

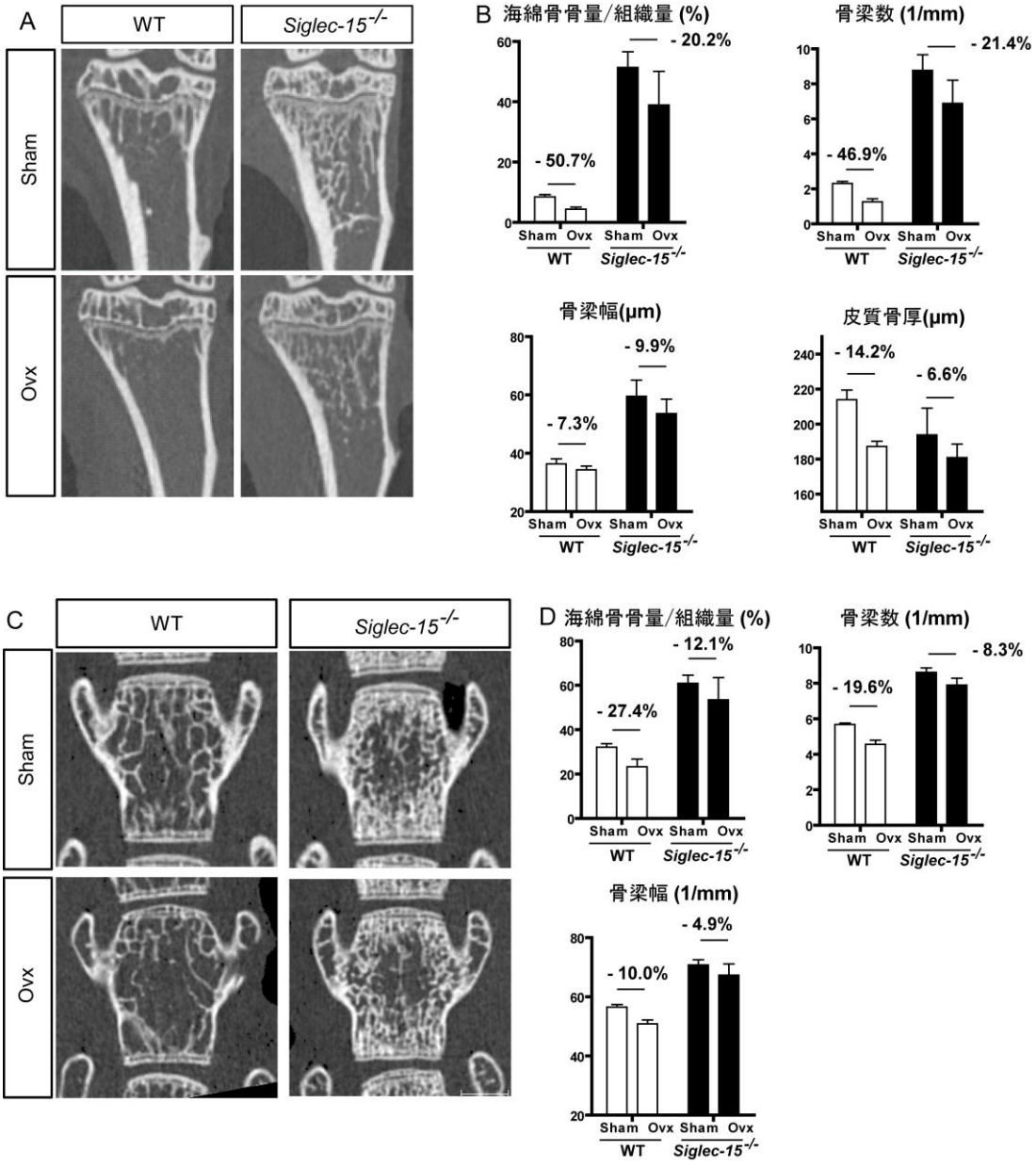

Fig. 16. *Siglec-15*$^{-/-}$マウスは卵巣摘出後の骨量減少に抵抗性を示す．A,C) Ovx または Sham 手術後 8 週時点での脛骨 (A)及び第 5 腰椎 (C)のマイクロ CT 画像を示す. B,D) 骨微細構造の解析結果を示す. *Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは骨量の減少が起こりにくい傾向があるが，統計学的には有意ではない．(Two-way ANOVA により検定．n =4. Data shown are mean ± SEM).

次に，Ovx が破骨細胞分化に与える影響を検証するために，Ovx および Sham 手術後 4 週時点で脛骨のパラフィン切片を作製し，TRAP 染色を行った．WT，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスいずれも Ovx 後には TRAP 陽性の破骨細胞数は増加したが，多核破骨細胞数は *Siglec-15*$^{-/-}$マウスで少ない傾向にあった．更に重要な事に，*Siglec-15*$^{-/-}$では Ovx 後にも二次海綿骨領域において小さな破骨細胞しか形成されず，機能的な成熟破骨細胞形成が障害されている事がわかった (Fig. 17A,B).

卵巣摘出後の破骨細胞分化能を検証するために，WT，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスそれぞれの大腿骨，脛骨から手術後 2 週時点で全骨髄細胞（UBMC）を採取し，破骨細胞へと分化誘導した．すると，WT では Ovx 後には Sham と比較して破骨細胞形成が促進し，より巨大な多核破骨細胞が多数形成されるようになったのに対し，*Siglec-15*$^{-/-}$では Ovx 後にも破骨細胞分化に有意な促進効果は見られなかった (Fig.17C).

