

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23890008
 研究課題名（和文） 病的骨破壊におけるシアル酸受容体シグレックを介した破骨細胞活性化制御機構の解明
 研究課題名（英文） Sialic acid binding immunoglobulin like lectin regulates osteoclast differentiation and function in destructive bone diseases
 研究代表者
 高畑 雅彦（TAKAHATA MASAHIKO）
 北海道大学・北海道大学病院・講師
 研究者番号：40374368

研究成果の概要（和文）：シアル酸認識免疫グロブリン様受容体（シグレック）15 遺伝子欠損マウスは、骨吸収能低下により軽度の大理石病を呈した。シグレック 15 欠損マウスでは破骨細胞は形成されるものの、形態が異常でほとんどが小さな単核の細胞であったことから分化や細胞融合過程が阻害されていると考えられた。破骨細胞分化において、免疫受容体であるシグレック 15 はアダプター蛋白である DAP12 を介して RANKL 刺激下流シグナルを調節することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Using genetically modified mice lacking Siglec-15 gene, we show that Siglec-15 regulates osteoclast development and bone resorption by modulating receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) signaling, in association with DNAX-activating protein 12kDa (DAP12), an adaptor protein bearing an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：破骨細胞，シグレック 15，細胞骨格，骨吸収，細胞融合，糖鎖，免疫グロブリン様受容体

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) や感染による炎症や悪性腫瘍の転移による病的な骨吸収は、生物学的製剤や骨吸収阻害薬を用いてもなお制御するのが困難で、より安全でかつ効果的な治療法開発が必要とされています。骨破壊性疾患の主役である破骨細胞の分化、活性化機構については、近年、免疫グロブリン様受容体による制御機構が明らかとなっており、新た

な治療ターゲットとして注目されています。

本研究においてわれわれが研究のターゲットとした糖鎖は、代表的な蛋白質翻訳後修飾分子であり、蛋白質の機能制御や安定性にとって極めて重要な役割を担っています。またそれ自身がリガンドとして働き、内因性糖鎖認識分子（レクチン）を介してシグナル伝達や細胞・分子間認識、接着などの作用をもつことが明らかとなっています。骨代謝制御

機構における糖鎖の役割についてはまだほとんどわかっていませんが、われわれは、これまでの研究において、破骨細胞前駆細胞膜上に発現するシアリル糖鎖が破骨細胞の分化に関与すること、さらにシアリル糖鎖をリガンドとするシグレックが破骨細胞分化に関与することを明らかにしています。

シグレックは、免疫グロブリン様レクチンであり、免疫受容体チロシン抑制性モチーフ (ITIM) もしくは免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) をもつアダプター分子と会合して非活性化または活性化シグナルを伝達する機能をもつことが知られています。シグレックは顆粒細胞、単球・マクロファージ、NK 細胞など先天性免疫に関与する細胞に発現することが多く、免疫制御機構において重要な役割を果たしていると考えられています。本研究のターゲットであるシグレック 15 は、2007 年に安形らによって発見、クローニングされた CD33 様シグレックのひとつであり、マクロファージに発現が確認されています。その生理機能は未だ不明ですが、われわれがこれまでに行った予備実験において、RANKL 刺激によりシグレック 15 発現が上昇すること、シグレック 15 発現レベルが破骨細胞分化に影響することから、シグレック 15 は共刺激シグナルを介して破骨細胞分化を調節する機能を有する可能性が示唆されています。しかしながら、*in vivo* におけるシグレック 15 の機能や破骨前駆細胞に発現する他の免疫グロブリン様受容体との役割の違いを明らかにするためには、遺伝子改変動物や疾患モデル、ヒトにおける解析が必須です。

2. 研究の目的

本研究の目的は、シグレック 15 の生理機能および炎症性骨破壊への関与を明らかにすることであり、以下の 5 項目を具体的目標とした。

- ① シグレック 15 欠損マウスの骨表現型を明らかにすること
- ② 破骨細胞分化におけるシグレック 15 の機能や役割を明らかにすること。
- ③ 炎症性骨破壊への関与および外因性シグレックもしくは中和抗体投与による骨破壊抑制効果を検証すること。
- ④ ヒト関節リウマチにおけるシグレック 15 の発現解析。関節リウマチ患者の滑膜および骨組織におけるシグレックおよびリガンド糖鎖の発現、分布を解析し、臨床的意義を検討すること。
- ⑤ 内因性リガンド糖鎖の同定。シアリル Tn をはじめ、これまでに申請者らが網羅的グライコムクス法により同定した破骨前駆細胞上に発現するシアリル糖鎖とシグレック 15 の結合親和性および細胞内シ

