

審査の結果の要旨

氏名 菅原 小莉

生体膜を構成するリン脂質の一種であるホスファチジルセリン (PS) は極性頭部に負電荷を持ち、様々な生理現象に関与する。PS の合成酵素には PS synthase(PSS) 1/2 が存在し、それぞれホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジエタノールアミン (PE) を基質として極性頭部の塩基交換反応により PS を合成する。PSS1/2 の活性は合成産物の PS により負のフィードバック調節を受けることが知られ、培養細胞に PS を添加すると抑制される。近年、PSS1 のヘテロ顕性変異が、先天性希少疾患である Lenz-Majewski syndrome(LMS) の原因であることが報告された。LMS 患者は頭蓋・四肢の骨格形態異常、進行性骨硬化症等の症状を示す。文献での報告は 20 例ほどで、10 人で 6 種類の変異の報告がある。全て機能獲得型変異であり、患者由来線維芽細胞では PS 合成活性が亢進し、また PS 添加によるフィードバック抑制に対して耐性となっていた。PS の過剰合成により多様な症状を示す興味深い症例である一方、疾患発症メカニズムは未だ不明である。そこで本研究では、PS 合成亢進による疾患発症機構の解明を目指した。菅原は、LMS 患者で進行性骨硬化症が見られること、生体内で骨を分解する主要な細胞である破骨細胞の活性低下が骨硬化症を導くことに着目し、PS 合成亢進による破骨細胞への影響を解析した。

実験系には、マウス由来骨髄細胞をサイトカイン MCSF、RANKL の存在下で培養する *in vitro* 破骨細胞分化系を用いた。分化初期には遺伝子発現が変化し、後期には破骨前駆細胞同士が融合して多核の破骨細胞を形成する。LMS における PSS1 の変異は顕性であるため、野生型マウスの骨髄細胞にレトロウイルスを用いて LMS 型 PSS1 (Q353R 変異体、以降 PSS1*と表記) を導入した。まず、破骨細胞においても PSS1*発現により PS 合成活性の亢進が認められた。PS を添加した際には、PSS1 発現細胞ではフィードバック抑制が見られたが、PSS1*発現細胞では PS 合成が抑制されなかった。この時、破骨細胞形成を評価したところ、PSS1*発現により多核細胞の減少が認められた。さらに骨吸収アッセイでは、PSS1*発現時には吸収孔の面積が減少し、骨吸収活性も減弱していることがわかった。

破骨細胞分化初期に発現上昇する遺伝子群には破骨細胞の融合・多核化や骨吸収に重要な遺伝子が含まれる。定量 PCR 解析の結果、代表的な破骨細胞遺伝子の発現には影響がなかった。さらに、マイクロアレイにより遺伝子発現を網羅的に比較した際にも、PSS1*発現時に大きく発現変動する遺伝子は認められなかった。以上から菅原は、破骨前駆細胞に PSS1*を発現すると、PS の合成が亢進すること、破骨細胞の多核化と骨吸収活性が抑制されること、破骨細胞遺伝子の発現には影響しないことを明らかにした。

破骨細胞は分化過程の形態変化に伴い、ポドソームと呼ばれるアクチン構造を形成しアクチン骨格パターンを大きく変化させる。In vitro の破骨前駆細胞ではポドソームが集合してクラスターを複数形成し、成熟に伴いリング状に変化して辺縁部まで広がりアクチンベルトを形成する。ポドソームのクラスター・リングは細胞の遊走・融合に関与し、アクチンベ

ルトは骨基質上で形成される sealing zone と類似しており、骨吸収に重要な構造である。

実際に破骨細胞のアクチン骨格を観察すると、コントロールではアクチンベルトを持つ細胞や小さなポドソームクラスターを多数持つ細胞が観察された。一方、PSS1*を発現した場合には、少数のポドソームクラスターを持つ細胞のみが認められ、またクラスターサイズが増大していた。アクチンプローブを用いてポドソームクラスターのライブイメージングを行ったところ、コントロールではクラスターが形成・消失を繰り返しパターンが経時的に変化する一方、PSS1*発現時のクラスターは長時間、一定の領域に残存していた。以上よりPSS1*は、アクチン骨格パターンとその動態に異常を生じることがわかった。

次に菅原は、PSS1*によるリン脂質組成への影響を解析した。PSS1*発現時にはPS合成が亢進しているがPS総量には変化がなかった。一方、予想外にホスファチジルイノシトール（PI）量が減少した。次にPSの脂肪酸鎖組成を比較すると、PSS1*発現時にはPSの特定の分子種で増減が認められた。

PSS1は*in vitro*ではserine, ethanolamine, choline全てを基質とする。過去に、塩基交換活性完全欠失変異（E200A）およびserine特異的塩基交換活性減弱変異（N209A）が報告されており、PSS1*にこれらの変異を導入した際のリン脂質組成を調べた。まず、いずれの変異でもPSS1*のPS過剰産生能は消失した。次にPS, PIのリン脂質組成を比較すると、PSS1*(E200A)ではPSの脂肪酸組成およびPI量はコントロールと比べ変化がなかった。一方、PSS1*(N209A)ではPSS1*と同様にPI量の減少が認められたが、PSの脂肪酸組成変化は起こらなかった。以上から、PSS1*の発現により、PS量には変化が無いがPSの脂肪酸組成に変化が見られること、N209A変異はPSS1*によるPSの脂肪酸組成変化とPI量の変化を分離できることが見出された。

最後に菅原は、PSS1*によるアクチン骨格パターン異常がどのリン脂質変化に起因するか、PSS1*(E200A)とPSS1*(N209A)を用いて検証した。その結果、いずれでもアクチンベルトや多数のポドソームクラスターが認められ、アクチン骨格パターンは正常であった。PSS1*(N209A)ではPI量が減少したがPSの脂肪酸鎖組成は正常であったことから、PSS1*が引き起こすリン脂質への影響のうち、PSの脂肪酸組成変化によってアクチン骨格パターンの異常が誘導されることが明らかとなった。

本研究において菅原は、PSS1のヘテロ顕性変異によるPS分子種の変化が、アクチン骨格パターンの制御を通じて破骨細胞の機能を抑制していることを明らかにし、LMSの発症に破骨細胞の機能破綻が関与している可能性を初めて見出した。LMS患者は多様な症状を示すが、特に頭蓋骨硬化が死因につながった症例報告もあり、本研究で骨硬化の機構が示唆された点は重要である。また、リン脂質の脂肪酸組成変化という細かな違いによって、破骨細胞の細胞現象が強く抑制される点も大変興味深い。本研究では至らなかったが、今後さらにエフェクターの同定を目指すことで、PSや脂肪酸組成の違いによるアクチン骨格制御の新たな一面が解明されることが期待される。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。