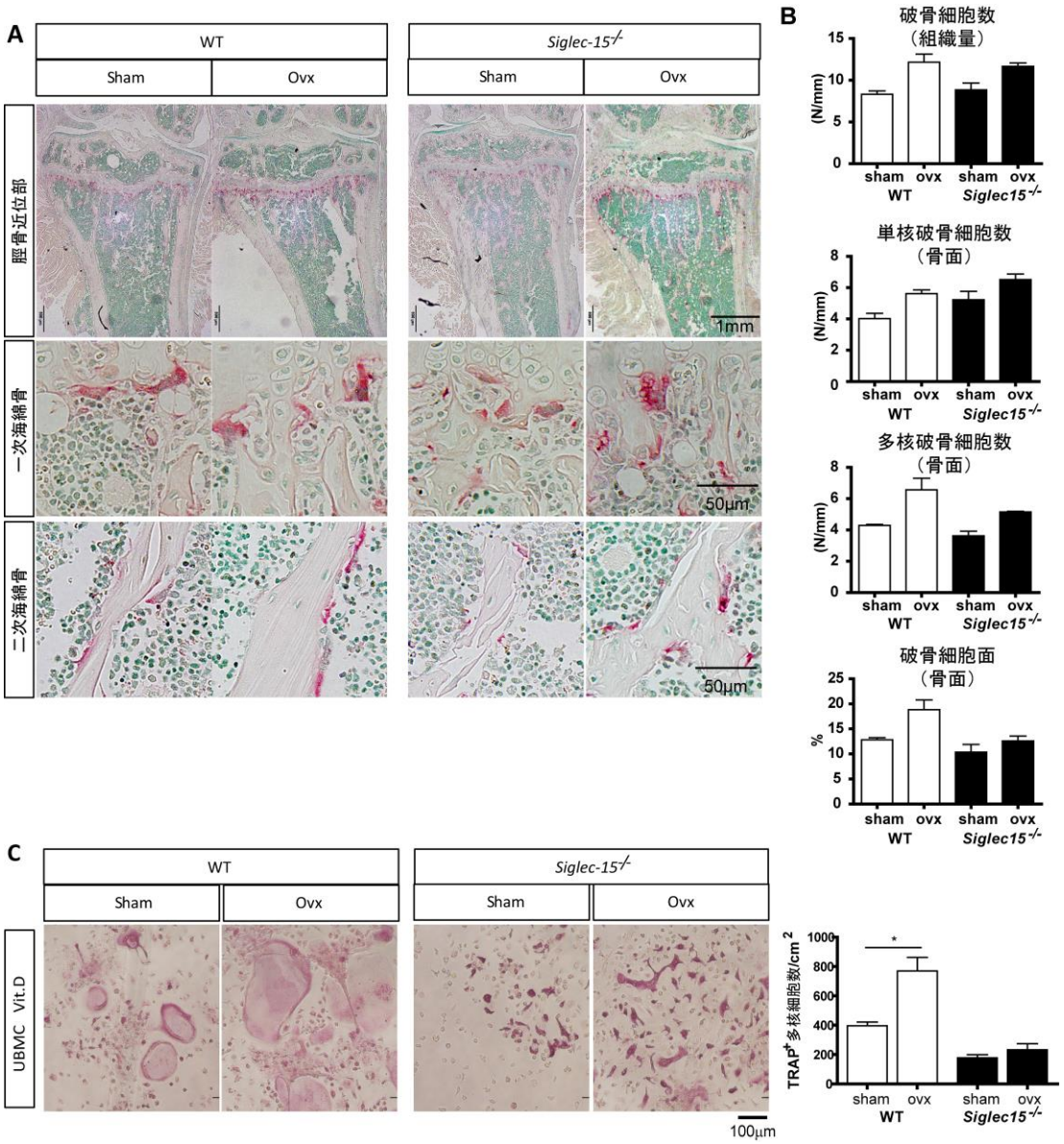

Fig. 17. *Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは，卵巣摘出後も機能的な多核破骨細胞の形成が障害される．A) 手術後 4 週で摘出した脛骨の組織切片を示す．上段は低倍率の画像を，中段及び下段はそれぞれ一次海綿骨及び二次海綿骨領域の高倍率画像である．WT，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスいずれも卵巣摘出後には破骨細胞が増加したが，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは多核破骨細胞数が少ない傾向にあった．*Siglec-15*$^{-/-}$でみられる破骨細胞は小さく，骨表面で広がる事ができない．B) 骨形態計測の結果を示す．多核破骨細胞数は *Siglec-15*$^{-/-}$マウスで少なく，形成された破骨細胞も小さい傾向にあるが，統計学的には有意な差ではない．(Two-way ANOVA により検定．n =4. Data shown are mean ± SEM)．C) マウス全骨髄細胞 (UBMC)を手術後 2 週で大腿骨及び脛骨髄腔からフラッシュし，20nM 1,25-dihydroxiviamin D3 の存在下で破骨細胞へと分化誘導した．(Two-way ANOVA により検定．n =3. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$)

Siglec-15 は TNFαによる破骨細胞分化に必要である

次に，我々は Siglec-15 が閉経後骨粗鬆症の key molecule である TNFαによる破骨細胞分化に関わるかを検証した．WT 及び *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージを M-CSF 及び TNFα存在下に培養し，破骨細胞へと分化誘導すると，WT では大きく広がる成熟多核破骨細胞が誘導されたが，*Siglec-15*$^{-/-}$では単核の細胞が多く，わずかに形成された多核細胞も小さくいびつな形態を示していた．生体内では，閉経後には多量の RANKL と TNFαが存在すると考えられるため，生体内を想定し，RANKL と TNFαの両者の存在下で培養しても，同様に *Siglec-15*$^{-/-}$では成熟多核破骨細胞は形成されなかった (Fig. 18A).

我々の培養系では骨髄マクロファージ以外にも少量の間葉系細胞のコンタミネーションが存在し, それによる微量な RANKL の分泌が存在する可能性があった. そこで, Siglec-15 が RANKL ではなく，純粋な TNFαによる分化系において重要である事を証明するために，RANKL のデコイレセプターである osteoprotegrin（OPG）を追加して RANKL の影響を排除した状態で，TNFαによる破骨細胞分化を検証した．すると，OPG 添加の有無によらず，WT では多核破骨細胞が形成され，*Siglec-15*$^{-/-}$では多核破骨細胞の形成が障害されていた(Fig.19)．すなわち，Siglec-15 は確かに TNFαによる破骨細胞分化系で重要な役割を果たす事が示された.

破骨細胞を牛皮質骨切片上で M-CSF 及び TNFαの存在下に 10 日間培養し，骨吸収窩を染色, 範囲を測定した. すると WT では 29.9 %±4.2 %, *Siglec-15*$^{-/-}$では 4.0 %±1.2 %と，*Siglec-15*$^{-/-}$で有意な骨吸収能の低下を認めた．更に，TNFαと RANKL 両者の存在下で培養すると, 骨吸収窩は増加したが, WT では 52.4 %±4.1 %, *Siglec-15*$^{-/-}$では 9.2 %±2.5 %と有意に低いままであった(Fig. 18B).

また，破骨細胞の分化マーカーである TRAP，Cathepsin K，CTR，Intgtin beta3，DC Stamp の mRNA 発現を TNFαによる刺激前 (骨髄マクロファージ)，刺激後 3 日 (前破骨細胞)，刺激後 5 日(破骨細胞)のそれぞれにおいて qPCR で確認すると，Siglec-15$^{-/-}$破骨細胞ではいずれの分化マーカーも低値を示した (Fig. 18C).

次に，破骨細胞の細胞骨格を検証するために，牛皮質骨切片上で TNFαにより破骨細胞へと分化させ，F-アクチンの染色を行った．予想された通り，WT ではアクチンリングが形成されたが，*Siglec-15*$^{-/-}$ではアクチンリングが形成されず，Siglec-15 は破骨細胞の細胞骨格形成に重要な分子である事が明らかとなった．この結果は TNFαと RANKL 両者が存在する状態でも同様であった (Fig. 20).

これらの結果から，Siglec-15 は TNFαによる機能的な多核破骨細胞分化に必要であり，閉経後のように TNFαと RANKL の両者が破骨細胞分化を誘導している状態においても Siglec-15 を阻害する事によって破骨細胞分化を抑制できる事が明らかとなった.