グナルの賦活化能を調査すること。

3. 研究の方法

- (1) シグレック 15 欠損マウスの骨表現型の解析。
 - ① マイクロ CT により骨微細構造や骨密度を測定した。
 - ② 組織形態計測により破骨細胞、骨芽細胞の形態および機能評価を行った。
 - ③ 血清学的に骨代謝状態を評価した。
- (2) シグレック 15 の機能解析
 - ① レトロウイルスを用いて外因性シグレック 15 を導入し、シグレック 15 欠損細胞の破骨細胞分化能が回復するかどうかを確認した。
 - ② 破骨細胞分化における共刺激シグナルへの関与および M-CSF, RANKL シグナルへの関与を検討した。
- (3) 炎症性骨破壊への関与および外因性シグレックもしくは中和抗体投与による骨破壊抑制効果の検証。
 - ① 炎症性骨破壊に対する抵抗性: リポ多糖 (LPS) 誘発炎症モデル (頭蓋) を作成し、野生型マウスと比較した。
 - ② シグレック 15 細胞外領域と IgG-Fc 領域の融合蛋白質を作成し、*in vitro* 破骨細胞培養系にて分化阻害能を評価した。
 - ③ 抗マウスシグレック 15 中和抗体投与による骨破壊抑制効果の検証を試みた。
- (4) 関節リウマチ患者におけるシグレック 15 の発現解析。
 - ① ヒト末梢血由来単球より破骨細胞を分化させ、シグレック 15 の発現を検証した。
 - ② 関節リウマチ患者および変形性関節症患者から切除、廃棄される滑膜および骨組織の免疫染色標本による評価を試みた。
- (5) シグレック 15 に対する内因性リガンド糖鎖の探索、同定。
 - ① シグレック 15 細胞外領域と IgG-Fc 領域の融合蛋白質を Protein G column に吸着させた。この column に破骨細胞溶解液を流してリガンドを捕捉し、レクチンブロットおよび質量分析にてリガンド分子の同定を試みた。

4. 研究成果

- (1) シグレック 15 欠損マウスの骨表現型。
Siglec-15 欠損マウス (*Siglec-15*^{-/-}) マウスの成長、発育は野生型マウス (WT) と同等であったが、DAP12 欠損マウスと類似した軽度の大石骨病様の表現型を呈した。*Siglec-15*^{-/-} マウスでは破骨細胞の分化あるいは機能不全が示唆されたが、骨組織中には TRAP 陽性の破骨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

細胞は単核のものが多く、多核化した破骨細胞も WT と比較して小さな形態を呈していた。興味深いことに、成長軟骨直下では *Siglec-15*^{-/-} マウスでも WT 同様多数の巨大な多核破骨細胞が観察され、生体内では解剖学的な部位によって Siglec-15 の機能を代償する機構が存在する事が示唆された。

WT 骨髄マクロファージ (BMM) を M-CSF と RANKL 存在下に培養し、Siglec-15 の発現を確認すると、Siglec-15 は RANKL 刺激後 3 日、すなわち破骨細胞への最終分化段階で強く発現した。フローサイトメトリー及び、免疫染色の結果から、Siglec-15 は一部の単核の前破骨細胞及び、仮足を持つ多核破骨細胞に特に強く発現する事がわかった。*Siglec-15*^{-/-} マウス由来の 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、わずかに形成された多核破骨細胞においても Actin ring を形成することができなかつた。また、骨切片上で培養すると WT と比較して骨吸収能が低下していることが確認された。血清学的骨代謝マーカーを調べたところ、オステオカルシン、TRAP5b ともに *Siglec-15*^{-/-} マウスでは低下する傾向にあった。In vitro において骨芽細胞機能は正常であったことから、骨形成の低下は、骨吸収低下に引き続いて起こる 2 次的なものと考えられた。

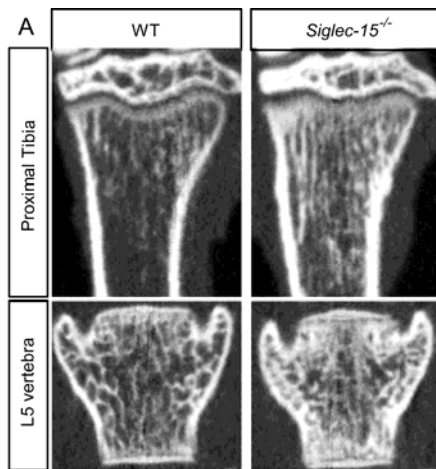


図 1. 野生型 (WT) マウスと *Siglec-15*^{-/-} マウスの脛骨近位部および第 5 腰椎のマイクロ CT 写真。 *Siglec-15*^{-/-} マウスでは骨量が多く密である。

(2) 破骨細胞分化におけるシグレック 15 の機能と役割

レトロウイルスベクターを用いて、Siglec-15 を強制発現させると多核破骨細胞の形成能が回復したが、DAP12 と会合できないようにした Siglec-15 変異蛋白を強制発現させても多核破骨細胞の形成能は回復しなかつたことから、Siglec-15 は DAP12 を介して破骨細胞の分化を調節していると考えられたことが示された。

DAP12 は細胞内カルシウムシグナルの賦活化により NFATc1 を誘導し破骨細胞分化を促進するほか、インテグリンや M-CSF により活性化されるシグナルを制御して破骨細胞の細胞骨格形成を制御することが知られており、*Siglec-15*^{-/-} 前破骨細胞におけるこれらシグナルの活性化を確認した。予想に反して、*Siglec-15*^{-/-} においてもこれらシグナルはほぼ正常に活性化されていた。しかしながら、破骨細胞分化に必須なサイトカインである RANKL で刺激の下流した後のシグナル伝達経路を確認すると、*Siglec-15*^{-/-} 細胞では PI3K/Akt および Erk のリン酸化が阻害されていた。PI3K/Akt, Erk は破骨細胞の細胞骨格形成、骨基質への遊走、接着、細胞の生存などを制御することが知られており、この経路の阻害により *Siglec-15*^{-/-} 破骨細胞の細胞骨格の形成、すなわち Actin ring の形成が障害されていると考えられた。

Siglec-15 は、DAP12 を介して RANKL による PI3K/Akt, Erk のリン酸化を制御調節することで破骨細胞の分化および細胞骨格形成を制御することを明らかにした。Siglec-15 は、生体内において、破骨細胞形成を正に制御し骨の恒常性維持に重要な役割をもつことが示された。

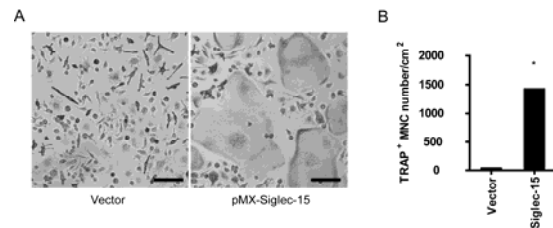


図 2. *Siglec-15*^{-/-} 細胞は破骨細胞には分化しないが (Vector), Siglec-15 を強制発現 (pMX-Siglec-15) させると多核破骨細胞の形成能が回復する。A は顕微鏡写真。B は破骨細胞数。

(3) 炎症性骨破壊への関与および外因性シグレックもしくは中和抗体投与による骨破壊抑制効果の検証。

- ① 炎症性骨破壊に対する抵抗性：リポ多糖 (LPS) 誘発炎症モデル (頭蓋) により野生型マウスでは多数の破骨細胞が誘導され、骨吸収窩が形成された。*Siglec-15*^{-/-} マウスでも多数の破骨細胞が誘導されたが、骨吸収の程度は少なくシグレック 15 機能抑制により骨吸収を抑制できる可能性が示唆された。
- ② シグレック 15 細胞外領域と IgG-Fc 領域の融合蛋白質は、in vitro 破骨細胞培養系にて破骨細胞の分化成熟を阻害したことから、シアリル糖鎖をブロックすることで骨吸収抑制効果がえられる可能性があることが示唆された。
- ③ 抗マウスシグレック 15 中和抗体投与に

よる骨破壊抑制効果の検証は、抗体が中和抗体として作用するか確認が得られなかったこと、同様の中和抗体を用いた実験によって破骨細胞分化が阻害されることが別の研究グループによって報告された (Hiruma, et al 2011) ことから中止した。

(4) 関節リウマチ患者におけるシグレック 15 の発現解析。

- ① ヒト末梢血由来単球より破骨細胞を分化させ、シグレック 15 の発現を確認したところ、マウスと同様に分化に伴って発現上昇することが確認された。シグレック 15 遺伝子が脊椎動物では種を超えて広く保存された配列であることから骨代謝において重要な役割を果たしていることが示唆された。
- ② 関節リウマチ患者および変形性関節症患者から切除、廃棄される滑膜および骨組織の免疫染色標本による評価を試みているが、条件設定などに課題があり、現在進行中である。

(5) シグレック 15 に対する内因性リガンド糖鎖の探索、同定。

シグレック 15-IgG-Fc 領域融合蛋白質吸着 column で捕捉された蛋白には $\alpha 2-3$ 結合、 $\alpha 2-6$ 結合シアリル糖鎖が付加されていることを MAA, SSA レクチンブロットにて確認した。質量分析を用いてリガンド分子の同定を試みたが、多数の糖タンパクが検出されており、真のリガンドの絞り込みを行っているがまだ成功していない。今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Siglec-15 regulates osteoclast differentiation by modulating RANKL-induced phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Erk pathways in association with signaling adaptor DAP12. Kameda Y, Takahata M, Komatsu M, et al. J Bone Miner Res. 2013 May 15. 査読あり。

[学会発表] (計 2 件)

- ① 亀田裕亮, 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, 2012 年 7 月 19 日~21 日, 京王プラザホテル(東京都)
- ② 亀田裕亮, 免疫グロブリン様受容体

Siglec-15 は DAP12 を介した共刺激シグナルにより成熟多核破骨細胞形成を制御する, 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011 年 7 月 28 日~30 日, 大阪国際会議場(大阪府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高畑 雅彦 (TAKAHATA MASAHIKO)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号: 40374368

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし