

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462295

研究課題名(和文)破骨細胞におけるSiglec-15の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Siglec-15 in osteoclasts.

研究代表者

北川 教弘 (Ishida-Kitagawa, Norihiro)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：30294284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨吸収活性を有する成熟破骨細胞の形成にはSiglec-15-DAP12を介したシグナル系が必須である。本研究では微小管関連タンパク質の結合に必須なSiglec-15細胞質内領域を同定し、本領域がSiglec-15の機能に必須であることを明らかにした。この知見に基づき設計したSiglec-15-DAP12キメラタンパク質が1分子でSiglec-15-DAP12複合体を模倣することを確認した。キメラ分子を破骨細胞特異的に発現する遺伝子改変マウスを樹立し、Siglec-15遺伝子欠損マウスと交配を経て各種遺伝子型マウス由来の骨組織の採取に成功した。

研究成果の概要(英文)：Signaling cascade through ITAM of DAP12 is essential for formation of functional osteoclasts. In this research, first we elucidated the functional amino acid sequence in cytoplasmic region of Siglec-15 and through this sequence microtubule related protein interacts with Siglec-15. From these findings, we constructed chimeric protein of Siglec-15 and DAP12 and found the expression of this artificial protein effectively rescued the phenotype of Siglec-15 KO mice in vitro. We established transgenic mice which express this chimeric protein in osteoclast specific manner and mate this mice with Siglec-15 KO mice which shows mild osteopetrosis as same as DAP12 KO mice. Finally, we could successfully obtain tibias and femurs from Siglec-15 KO background mice with or without transgenic allele.

研究分野：骨代謝学

キーワード：骨・軟骨代謝学 破骨細胞 骨吸収 NFATc1 ITAM 糖鎖 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

骨吸収の種細胞である破骨細胞の分化及び成熟には RANKL-RANK シグナル系と共に、DAP12 や FcR の ITAM を介した costimulatory シグナル経路が重要であることが示されてきた。特に DAP12 欠損マウスが骨吸収活性を有する成熟破骨細胞の形成不全により大理石骨病を呈する。DAP12 の ITAM 下流のシグナル経路ではチロシンキナーゼ Syk や GEF タンパク質 VAV3、PLC の関与が明らかにされてきているのに対し、本経路の活性化機序については未だ不明な点が多い。これは DAP12 の ITAM シグナル経路が会合受容体を介して制御されていること、また破骨細胞における DAP12 会合受容体の実体が明らかにされていなかったことに起因する。

我々のグループは *in vitro* 分化誘導系を用いた解析から、転写因子 NFATc1 の制御下で発現するシアル酸化糖鎖を認識するレクチン Siglec-15 が成熟破骨細胞の形成に関わる必須な DAP12 会合受容体であることを報告してきた。また他の研究グループの報告から Siglec-15 遺伝子欠損マウスが、DAP12 遺伝子欠損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ており、これらの結果は我々の結果を支持するものであった。

さらに我々は微小管関連タンパク質 SBP50 (仮称) が Siglec-15 に会合することを見出しており、このことから Siglec-15 の細胞質内領域に未知の機能領域の存在が示唆された。また Siglec-15 は Sialyl-Tn 構造 (Neu5Ac<sub>2</sub>-6GalNAc) を認識することが報告されているが、Neu5Ac を GalNAc に (2-6) 結合させるシアル酸転移酵素 ST6GALNAC ファミリーのうち ST6GALNACX (仮称) が破骨細胞分化過程で唯一発現することを明らかにしており、本酵素が Siglec-15 の認識するシアル酸化糖鎖の生合成に関わる可能性が高いと考えた。

## 2. 研究の目的

Siglec-15 の作用機序を分子レベルで理解することは、未だ不明な点の多い DAP12 の ITAM を介したシグナル伝達経路制御機構解明の糸口となりうる。そこで本研究では ST6GALNACX の成熟破骨細胞形成への関与を検討するとともに、Siglec-15 細胞質内機能領域の同定とその作用機序を SBP50 との結合と関連づけて解析を行った。Siglec-15-DAP12 複合体を一分子で模倣するキメラタンパク質を破骨細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成し、Siglec-15 遺伝子欠損マウスと交配させることで、Siglec-15 が破骨細胞における DAP12 会合受容体であることを生体骨組織において検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 成熟破骨細胞形成におけるシアル酸化糖転移酵素 ST6GALNACX の機能解析

マウス初代骨髄マクロファージを前駆細胞とした *in vitro* 破骨細胞分化誘導系を用いて ST6GALNACX の発現を RNA 干渉法により抑制し、破骨細胞の分化や骨吸収活性を解析した。続いてマウスマクロファージ細胞株 RAW264 細胞をゲノム編集技術で ST6GALNACX 遺伝子欠損細胞株を樹立し、RNA 干渉法により得られた知見の検証を試みた。

(2) Siglec-15 細胞質内領域における SBP50 結合領域の決定と本領域の機能解析

Siglec-15 細胞質内領域の各種欠失変異体発現レトロウィルスベクターを構築し、我々が独自で樹立した Siglec-15 遺伝子欠損マウス由来破骨細胞に強制発現させた。細胞抽出液を用いて免疫沈降ウェスタンブロット法により SBP50 の会合領域を同定すると共に、形成された多核破骨細胞数および骨吸収活性を指標に成熟破骨細胞形成に必要な領域を同定した。