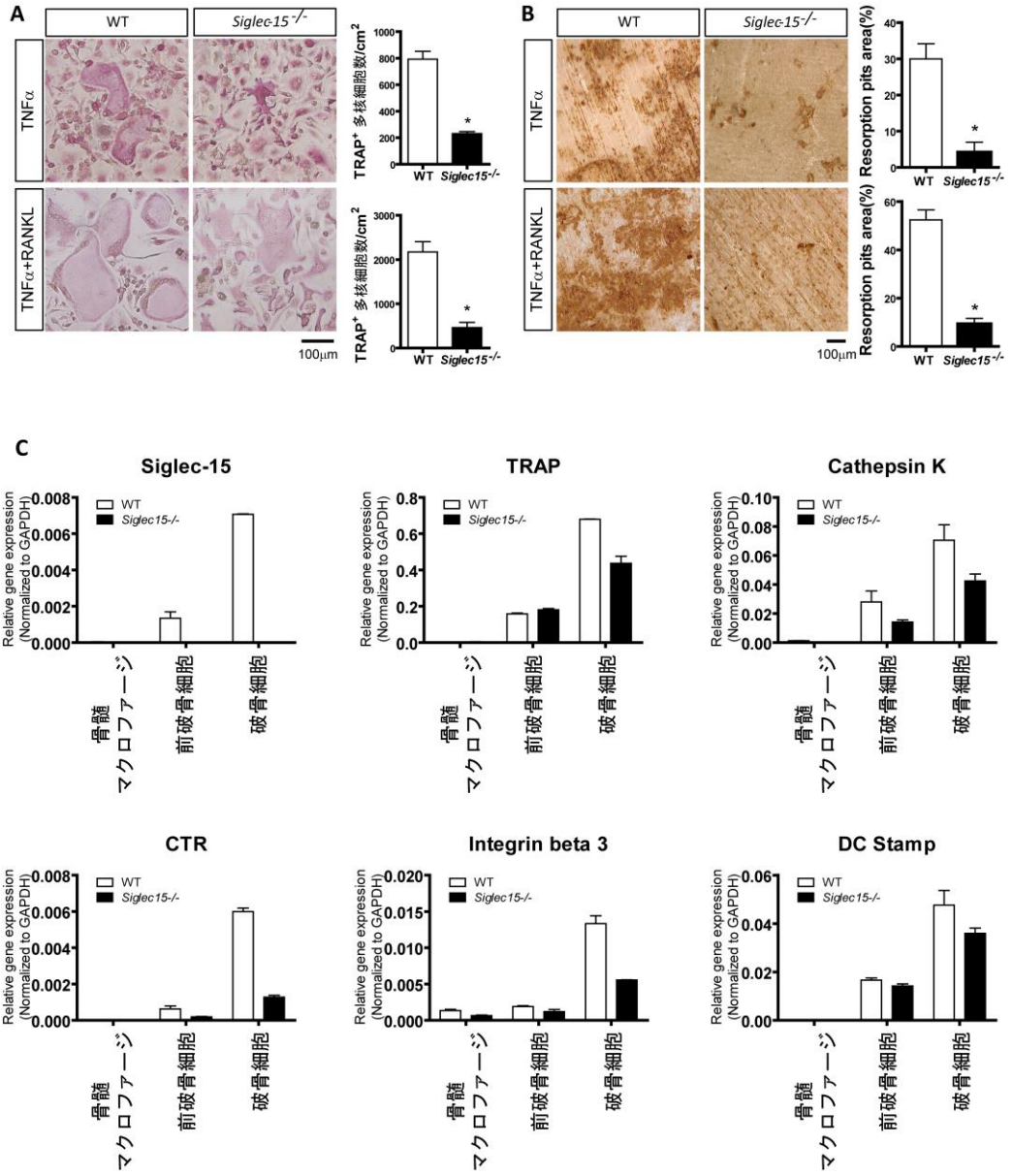

Fig. 18. Siglec-15 はTNFαによる破骨細胞分化に必要. A) 骨髄マクロファージを M-CSF (30 ng/ml)及び TNF-α (100 ng/ml)の存在下に 5 日間培養し, 破骨細胞へと分化させた. RANKL (100 ng/ml)を追加すると, 破骨細胞分化は更に促進するが, *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージからは正常な多核破骨細胞は分化しない. (n =4. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$). B) 牛皮質骨切片上で破骨細胞を 10 日間培養し, 骨吸収窩を染色した (brown areas). *Siglec-15*$^{-/-}$では骨吸収能が低下している. (n =6. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$). C) 破骨細胞分化マーカーを qPCR で測定した.

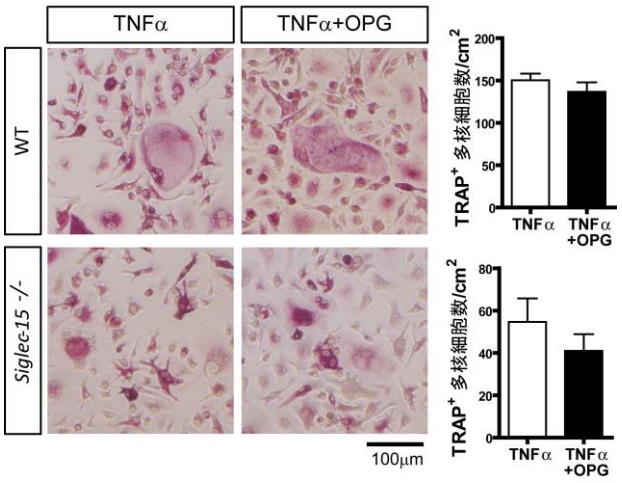

Fig. 19. Siglec-15 は TNFαによる破骨細胞分化に必要．骨髄マクロファージを M-CSF (30 ng/ml)，TNF-α (100 ng/ml)及び osteoprotegrin (OPG)の存在下に 5 日間培養し，破骨細胞へと分化させた．OPG を加えても破骨細胞の分化に変化は見られない．(n =4. Data shown are mean ± SEM).

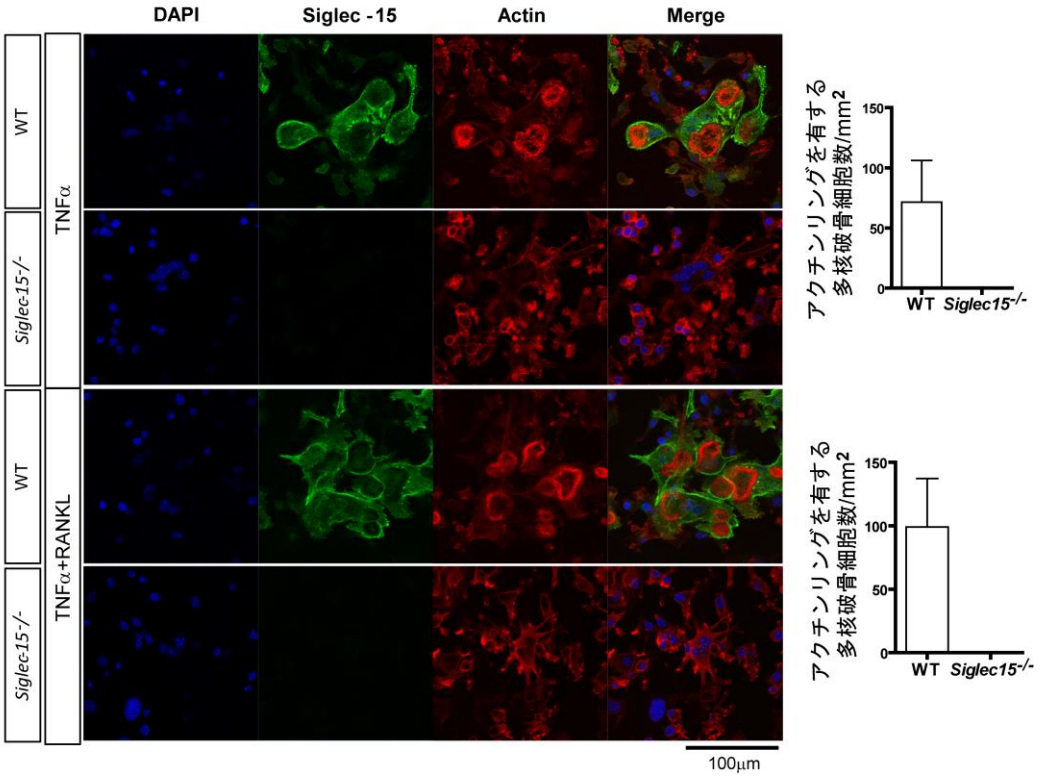

Fig. 20. *Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞は正常な細胞骨格を形成できない．牛皮質骨切片上で破骨細胞を培養し，抗 Siglec-15 抗体，Alexa Fluor 633 ファロイジン，DAPI による免疫染色を行った．TNFαにより分化した *Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞はアクチンリングを形成できない．TNFα及び RANKL の両者が存在しても *Siglec-15*$^{-/-}$ 破骨細胞はアクチンリングを形成できない．

OSCAR/FcRγシグナルは *Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞の多核化を誘導するが，正常な細胞骨格形成を回復させる事はできない

TNFαによる破骨細胞分化系において，OSCAR/FcRγシグナルの果たす役割を検証した．前述の通り，type II collagen は OSCAR/FcR γ シグナルを賦活化する事が知られているため，我々は WT 及び Siglec-15$^{-/-}$骨髄マクロファージを type II collagen をコートしたディッシュで TNFαにより破骨細胞へと分化誘導した．すると，Siglec-15$^{-/-}$においても多数の多核破骨細胞が形成されるようになったが，その形態はいびつなままであった．更に RANKL を添加しても，その所見は同様であった (Fig. 21A).

