

平成 21年 5月 25日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790203  
 研究課題名 (和文) 破骨細胞分化における活性化アダプター分子 DAP10 の生理的役割に関する研究  
 研究課題名 (英文) Study on the physiological role of signal adaptor DAP10 in osteoclast development  
 研究代表者  
 乾 匡範 (INUI MASANORI)  
 和歌山県立医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：80443985

研究成果の概要： DAP10 遺伝子欠損マウスの解析において、DAP10 遺伝子欠損マウスが加齢に伴う破骨細胞の分化障害により骨硬化を呈することを明らかにした。さらに、破骨細胞における DAP10 会合分子の探索を行ったところ、Myeloid DAP12-associating lectin (MDL)-1 を同定し、MDL-1/DAP10/DAP12 の三量体を形成することを示した。このように DAP10 は MDL-1 を介して DAP12 と協調的にはたらき、破骨細胞分化を制御していることを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：骨免疫学，骨代謝学，免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

骨構造や強度の維持は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収の巧妙なバランスにより成り立っており、骨粗鬆症や関節リウマチなどの骨疾患は破骨細胞機能の制御異常により引き起こされることが知られている。そのため破骨細胞の分化および活性化機構を理解することは、骨疾患の発症機序の解明、さらには治療法の開発に必須であると考えられる。申請者らは活性化アダプター分子 DAP12 および Fc receptor common  $\gamma$  subunit (FcR $\gamma$ ) を二重に欠損するマウスが

重度の大理石骨病を呈することを見い出し、これら活性化アダプター分子を介するシグナルが破骨細胞分化に必須であることを明らかにしている。しかしながら、DAP12/FcR $\gamma$  二重欠損マウスにおいて若干ではあるが破骨細胞の分化が観察されており、その他のアダプター分子による代償機構の存在が示唆されるなど、破骨細胞分化の活性化機構について依然不明な点が多い。申請者らは新たに活性化アダプター分子 DAP10 の破骨細胞での発現を見い出しており、DAP10 の生理的役割を明らかにするとともに、骨疾患の発症

機序の解明、さらには新規な治療法の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

破骨細胞の分化や機能の制御異常が骨粗鬆症や関節リウマチなどの骨疾患の発症や増悪に関与していることが報告され、破骨細胞の分化および活性化機構の理解が骨疾患の発症機序の解明、さらには治療法の開発に必須であると考えられる。DAP10 は免疫制御機構、特に腫瘍の排除や移植拒絶において重要な役割を担うことが報告されているが、骨代謝における役割は全く解明されていない。本研究において破骨細胞分化における DAP10 の役割を解析することにより、分化制御機構の全容を解明したい。さらに、DAP10 に会合する新規受容体の同定、ならびにリガンドを探索することにより周辺細胞を含めた総合的な破骨細胞の分化機構を明らかにしたい。

## 3. 研究の方法

1) 骨代謝における DAP10 の生理的役割を解明するため、野生型および DAP10 遺伝子欠損マウスより脛骨を回収後、1.5, 3, 6ヶ月齢の骨組織切片を作製し、骨形態計測を行った。また、破骨細胞分化における DAP10 の生理的役割を解明するため、*in vitro* における破骨細胞分化誘導能および骨吸収能を野生型および DAP10 遺伝子欠損マウスより調整した骨髄細胞を receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) と M-CSF で刺激することにより検討した。

2) 周辺細胞を含めた破骨細胞の分化機序を明らかにするため、破骨細胞に発現する新規 DAP10 会合受容体の検索を行った。抗 DAP10 抗体を作製し、免疫沈降法により破骨細胞における DAP10 会合分子を単離した。さらに、質量分析法によりその会合分子の同定を行った。

3) 破骨細胞分化における会合受容体と DAP10 の役割を調べるため、会合受容体と DAP10 の会合様式の検討、および抗体による刺激実験を行った。

## 4. 研究成果

1) DAP10 遺伝子欠損マウスの骨形態計測を行ったところ、野生型マウスと比べて 1.5, 3ヶ月齢では有意な差を認めなかったが、6ヶ月齢において有意な骨量の増加を認めた(図1)。

骨芽細胞分化・機能に異常は認められなかったが、破骨細胞数および骨吸収面積の減少を観察した(図2)。このように、DAP10 遺伝子欠損マウスは加齢にともない破骨細胞分化障害による骨硬化を呈することが明らかとなった。

