

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11008

研究課題名(和文) Siglec-15-DAP12複合体の骨代謝における意義とその作用機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of Siglec-15-DAP12 complex in osteoclast and bone metabolism.

研究代表者

北川 教弘 (Norihiro, Ishida-Kitagawa)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：30294284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：DAP12を介したシグナル系は骨吸収活性を有した成熟破骨細胞の形成に必須であるが、その制御機構は明らかではない。この理由として破骨細胞におけるDAP12会合受容体の実体が不明であったことがあげられる。研究代表者は培養細胞系を用いた研究からSiglec-15がDAP12会合受容体として機能することを報告した。本研究では研究代表者が独自に開発したSiglec-15-DAP12複合体を一分子で模倣するタンパク質改良型SSDKAを破骨細胞特異的に発現させると、Siglec-15KOマウスおよびDAP12KOマウス由来成熟破骨細胞の形成やこれらマウスの呈する大理石骨病を回復することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Siglec-15-DAP12複合体を一分子で模倣するタンパク質改良型SSDKAの破骨細胞特異的な発現がSiglec-15およびDAP12遺伝子欠損マウスの大理石骨病を回復するという本研究での成果は、Siglec-15が破骨細胞におけるDAP12会合受容体の実体であることを強く示唆する。これに基づきSiglec-15を標的として研究を進めることが、1) DAP12を介したシグナル系の制御メカニズムを解明する、また2) 骨粗しょう症を始めとする骨疾患治療薬を開発する、などの学術的・社会的に意義のある課題に取り組む足がかりの一つになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：ITAM-bearing protein DAP12 is essential for formation of bone resorbable mature osteoclasts, however critical DAP12-associated receptor for functional osteoclast formation was unclear. Our group previously reported that Siglec-15 is essential for formation of functional osteoclasts in concert with DAP12 in vitro and developed artificial protein revSSDKA which mimics Siglec-15-DAP12 complex as single polypeptide. In this research subject, it is found that revSSDKA which specifically expressed in osteoclasts rescued mild osteopetrotic phenotype found in both DAP12-null and Siglec-15-null mice. These achievements strongly suggested that Siglec-15 is necessary and sufficient DAP12-associated receptor for mature osteoclast formation.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨代謝 破骨細胞 シグナル伝達 免疫学 糖鎖

## 1. 研究開始当初の背景

DAP12 は細胞内領域に Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif(ITAM)を有するアダプタータンパク質である。DAP12 はさまざまな受容体分子と会合することが知られており、それらの制御下で ITAM 下流のシグナルが伝達される。*DAP12* 遺伝子欠損 (*DAP12*KO) マウスは骨吸収活性を有する成熟破骨細胞の形成が不全であり、軽度の大理石骨病を呈する。成熟破骨細胞の形成における DAP12 の ITAM 下流シグナル経路が理解されつつあることに対し、本シグナル系の制御機構については不明であった。この原因として、DAP12 会合受容体の実体が不明であったことがあげられた。

研究代表者は転写因子 NFATc1 制御下で発現する膜タンパク質として Siglec-15 を見出し、細胞培養系を用いて Siglec-15 が 1) DAP12 と同様に骨吸収活性獲得に必須であること、2) Siglec-15 の機能にはシアル酸化糖鎖認識に必須な V-set ドメインおよび DAP12 との会合に必須な膜貫通領域内リジン残基(マウスでは K272)が必須であることを、明らかにした。さらに 3) Siglec-15K272A 変異体の細胞質内領域を DAP12 の細胞質内領域に置換したキメラタンパク質 SSDKA が、DAP12 との会合を介さずに *Siglec-15* 遺伝子発現抑制細胞の骨吸収活性を、部分的ではあるが、分子内の ITAM 依存的に回復することを確認した。以上の結果から少なくとも培養細胞系では Siglec-15 は DAP12 会合受容体として骨吸収活性を有する成熟破骨細胞の形成に働くことを発表した。さらに他のグループの研究から *Siglec-15* 遺伝子欠損(*Siglec-15*KO)マウスが、*DAP12*KO マウスと同様に、軽度の大理石骨病を呈することが報告された。以上のことから Siglec-15 が DAP12 と同様に骨代謝に必須であることは明らかにされたが、A) 骨組織における破骨細胞で Siglec-15 が DAP12 会合受容体として働くのか、また B) Siglec-15 が破骨細胞において唯一必要な DAP12 会合受容体であるのか、については遺伝子欠損マウスの知見のみでは示し得ず、解決すべき課題であった。

本研究を開始するにあたり研究代表者は、SSDKA と比較してより効率よく Siglec-15-DAP12 複合体を 1 ポリペプチドで模倣する改良型 SSDKA を開発した。さらに破骨細胞特異的に発現する *Acp5* 遺伝子プロモーター制御下で改良型 SSDKA を発現するトランスジェニックマウスを樹立した。改良型 SSDKA を *Siglec-15*KO マウスや *DAP12*KO マウスの破骨細胞に発現させ破骨細胞の骨吸収活性や骨組織の形態および代謝を評価することで、先に示した A) および B) の二課題を明らかにできると考えた。