Type II collagen をコートした牛皮質骨切片上で培養し，F-アクチンを染色する事によって細胞骨格を検証した．*Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞は type II collagen によって多核化が回復するものの，アクチンリングを形成する事はできなかった．しかし，培養系に RANKL を追加すると，アクチンリングの形成も回復した (Fig. 21B). すなわち，TNFα単独による分化系においては，OSCAR/FcR シグナルの賦活化により *Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞の多核化は回復するが，細胞骨格の異常はそのままであり，OSCAR/FcRγシグナルに加えて RANKL と骨基質が存在すると，*Siglec-15*$^{-/-}$でも正常な細胞骨格を有する多核破骨細胞が形成されるようになる事がわかった.

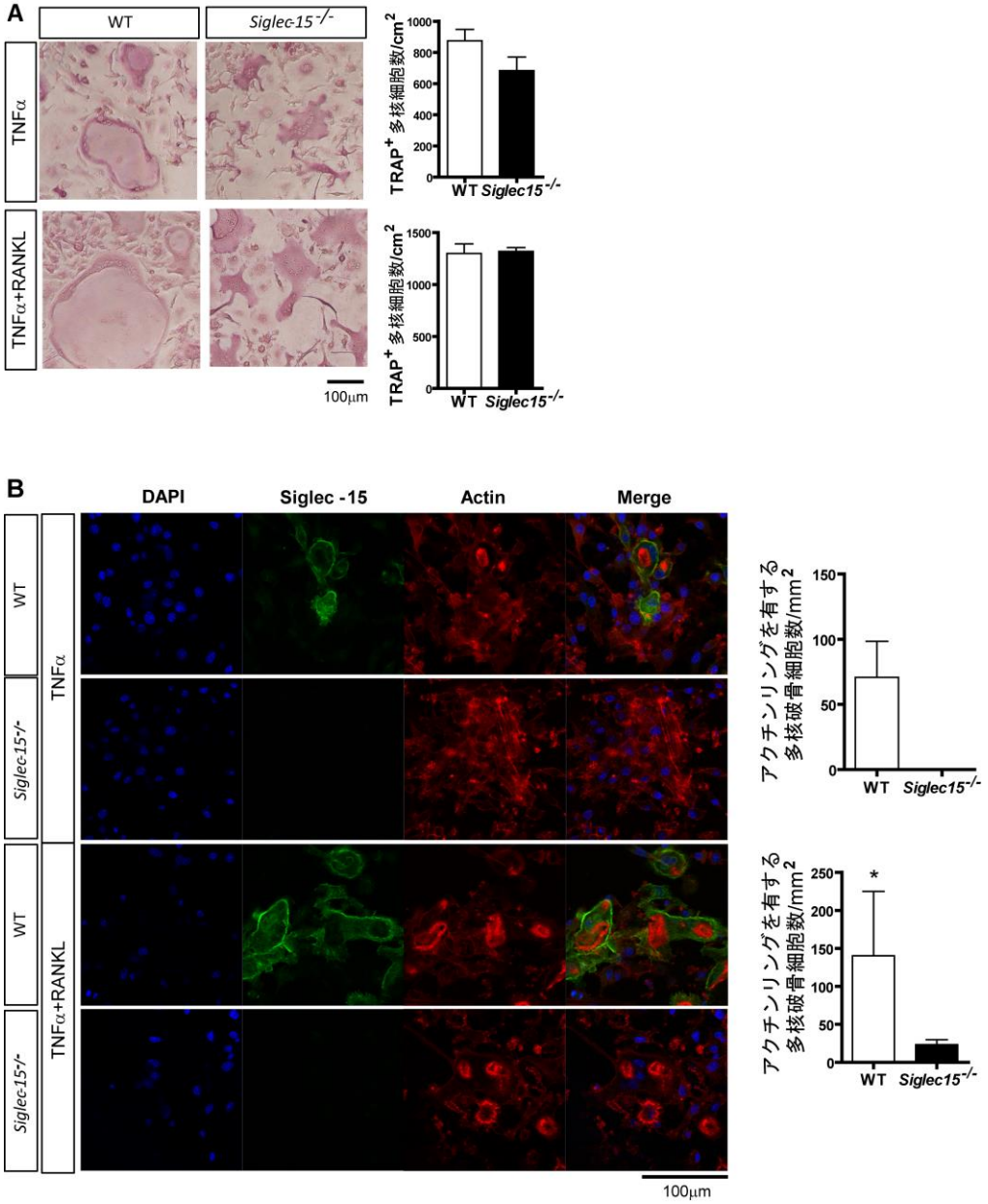

Fig. 21. OSCAR/FcRγシグナルの活性化により TNFαにより誘導された *Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞は多核化するが，正常な細胞骨格形成は回復しない. A) Type II collagen をコートしたディッシュ上でTNFα, もしくはTNFα及び RANKL の存在下で破骨細胞を分化誘導した. (n =4. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$). B) Type II collagen をコートした牛皮質骨切片上で TNFαにより破骨細胞を分化誘導し，抗 Siglec-15 抗体，Alexa Fluor 633 ファロイジン，DAPI による免疫染色を行った．*Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージからも多数の多核破骨細胞が分化するが，アクチンリングは形成できない．しかし，RANKL の追加により *Siglec-15*$^{-/-}$破骨細胞でもアクチンリングが形成される．(n =3. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$).

Siglec-15 は DAP12 を介して TNFαによる破骨細胞分化を制御する

RANKL による破骨細胞分化系においては，Siglec-15 が機能するにはシアル酸の結合と，DAP12 の会合の両者が必須であった．TNFαによる破骨細胞分化系でも同様の所見が得られるかを調査した．

Siglec-15$^{-/-}$骨髄マクロファージにレトロウイルスを用いて WT-Siglec-15 を導入すると，TNFαによる破骨細胞分化が回復したが，シアル酸との結合能を失活させた R143A mutant や，DAP12 との会合能を失活させた K273A mutant では破骨細胞分化が障害されたままであった(Fig. 22A)．すなわち TNFαによる破骨細胞分化においても Siglec-15 が必要であり，かつ Siglec-15 が機能するためにはシアル酸の結合と DAP12 との会合の両者が必要である事がわかった．これは，TNFαに RANKL を追加して培養した場合も同様であった (Fig. 22B).

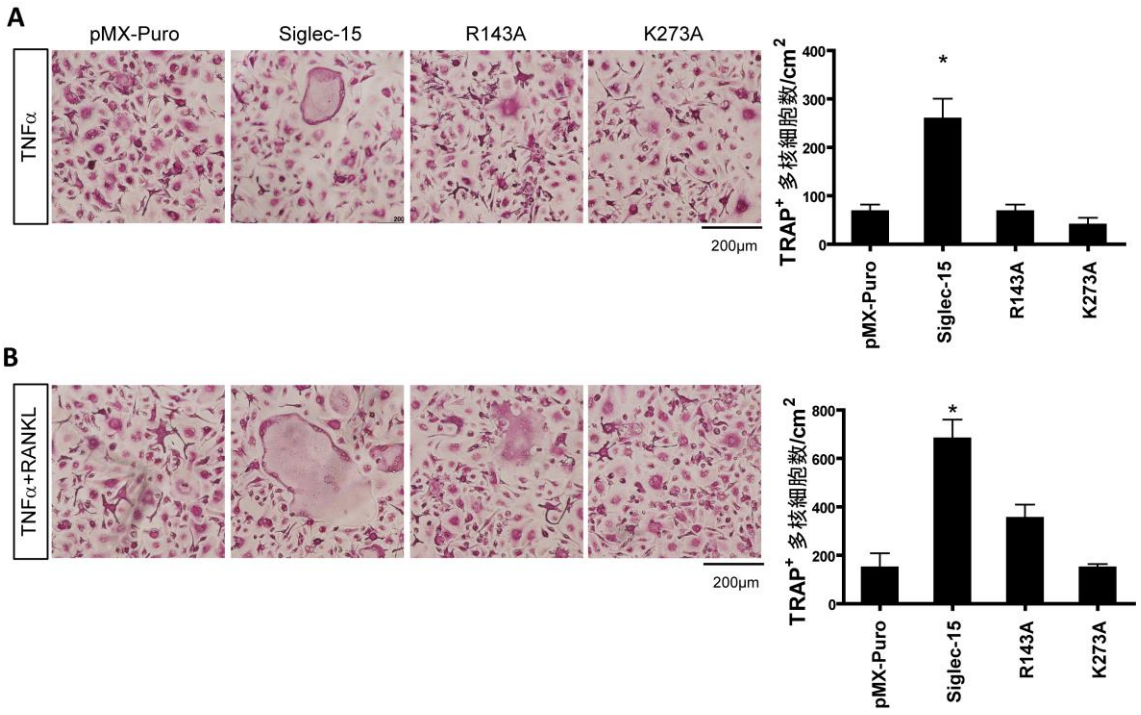

Fig. 22. Siglec-15 の機能には DAP12 との会合及びシアル酸との結合の両者が必須である．A) *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージにレトロウイルスを用いて野生型もしくは変異型の Siglec-15 を導入し，TNFαにより破骨細胞へと分化誘導した．野生型 Siglec-15 の導入により，破骨細胞分化は回復した．一方で R143A, K273A mutant では破骨細胞分化は回復しなかった．(One-way ANOVA により検定．n =3. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$). B) TNFα及び RANKL 両者の存在下でも同様の結果であった．(One-Way ANOVA により検定．n =3. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$).

Siglec-15$^{-/-}$前破骨細胞では TNFαシグナルは正常に伝達される

Siglec-15 が TNFαによる破骨細胞分化を制御するメカニズムを明らかとするため，TNFαにより活性化される細胞内シグナル伝達経路を WT と *Siglec-15*$^{-/-}$前破骨細胞を用いて検証した．しかし，予想に反して TNFα刺激後の Erk，PI3K，Akt，IKβα，JNK，p38 の活性化に差は見られなかった (Fig. 23).

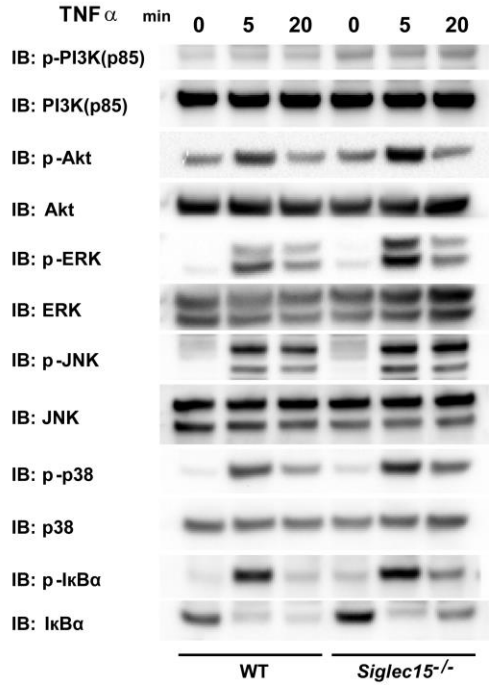

Fig. 23. Siglec-15 は既知の TNFαシグナルに関与しない．前破骨細胞に 1 時間血清飢餓をかけ，100 ng/ml TNFαで刺激した．PI3K，Akt，Erk，JNK，p38，Iκβαのリン酸化をイムノブロット法で検証した.

Siglec-15 は骨芽細胞の機能には関与しない

閉経後の骨形成の亢進に対して Siglec-15 がどのように作用するかを調査するため，WT と *Siglec-15*$^{-/-}$マウスをそれぞれ Ovx，Sham 手術後 2 週でカルセインによる 2 重骨標識の後に屠殺，脛骨非脱灰組織標本を作製，観察した．Sham 群においては，骨石灰化速度 (MAR)及び骨形成速度/骨面 (BFR/B.Pm)はいずれも *Siglec-15*$^{-/-}$マウスで WT と比較して有意に低下していた．Ovx 群では，WT，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスいずれも Sham 群と比較すると MAR，BFR/B.Pm ともに増加傾向を示したが，有意な変化ではなく，Siglec-15$^{-/-}$マウスでは WT と比較すると有意に低値のままであった (Fig. 24A)．すなわち，Ovx 後に *Siglec-15*$^{-/-}$マウスの骨量が保たれる理由は，破骨細胞の機能低下によるものであり，骨芽細胞の機能亢進によるものではないという事が示された.

前述したとおり，WT と *Siglec-15*$^{-/-}$骨芽細胞の骨形成能には差が無いが，エストロゲ

ン欠乏状態においても同様であるかを検証するために，手術後 2 週時点で WT と *Siglec-15*$^{-/-}$マウス骨髄をフラッシュし，UBMC を採取した．この UBMC を 50 μg/ml アスコルビン酸および 10 mM β-glycerophosphate の存在下に 14 日間培養し，石灰化結節の形成を比較したところ，WT，*Siglec-15*$^{-/-}$の骨形成能に差は無かった．また，Sham 群と Ovx 群の間にも差は見られなかった (Fig. 24B).

また，骨芽細胞は RANKL や OPG を分泌する事により破骨細胞分化を制御しているため，これらの mRNA 発現についても WT と *Siglec-15*$^{-/-}$で差が無いか，確認した．予想通り, RANKL, OPG の発現は WT と *Siglec-15*$^{-/-}$で差が無かった (Fig. 24C). 更に，WT の骨髄マクロファージを WT，もしくは *Siglec-15*$^{-/-}$の骨芽細胞と共培養し，破骨細胞の分化能を検証すると，破骨細胞の分化能に差は見られなかった (Fig. 24D). すなわち，WT と *Siglec-15*$^{-/-}$の骨芽細胞は骨形成能，破骨細胞の分化誘導能いずれにおいても差は無く，Siglec-15 は骨芽細胞の機能には関与しない事が示された.

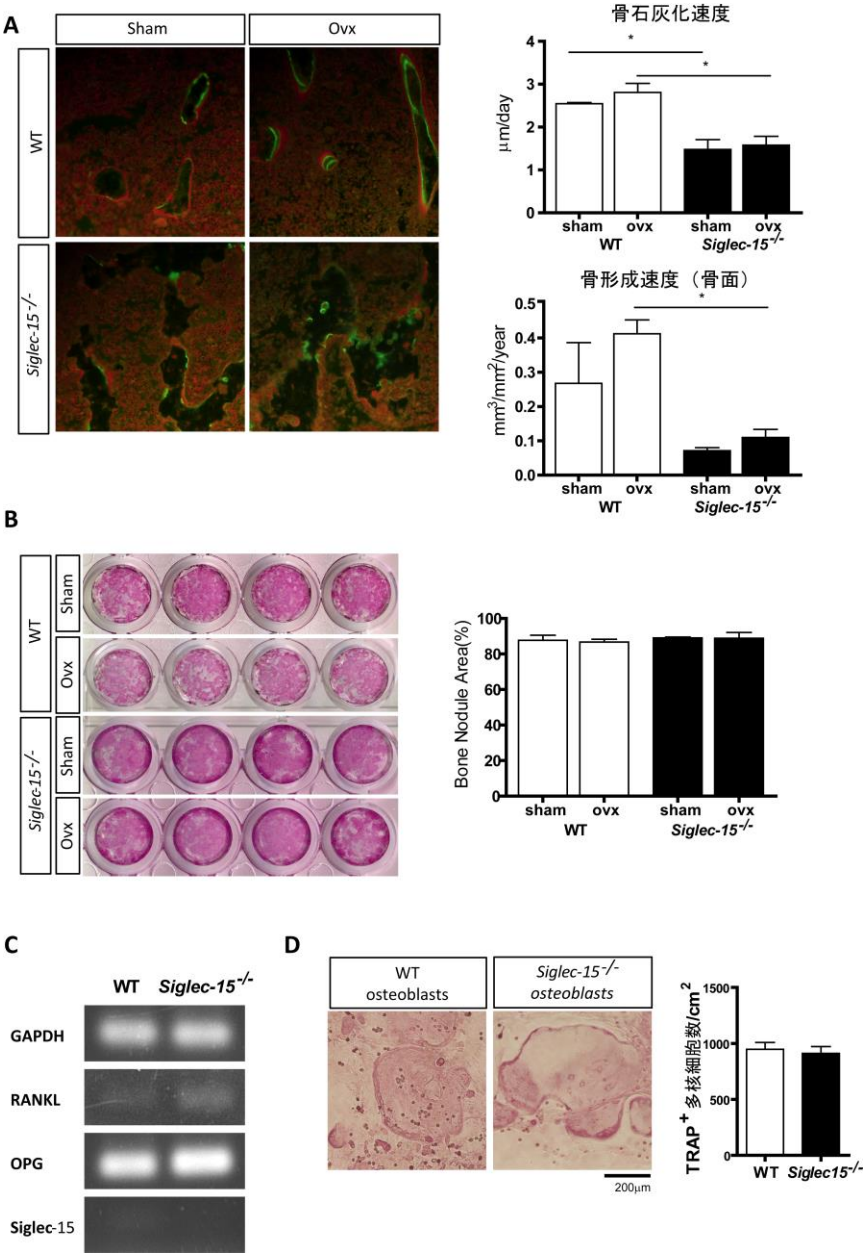

Fig. 24. Siglec-15 は骨芽細胞機能に関与しない．A) Ovx もしくは Sham 手術後 2 週で WT 及び *Siglec-15*$^{-/-}$ マウスより脛骨を採取し，Villaneuva Bone 染色を行った．屠殺する 5 日前及び 2 日前にカルセイン (20 mg/kg)をそれぞれ皮下投与し，骨標識を行った．二次海綿骨領域で骨石灰化速度，骨形成速度/骨面を測定した．(Two-Way ANOVA により検定．n =3. Data shown are mean ± SEM. * = $P < 0.05$)．B) Ovx，もしくは Sham 手術後 2 週で全骨髄細胞 (UBMC)を採取し，50μg/ml アスコルビン酸，10 mM β-glecerophosphate の存在下に 14 日間培養し，石灰化結節を染色した．WT と *Siglec-15*$^{-/-}$ 骨芽細胞の骨形成能に差は無い．(Two-Way ANOVA により検定．n =4. Data shown are mean ± SEM)．C) WT と *Siglec-15*$^{-/-}$新生児マウスの頭蓋骨より骨芽細胞を採取し，骨芽細胞分化培地にて 14 日間培養した後，mRNA を抽出し，PCR で RANKL，OPG，Siglec-15 の遺伝子発現を検証した．D) WT 骨髄マクロファージを WT もしくは *Siglec-15*$^{-/-}$ 骨芽細胞と共培養し，破骨細胞を誘導した．WT，*Siglec-15*$^{-/-}$骨芽細胞は同等の破骨細胞分化誘導能を持つ．(n =4. Data shown are mean ± SEM).

考 察

本章の結果から，Siglec-15 が生理的環境下での骨代謝制御のみならず，閉経後の骨量減少にも関わっている事が明らかとなった．エストロゲン欠乏により *Siglec-15*$^{-/-}$マウスにおいても破骨細胞数は増加したが，機能的な多核破骨細胞への分化が障害されており，卵巣摘出後の骨量減少に抵抗性を示した．この事は，Siglec-15 をターゲットとした治療が閉経後骨粗鬆症の予防，治療に有効である事を示唆している．

閉経後の骨量減少には T 細胞から分泌される TNFαの分泌亢進が重要な役割を果たすとされる[45,55]．TNFαは強力な破骨細胞誘導能を持つ事で知られており，我々は Siglec-15 が TNFαによる破骨細胞誘導に関与するかを調査した．*Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージは TNFαの存在下でも機能的な多核破骨細胞に分化する事ができず，Siglec-15 が TNFαによる破骨細胞分化系において重要な役割を果たす事が示唆された．しかし，予想に反して TNFαによる細胞内シグナル伝達経路は *Siglec-15*$^{-/-}$前破骨細胞においても正常に伝達されていた．Siglec-15 がどのように TNFαによる破骨細胞分化を制御しているか，詳細なメカニズムは不明であるが，TNFαには本研究で検討していない未知のシグナル伝達経路が存在する可能性，もしくは Stglec-15 が TNFαシグナルとは別個に細胞融合や骨格形成を制御している可能性を考えている．

レトロウイルスを用いた実験系から，Siglec-15 は DAP12 を介して破骨細胞分化を制御していると考えられる．これを裏付けるように，DAP12 ノックアウトマウスは *Siglec-15*$^{-/-}$マウスと同様に破骨細胞の機能不全による軽度の大理石骨病を呈するが[13,15]，興味深い事に卵巣摘出後の反応は異なっている．*Siglec-15*$^{-/-}$マウスと異なり，DAP12 ノックアウトマウスは卵巣摘出後には WT と同等に，もしくはそれ以上に骨量が減少する事が報告されている[56,57]．この相違がどういった理由から来るものかは明らかではないが，我々は以下のように推測している．DAP12 は細胞内に興奮性シグナルを伝達する分子であると考えられてきたが，実は抑制性のシグナルも伝達する分子である事が近年明らかとなっている[58,59]．DAP12 がこの興奮性シグナルと抑制性のシグナルをどのように切り替えるのか，詳細なメカニズムは明らかとなっていないが， DAP12 と会合する免疫受容体群がその調節を担っていると考えられている[58]．例えば，TREM-2 は DAP12 を介して抑制性のシグナルを伝達すると言われており[60,61]，Siglec-15 が欠損し TREM-2 等の他の免疫受容体群が残存した状態では，破骨細胞に対しては抑制性のシグナルが優位となった状態が持続し，卵巣摘出後にも過剰な破骨細胞分化が起こらないのかもしれない．

本研究の結果からは，Siglec-15 は RANKL のみならず，TNFαによる破骨細胞誘導にも重要であり，Siglec15 の阻害によって閉経後の骨量減少を予防できる可能性が示された.

研 究 全 体 の 考 察

本研究により，Siglec-15 が DAP12 を介して RANKL シグナルを調節する事により破骨細胞分化を制御する新しい分子である事が明らかとなった．また，非常に興味深い事には，Siglec-15 の機能は type II コラーゲン及び骨基質が存在する一次海綿骨領域においては完全に代償され，Siglec-15 は生体内では二次海綿骨領域における破骨細胞分化を特異的に制御する分子である事が明らかとなった．

この事実は，Siglec-15 の治療への応用を考える上で大きな意味を持つ．すなわち，Siglec-15 の阻害により，二次海綿骨領域においては骨量の増加が見込めるが，一次海綿骨領域においてはそれほど影響がないと考えられること，さらには関節内のように軟骨が存在する領域における骨破壊に対しては治療効果が薄いと考えられることである．これらについては今後さらなる検討と研究の発展が望まれる．

DAP12 を介した破骨細胞分化制御については未だ未解明の部分も多く残されているが，DAP12 と会合する他の免疫受容体の役割が興味深い．TREM-2 欠損マウスが骨粗鬆症を示し[36]，MDL-1 欠損マウスは関節リウマチにおける炎症性骨破壊，関節破壊に抵抗性を示すなど[26]，各々の受容体は DAP12 を介して作用するものの，それぞれ異なる機構を介して免疫系細胞の機能や破骨細胞分化を調節しているものと考えられる．すなわち，各種免疫受容体の機能を明らかとしていく事により，疾患特異的に免疫系細胞，破骨細胞機能の調節が可能となる事が予想され，副作用の少ない治療法の開発が期待される．