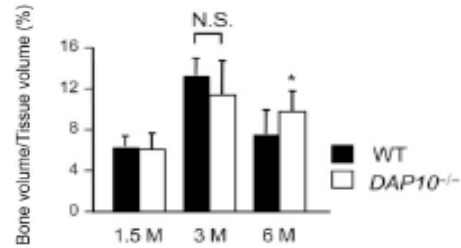


図1. DAP10<sup>-/-</sup>マウスにおける経時的骨量

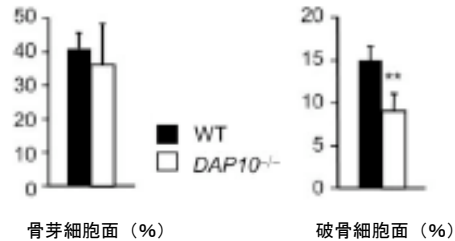


図2. 骨形態計測

*in vitro* において破骨細胞は、骨髄細胞よりサイトカイン RANKL および M-CSF による刺激によって誘導することができるため、次に *in vitro* における破骨細胞分化誘導能を検討した。野生型および DAP10 遺伝子欠損マウスから調整した骨髄細胞を RANKL と M-CSF で刺激したところ、破骨細胞分化マーカーである TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) 陽性破骨細胞数は有意に DAP10 遺伝子欠損マウスにおいて減少していた(図3)。さらに、骨基質をコートしたプレート上で破骨細胞を培養することにより骨吸収能を検討したところ、DAP10 遺伝子欠損マウスから誘導した破骨細胞において有意な骨吸収能の低下を観察した。これらの結果から、DAP10 は破骨細胞分化および機能に重要な役割を果たすことが示唆された。

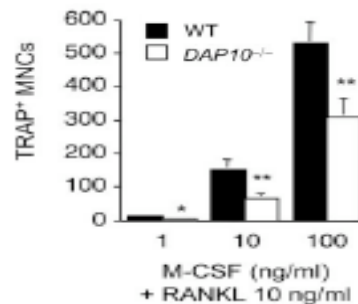


図3. *in vitro* 破骨細胞分化誘導試験

2) 破骨細胞における新規 DAP10 会合受容体を同定するため、抗 DAP10 抗体を作製し、

免疫沈降法により破骨細胞に発現する DAP10 会合分子を単離した。会合分子の同定を質量分析法により行ったところ、新規 DAP10 会合分子として Myeloid DAP12-associated lectin (MDL)-1 を同定した。このように DAP10 は MDL-1 を介して破骨細胞分化を制御していることが示唆された。

3) 破骨細胞および破骨細胞前駆細胞における免疫沈降-ウェスタンブロット実験により、DAP10 は MDL-1 と会合することを確認した (図 4)。以前の報告において、MDL-1 は DAP10 の近縁分子である DAP12 と会合することが明らかにされているため、DAP10 は MDL-1 を介して DAP12 と複合体を形成するかを検討した。免疫沈降-ウェスタンブロット実験により、DAP10 は MDL-1、さらに DAP12 とともに複合体を形成していることが明らかとなった (図 4)。

これまで DAP10 と DAP12 はそれぞれホモ二量体で発現していることが報告されていたが、非還元状態でのウェスタンブロット解析において、破骨細胞およびその前駆細胞では DAP10 と DAP12 はヘテロ二量体で存在していることが強く示唆された。このように DAP10 は MDL-1/DAP12/DAP10 の三量体を形成することを明らかにした。

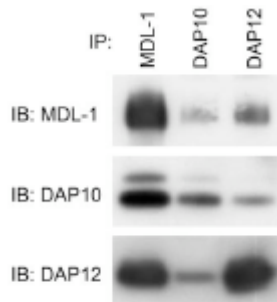


図 4. 免疫沈降-ウェスタンブロットによる DAP10 会合分子の同定

実際に MDL-1/DAP10/DAP12 を介するシグナルが破骨細胞分化を亢進させることができるかどうかを調べるため、破骨細胞分化誘導実験において抗 MDL-1 抗体による刺激を導入した。MDL-1 抗体刺激を加えた細胞群では、コントロール抗体刺激と比較して明らかに破骨細胞分化の亢進が観察された (図 5)。