(3) Siglec-15-DAP12 キメラタンパク質を破骨細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスの作成

(2) の研究で同定された Siglec-15 細胞質内機能領域に、DAP12 の ITAM 以下 C 末端領域を連結させたキメラ分子改良型 SSDKA を作成した。本キメラタンパク質には DAP12 との会合に必要な Siglec-15 膜貫通領域内リジン 272 をアラニンに置換し、内在性 DAP12 との結合を介さず一分子で Siglec-15-DAP12 複合体を模倣しうることを *in vitro* 分化誘導系を用いて確認した。本キメラ分子をコードする DNA 配列を、破骨細胞特異的に発現する Acp5 遺伝子のプロモーターに連結し作成した発現カセットを導入したトランスジェニックマウスを樹立した。得られたファウンダーマウスは野生型マウスと交配することで維持し、その産仔由来骨髄マクロファージから *in vitro* で破骨細胞へと分化させ、本キメラタンパク質を破骨細胞特異的に発現するファウンダーマウス系統を選択した。

(4) Siglec-15 が破骨細胞における DAP12 会合受容体として機能するマウス骨組織を用いて検証する

(3) で作成したトランスジェニックマウスを Siglec-15 遺伝子欠損マウスと交配し、Siglec-15 遺伝子欠損遺伝的背景における大理石骨病がキメラタンパク質の発現で回復することを、 $\mu$ CT、骨形態計測、および骨代謝マーカーの測定により検証することを試みた。

#### 4. 研究成果

(1) 成熟破骨細胞形成におけるシアル酸化糖転移酵素 ST6GALNACX の機能解析

Siglec-15 が認識する Neu5Aca2-6GalNAc 構造は ST6GALNAC ファミリー糖転移酵素により形成される。この中で破骨細胞分化過程において唯一発現が認められた ST6GALNACX の機能を解析するため、RNA 干渉法によるノックダウンベクターを作成し、マウス初代マクロファージ由来破骨細胞に遺伝子導入した結果、発現レベルを 70% 程度まで抑制し得た、また発現抑制した細胞では形成される多核破骨細胞数が有意に減少した。以上の結果は ST6GALNACX が多核破骨細胞形成に関わることを示唆している。さらに本結果を確認するため、ゲノム編集技術を利用し ST6GALNACX 遺伝子欠損 RAW264 細胞株を 20 クローン樹立することに成功した。

(2) Siglec-15 細胞質内領域における SBP50 結合領域の決定と本領域の機能解析

Siglec-15 細胞質内領域各種欠失変異体を Siglec-15 遺伝子欠損マウス由来破骨細胞に強制発現させた結果、Siglec-15 の細胞質内領域に SBP50 が会合すること、SBP50 の結合領域は Siglec-15 の機能に必要なこと、を確認した。

(3) Siglec-15-DAP12 キメラタンパク質を破骨細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスの作成

(2) で得られた知見に基づき、K272A 変異を導入した Siglec-15 の N 末端から細胞質内機能領域と DAP12 の ITAM から C 末端までの細胞質内領域を連結させたキメラタンパク質改良型 SSDKA を作成した。Siglec-15 遺伝子欠損マウス由来破骨細胞に強制発現させた結果、改良型 SSDKA は DAP12 との会合を介さずに Siglec-15 の機能を代償しうること、改良型 SSDKA の機能にはシアル酸認識に必須な V-set ドメインとともに自身の ITAM が必須であること、を確認した。以上の知見は、少なくとも in vitro 分化誘導系では Siglec-15 が DAP12 会合受容体として機能することを示している。

以上の知見に基づき改良型 SSDKA を破骨細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成した。また本トランスジェニックマウス由来初代骨髄マクロファージを in vitro にて破骨細胞へと分化させた結果、改良型 SSDKA はマクロファージでは発現せず内在性 Siglec-15 と同様に RANKL 刺激 48 時間目以降から発現が誘導されることが確認された。

(4) Siglec-15 が破骨細胞における DAP12 会合受容体として機能するマウス骨組織を

用いて検証する

(3) で得られたトランスジェニックマウスを Siglec-15 遺伝子欠損マウスと交配し、統計解析に十分な数の各種遺伝子型メスマウスから大腿骨ならびに脛骨を採取した。この際に、in vitro 分化誘導系ではトランスジェニックアレルが Siglec-15 遺伝子欠損マウス由来破骨細胞の多核化や骨吸収活性を回復させることを確認した。

#### 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) Akamatsu R, Ishida-Kitagawa N, Aoyama T, Oka C, Kawaichi M. (2014) BNIP-2 binds phosphatidylserine, localizes to vesicles, and is transported by kinesin-1. *Genes Cells.* 20 135-52. doi: 10.1111/gtc.12209 (査読有)

{ 学会発表 } (計 1 件)

(1) Ishida-Kitagawa N. (2017) Cell Proliferation and Differentiation as Target of Therapy. The 2<sup>nd</sup> Universitas Muhammadiyah Pruwokerto-Pharmacy International Conference And 8<sup>th</sup> Indonesian Society for Cancer Chemoprevention Symposium (招待講演) (国際学会)

{ 図書 } (計 0 件)

{ 産業財産権 }

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

{ その他 }  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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・バイオサイエ  
ンス研究科・助教

研究者番号：30294284

(2) 研究分担者   なし  
                  (        )

研究者番号：

(3) 連携研究者   なし  
                  (        )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
                  (        )