閉経後骨粗鬆症をターゲットとした研究の結果，Siglec-15 の阻害は骨量の減少を抑制できる可能性が示された．その詳細なメカニズムを明らかとする事はできなかったが，Siglec-15 は RANKL シグナルのみならず TNFαを介した破骨細胞分化も制御していると考えられる．TNFαは強力な破骨細胞分化誘導能を持つ炎症性サイトカインであり，関節リウマチを始めとした多くの炎症性骨破壊で主要な役割を果たす[54]．すなわち，Siglec-15 をターゲットとした治療は多くの病的な骨破壊に対して有効である可能性がある．

近年，他の研究グループによって抗 Siglec-15 抗体が作製され，マウスにおける骨量増加作用が明らかとなった[29,62]．興味深い事に，抗 Siglec-15 抗体を投与されたマウスでは破骨細胞の機能は抑制されたが，骨芽細胞の機能は逆に亢進し，非常に効果的に骨量の増加効果が得られた[62]．Siglec-15 を標的とした治療薬は，現行の治療薬の中ではビスフォスフォネートやデノスマブなどと並ぶ骨吸収抑制薬の一つとしての位置づけになると考えられる．しかしこれらの骨吸収抑制薬は，破骨細胞と骨芽細胞のカップリングにより骨形成も同時に抑えてしまう事から，時に過剰な骨リモデリングの抑制をもたらし，大腿骨の非定型骨折や顎骨壊死などの問題をはらむ．また，骨折例に

おいては骨治癒を阻害しうるとの懸念もある．しかし，抗 Siglec-15 抗体では骨形成を阻害しない事から，現行の骨吸収抑制薬で見られるこれらの問題を生じずに骨量の増加が得られる可能性がある．

今後の研究としては，転移性骨腫瘍や関節リウマチ，感染，骨折治癒における Siglec-15 の役割の検証が望まれる．転移性骨腫瘍においては，乳癌を始めとする多くの腺癌細胞において，Siglec-15 のリガンドの一つである Sialyl Tn を発現している癌は予後不良であり腫瘍の増殖性が上がることが報告されており [63-65]，興味深い．また，関節リウマチの滑膜では DAP12，FcRγが高発現しており，関節リウマチで起こる関節の炎症や破壊とこれら ITAM アダプター分子の関連も示唆されている [66]．Siglec-15 をターゲットとした治療がどういった疾患に応用可能か，今後のさらなる研究発展が期待される．

総括および結論

- 我々は，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスを用いた解析により，Siglec-15 による破骨細胞分化制御機構を明らかにした.

- *Siglec-15*$^{-/-}$マウスは破骨細胞の分化, 機能不全により軽度の大理石骨病を呈したが, 一次海綿骨領域においては WT 同様に多核化した巨大な破骨細胞がみられた.

- *In vitro* 試験において, *Siglec-15*$^{-/-}$細胞は, 多核破骨細胞への分化が障害されており, 正常な細胞骨格を形成する事ができず，骨吸収能が低下していた.

- Siglec-15 の機能には，シアル酸の結合と DAP12 との会合の両者が必須である.

- Siglec-15 は DAP12 を介して，RANKL シグナル下流の PI3K/Akt 及び Erk のリン酸化を促し，破骨細胞分化と細胞骨格形成を制御していた.

- Siglec-15 の機能は type II collagen により活性化される FcRγシグナルと骨基質の両者の存在下では完全に代償された．すなわち，Siglec-15 は生体内では二次海綿骨領域での破骨細胞分化に重要な役割を果たす.

- 我々は，マウス卵巣摘出モデルを用いて，Siglec-15 が閉経後骨粗鬆症の治療ターゲットとなり得る事を示した.

- *Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは卵巣摘出後の骨量減少が抑制された.

- *Siglec-15*$^{-/-}$骨髄マクロファージでは，TNFαによる破骨細胞分化が障害されていた.

本研究結果は Siglec-15 による破骨細胞分化制御機構を明らかとし, 閉経後骨粗鬆症における役割について検証したものである．本研究をさらに発展させるためには，転移性骨腫瘍や関節リウマチ等, 他の病的骨破壊モデルにおける Siglec-15 の役割を検証していくとともに，Siglec-15 のリガンドを明らかとし，本研究では解明しきれなかった Siglec-15 の機能を明らかとしていく事が望まれる.

謝辞

本論文は，筆者が北海道大学大学院医学研究科　医学専攻　機能再生医学講座　整形外科学分野博士課程在学中に行った研究をまとめたものです．本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました整形外科学分野教授　岩崎倫政先生，名誉教授　三浪明男先生に心より感謝いたします．

本研究を行うにあたり，貴重な抗体のご提供並びに実験に関するご助言を頂きました Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica の安形高志先生，共焦点顕微鏡を用いた詳細な画像解析方法についてご指導を頂きました北海道大学大学院先端生命科学研究院細胞機能科学研究室の金城政孝教授，三國新太郎特任助教，レトロウイルスベクターへのクローニング及び細胞への遺伝子導入を教えて頂きました北海道大学大学院医学研究科生化学講座医化学分野の畠山鎮次教授，貴重な牛皮質骨切片のご提供を頂きました北海道立総合研究機構 工業試験場 高分子・セラミックス材料グループの赤澤俊之先生に深い感謝の意を表します．

これまでの研究課程において数々のご指導を賜りました北海道大学医学部機能再生医学講座整形外科学分野講師の高畑雅彦先生をはじめ，整形外科学分野の諸先生方，研究にご助力頂きました皆様に心よりの感謝を申し上げます．

引 用 文 献

1 Tang, Y. *et al.* TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat. Med.* 15, 757-765 (2009).

2 Xian, L. *et al.* Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells. *Nat. Med.* 18, 1095-1101 (2012).

3 Negishi-Koga, T. *et al.* Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nat. Med.* 17, 1473-1480 (2011).

4 Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-342 (2003).

5 Zhao, R. Immune regulation of osteoclast function in postmenopausal osteoporosis: a critical interdisciplinary perspective. *Int. J. Med. Sci.* 9, 825-832 (2012).

6 Fili, S., Karalaki, M. & Schaller, B. Mechanism of bone metastasis: the role of osteoprotegerin and of the host-tissue microenvironment-related survival factors. *Cancer Lett.* 283, 10-19 (2009).

7 Redlich, K. & Smolen, J. S. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 234-250 (2012).

8 Rachner, T. D., Khosla, S. & Hofbauer, L. C. Osteoporosis: now and the future. *Lancet* 377, 1276-1287 (2011).

9 Kong, Y. Y. *et al.* OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315-323 (1999).

10 Dougall, W. C. *et al.* RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* 13, 2412-2424 (1999).

11 Lomaga, M. A. *et al.* TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.* 13, 1015-1024 (1999).

12 Takayanagi, H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J. Mol. Med.* 83, 170-179 (2005).

13 Koga, T. *et al.* Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 428, 758-763 (2004).

14 Humphrey, M. B. *et al.* TREM2, a DAP12-associated receptor, regulates osteoclast differentiation and function. *J. Bone Miner. Res.* 21, 237-245 (2006).

15 Kaifu, T. *et al.* Osteopetrosis and thalamic hypomyelinosis with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 111, 323-332 (2003).

16 Mocsai, A. *et al.* The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 6158-6163 (2004).

17 Humphrey, M. B. *et al.* The signaling adapter protein DAP12 regulates multinucleation during osteoclast development. *J. Bone Miner. Res.* 19, 224-234 (2004).

18 Zou, W., Reeve, J. L., Liu, Y., Teitelbaum, S. L. & Ross, F. P. DAP12 couples c-Fms activation to the osteoclast cytoskeleton by recruitment of Syk. *Mol. Cell.* 31, 422-431 (2008).

19 Zou, W. *et al.* Cytoskeletal dysfunction dominates in DAP12-deficient osteoclasts. *J. Cell Sci.* 123, 2955-2963 (2010).

20 Novack, D. V. & Faccio, R. Osteoclast motility: putting the brakes on bone resorption. *Ageing Res. Rev.* 10, 54-61 (2011).

21 Kim, N., Takami, M., Rho, J., Josien, R. & Choi, Y. A novel member of the leukocyte receptor complex regulates osteoclast differentiation. *J. Exp. Med.* 195, 201-209 (2002).

22 Ochi, S. *et al.* Pathological role of osteoclast costimulation in arthritis-induced bone loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104, 11394-11399 (2007).

23 Dietrich, J., Cella, M., Seiffert, M., Buhring, H. J. & Colonna, M. Cutting edge: signal-regulatory protein beta 1 is a DAP12-associated activating receptor expressed in myeloid cells. *J. Immunol.* 164, 9-12 (2000).

24 Inui, M. *et al.* Signal adaptor DAP10 associates with MDL-1 and triggers osteoclastogenesis in cooperation with DAP12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106, 4816-4821 (2009).

25 Bakker, A. B., Baker, E., Sutherland, G. R., Phillips, J. H. & Lanier, L. L. Myeloid DAP12-associating lectin (MDL)-1 is a cell surface receptor involved in the activation of myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 9792-9796 (1999).

26 Joyce-Shaikh, B. *et al.* Myeloid DAP12-associating lectin (MDL)-1 regulates synovial inflammation and bone erosion associated with autoimmune arthritis. *J. Exp. Med.* 207, 579-589 (2010).

27 Angata, T., Tabuchi, Y., Nakamura, K. & Nakamura, M. Siglec-15: an immune system Siglec conserved throughout vertebrate evolution. *Glycobiology* 17, 838-846 (2007).

28 Crocker, P. R., Paulson, J. C. & Varki, A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 255-266 (2007).

29 Hiruma, Y., Hirai, T. & Tsuda, E. Siglec-15, a member of the sialic acid-binding lectin, is a novel regulator for osteoclast differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 424-429 (2011).

30 Hiruma, Y. *et al.* Impaired osteoclast differentiation and function and mild osteopetrosis development in Siglec-15-deficient mice. *Bone* 53, 87-93 (2013).

31 Ishii, M. & Saeki, Y. Osteoclast cell fusion: mechanisms and molecules. *Mod. Rheumatol.* 18, 220-227 (2008).

32 Novack, D. V. & Teitelbaum, S. L. The osteoclast: friend or foe? *Annu. Rev. Pathol.* 3, 457-484 (2008).

33 Takahata, M. *et al.* Sialylation of cell surface glycoconjugates is essential for osteoclastogenesis. *Bone* 41, 77-86 (2007).

34 Angata, T., Hayakawa, T., Yamanaka, M., Varki, A. & Nakamura, M. Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates. *FASEB J.* 20, 1964-1973 (2006).

35 Varki, A. & Angata, T. Siglecs--the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology* 16, 1R-27R (2006).

36 Otero, K. *et al.* TREM2 and beta-catenin regulate bone homeostasis by controlling the rate of osteoclastogenesis. *J. Immunol.* 188, 2612-2621.

37 Saltel, F., Chabadel, A., Bonnelye, E. & Jurdic, P. Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: a model to decipher transmigration and matrix degradation. *Eur. J. Cell Biol.* 87, 459-468 (2008).

38 Zou, W. *et al.* Syk, c-Src, the alphavbeta3 integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *J. Cell Biol.* 176, 877-888 (2007).

39 Faccio, R., Takeshita, S., Zallone, A., Ross, F. P. & Teitelbaum, S. L. c-Fms and the alphavbeta3 integrin collaborate during osteoclast differentiation. *J. Clin. Invest.* 111, 749-758 (2003).

40 Faccio, R. *et al.* Vav3 regulates osteoclast function and bone mass. *Nat. Med.* 11, 284-290 (2005).

41 Barrow, A. D. *et al.* OSCAR is a collagen receptor that costimulates osteoclastogenesis in DAP12-deficient humans and mice. *J. Clin. Invest.* 121, 3505-3516 (2011).

42 Matsumoto, T. *et al.* Distinguishing the proapoptotic and antiresorptive functions of risedronate in murine osteoclasts: role of the Akt pathway and the ERK/Bim axis. *Arthritis Rheum.* 63, 3908-3917 (2011).

43 Nakamura, I. *et al.* Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3 kinase, blocks osteoclastic bone resorption. *FEBS Lett.* 361, 79-84 (1995).

44 Munugalavadla, V. *et al.* The p85alpha subunit of class IA phosphatidylinositol 3-kinase regulates the expression of multiple genes involved in osteoclast maturation and migration. *Mol. Cell Biol.* 28, 7182-7198 (2008).

45 Roggia, C. *et al.* Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 13960-13965 (2001).

46 Kimble, R. B., Bain, S. & Pacifici, R. The functional block of TNF but not of IL-6 prevents bone loss in ovariectomized mice. *J. Bone Miner. Res.* 12, 935-941 (1997).

47 Ammann, P. *et al.* Transgenic mice expressing soluble tumor necrosis factor-receptor are protected against bone loss caused by estrogen deficiency. *J. Clin. Invest.* 99, 1699-1703 (1997).

48 Kitaura, H. *et al.* Marrow stromal cells and osteoclast precursors differentially contribute to TNF-alpha-induced osteoclastogenesis in vivo. *J. Immunol.* 173, 4838-4846 (2004).

49 Kitaura, H. *et al.* M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. *J. Clin. Invest.* 115, 3418-3427 (2005).

50 Kobayashi, K. *et al.* Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J. Exp. Med.* 191, 275-286 (2000).

51 Azuma, Y., Kaji, K., Katogi, R., Takeshita, S. & Kudo, A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 275, 4858-4864 (2000).

52 Kim, N. *et al.* Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. *J. Exp. Med.* 202, 589-595 (2005).

53 Li, P. *et al.* RANK signaling is not required for TNFalpha-mediated increase in CD11(hi) osteoclast precursors but is essential for mature osteoclast formation in TNFalpha-mediated inflammatory arthritis. *J. Bone Miner. Res.* 19, 207-213 (2004).

54 Feng, X. Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts. *Gene* 350, 1-13 (2005).

55 Cenci, S. *et al.* Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J. Clin. Invest.* 106, 1229-1237 (2000).

56 Wu, Y. *et al.* Bone microenvironment specific roles of ITAM adapter signaling during bone remodeling induced by acute estrogen-deficiency. *PLoS One* 2, e586 (2007).

57 Anginot, A., Dacquin, R., Mazzorana, M. & Jurdic, P. Lymphocytes and the Dap12 adaptor are key regulators of osteoclast activation associated with gonadal failure. *PLoS One* 2, e585 (2007).

58 Turnbull, I. R. & Colonna, M. Activating and inhibitory functions of DAP12. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 155-161 (2007).

59 Hamerman, J. A., Tchao, N. K., Lowell, C. A. & Lanier, L. L. Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12. *Nat. Immunol.* 6, 579-586 (2005).

60 Turnbull, I. R. *et al.* Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. *J. Immunol.* 177, 3520-3524 (2006).

61 Hamerman, J. A. *et al.* Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12. *J. Immunol.* 177, 2051-2055 (2006).

62 Stuible, M. *et al.* Mechanism and Function of Monoclonal Antibodies Targeting Siglec-15 for Therapeutic Inhibition of Osteoclastic Bone Resorption. *J. Biol. Chem.*, doi:M113.494542 [pii]10.1074/jbc.M113.494542.

63 Soares, R., Marinho, A. & Schmitt, F. Expression of sialyl-Tn in breast cancer. Correlation with prognostic parameters. *Pathol. Res. Pract.* 192, 1181-1186 (1996).

64 Julien, S. *et al.* ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity. *Glycobiology* 16, 54-64 (2006).

65 Leivonen, M., Nordling, S., Lundin, J., von Boguslawski, K. & Haglund, C. STn and prognosis in breast cancer. *Oncology* 61, 299-305 (2001).

66 Crotti, T. N. *et al.* The immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) -related factors are increased in synovial tissue and vasculature of rheumatoid arthritic joints. *Arthritis Res. Ther.* 14, R245 (2012).