## 2. 研究の目的

本申請では Siglec-15-DAP12 複合体の成熟破骨細胞形成における意義を理解するとともに、その作用機序を分子レベルで明らかにすることを旨とし、独自に開発した改良型 SSDKA を 1) *Siglec-15*KO マウスに発現させ、Siglec-15 が DAP12 会合受容体として機能するのか、2) *DAP12*KO 細胞およびマウスに発現させ、Siglec-15 が破骨細胞における DAP12 会合受容体の実体であるのか、を明らかにすることを目的に研究を行った。

## 3. 研究の方法

【細胞培養】 マウスマクロファージ細胞株 RAW264、もしくは各種遺伝子型マウス由来初代骨髄マクロファージを破骨前駆細胞として培養し、組換え RANKL タンパク質を添加した培地にて破骨細

胞へと分化誘導した。*DAPI2KORAW264* 細胞株の樹立には CPISPRE/Cas9 によるゲノム編集を利用した。分化誘導した細胞は酒石酸耐性アルカリフォスファターゼ活性を利用した染色を行った。

【 実験動物 】 全ての実験は B57BL/6 マウス系統遺伝子背景下で行った。*DAPI2* 遺伝子欠損 (*DAPI2KO*) マウスをゲノム編集法により樹立した。*DAPI2KO* マウス、*Siglec-15KO* マウス、および *Acp5* 遺伝子プロモーター制御下で改良型 SSDKA を発現するトランスジェニックマウス (*Acp5*:改良型 SSDKA マウス) 交配させ、各種遺伝子型のマウスを作成した。これらマウスの大腿骨遠位部骨梁骨を  $\mu$  CT 解析し、骨量/組織量、骨梁幅、および骨梁数を計測した。

#### 4. 研究成果

ゲノム編集技術により *DAPI2KORAW264* 細胞株を樹立し破骨細胞へ分化誘導したが、骨吸収活性を有する多核破骨細胞はほぼ形成されなかった。本細胞株に DAP12 を強制発現させると成熟破骨細胞の形成が回復した。さらに Siglec-15-DAP12 複合体を一分子で模倣するキメラタンパク質改良型 SSDKA を発現させると成熟破骨細胞の形成が ITAM 依存的に回復した。以上の結果は、RAW264 細胞では Siglec-15 が破骨細胞における DAP12 会合受容体として十分条件であることを支持する。

*Siglec-15KO* マウス、*DAPI2KO* マウスは軽度の大理石骨病を呈することが報告されている。研究代表者が独自に樹立した *Siglec-15KO* マウスおよび *DAPI2KO* マウスがともに、野生型マウスと比較して大腿骨遠位部骨梁骨が増加していることが確認された。両遺伝子欠損マウスと各遺伝子単独欠損マウスの間では有意な差は認められなかった。さらに各遺伝子単独欠損マウスを *Acp5*:改良型 SSDKA マウスと交配した結果、*Siglec-15KO* マウスおよび *DAPI2KO* マウスの増加した骨量が *Acp5*:改良型 SSDKA アリルにより有意に減少した。さらに *Siglec-15KO* マウスおよび *DAPI2KO* マウス由来骨髄マクロファージを組換え RANKL 刺激にて分化誘導すると成熟多核破骨細胞が出現しないのに対し、*Acp5*:改良型 SSDKA アリルを有する遺伝子欠損マウス由来細胞では成熟破骨細胞の分化が認められた。このことから生体における破骨細胞特異的な改良型 SSDKA の発現が *DAPI2KO* および *Siglec-15KO* マウスの破骨細胞の形成と骨吸収活性を回復したと考えられた。

以上の結果は、生体骨組織で機能する破骨細胞において Siglec-15 が DAP12 会合受容体の実体であることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 北川（石田）教弘
2. 発表標題 Siglec-15-DAP12複合体を模倣するキメラタンパク質revSSDKAの発現はDAP12欠損RAW264細胞の多核破骨細胞形成能を回復する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Siti Aqilah Abdul Khair, Yasukazu Nakahata, Yasumasa Bessho and Norihiro Ishida-Kitagawa
2. 発表標題 Siglec-15 is necessary and sufficient DAP12 associated receptor for formation of multinucleated osteoclasts in RAW264 cells
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Norihiro Ishida-Kitagawa
2. 発表標題 Cell proliferation and differentiation as target of therapy.
3. 学会等名 The 2nd Universitas Muhammadiyah Purwokerto-Pharmacy International Conference(UMP-PIC) And 8th Indonesian Society for Cancer Chemoprevention(ISCC) Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	別所 康全  (Bessho Yasumasa)  (70261253)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授    (14603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------