以上の結果から、DAP10 は MDL-1 を介して DAP12 と協調的に破骨細胞分化を制御していることが明らかとなった。現在のところ MDL-1 の生理的リガンドは不明であるが、これらを明らかにすることでさらに破骨細胞分化機序の解明に繋がるだろう。

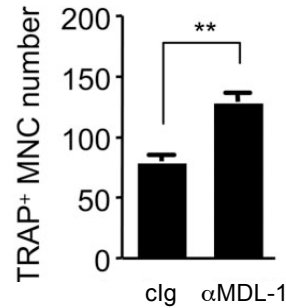


図 5. MDL-1 抗体刺激による破骨細胞分化能の検討

## 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 4 件)

1. Inui M, Kikuchi Y, Aoki N, Endo S, Maeda T, Sugahara-Tobinai A, Fujimura S, Nakamura A, Kumanogoh A, Colonna M, Takai T. 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, 査読有
2. Mori Y, Tsuji S, Inui M, Sakamoto Y, Endo S, Ito Y, Fujimura S, Koga T, Nakamura A, Takayanagi H, Itoi E, Takai T. Inhibitory immunoglobulin-like receptors LILRB and PIR-B negatively regulate osteoclast development. *J. Immunol.*, 181: 4742-4751, 2008, 査読有
3. Kasai S, Inui M, Nakamura K, Kakizaki Y, Endo S, Nakamura A, Ito S, Takai T. A novel regulatory role of gp49B on dendritic cells in T cell priming. *Eur. J. Immunol.*, 38: 2426-2437, 2008, 査読有
4. Hara H, Ishihara C, Takeuchi A, Imanishi T, Xue L, Morris S, Inui M, Takai T, Shibuya A, Saijo S, Iwakura Y, Ohno N, Koseki H, Yoshida H, Penninger J, Saito T: The adaptor protein Card9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 8, 619-629, 2007, 査読有

[学会発表] (計6件)

1. Masanori Inui, Yuko Ishida, Akihiko Kimura, Naofumi Mukaida, Toshikazu Kondo. Protective role of CX3CR1-mediated signal pathway in clostridium difficile toxin A-induced enteritis. Cytokines 2008, Montreal, Canada (2008)
2. Masanori Inui, Yuko Ishida, Akihiko Kimura, Naofumi Mukaida, Toshikazu Kondo. Protective role of CX3CR1-mediated signal pathway in clostridium difficile toxin A-induced enteritis. 日本免疫学会総会・学術集会, 京都 (2008)
3. Fujimura Shion, Inui Masanori, Kikuchi Yuki, Aoki Naoko, Endo Shota, Maeda Tsutomu, Sugahara-Tobinai Akiko, Nakamura Akira, Kumanogoh Atsushi, Colonna Marco, Takai Toshiyuki. Signal adaptor DAP10 associates with MDL-1 and triggers osteoclastogenesis in cooperation with DAP12. 日本免疫学会総会・学術集会, 京都 (2008)
4. 三木田直哉, 李 洪錦, 乾 匡範, 池田高治, 吉益 隆, 金澤伸雄, 古川福実. MRL/lpr マウスのエリテマトーデス様皮膚症に対する紫外線 UVA-1 治療の予防的効果の検討. 日本免疫学会総会・学術集会, 京都 (2008)
5. 高井俊行, 乾 匡範, 藤村紫音, 遠藤章太, 中村 晃. ITAM 型免疫レセプターによる骨ホメオスターシスの制御. BMB2008, 神戸 (2008)
6. Fujimura Shion, Inui Masanori, Kikuchi Yuki, Aoki Naoko, Endo Shota, Maeda Tsutomu, Sugahara-Tobinai Akiko, Nakamura Akira, Kumanogoh Atsushi, Colonna Marco, Takai Toshiyuki. MDL-1-DAP10 complex triggers osteoclastogenesis in cooperation with DAP12. BMB2008, 神戸 (2008)

[図書] (計2件)

1. 高井俊行, 乾 匡範, 森 優: 免疫グロブリン様受容体と骨代謝. 腎と骨代謝 21 :

43-50, 2008

2. 乾 匡範: 細胞・培地活用ハンドブック 骨免疫学研究. 羊土社 212-226, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乾 匡範 (INUI MASANORI)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 80443985

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :