

## 論文の内容の要旨

論文題目 破骨細胞形成における TRAF6 依存性分子機構の解明

氏名 弓桁 洋

破骨細胞は骨吸収を担う多核の細胞であり、骨形成を担う骨芽細胞とともに骨量を維持する上で必須であるが、その過剰な骨吸収活性は骨粗鬆症等多くの骨疾患の原因となる。従って破骨細胞の形成機構を解明することは骨疾患を理解する上で重要である。

破骨細胞形成は多段階の過程から構成される。はじめに造血幹細胞由来の **Early Stage Precursor (c-Kit<sup>+</sup>, c-Fms<sup>+</sup>, Mac-1<sup>dull</sup>, RANK<sup>-</sup>)** がサイトカイン M-CSF の働きにより破骨前駆細胞へと分化する。次にこれらの前駆細胞は骨芽細胞等が発現するサイトカインである RANKL のシグナルをその受容体 RANK を介して受容する。そしてこのシグナルは RANKL 刺激依存的に RANK に結合する E3 ユビキチンリガーゼである TRAF6 を介して細胞内に伝達され、結果として **canonical NF- $\kappa$ B 経路** や **MAPKs 経路** の活性化を介して転写因子 NFATc1 の発現を誘導することが報告されている。TRAF6 により発現誘導され、さらに脱リン酸化酵素により活性化された NFATc1 は様々な遺伝子の転写を誘導し、次に破骨前駆細胞を TRAP 陽性単核細胞へと分化させる。そしてここからが特徴的な過程であるが、NFATc1 を介するシグナルは細胞融合に関連した遺伝子の発現も導くことで、これらの TRAP 陽性単核細胞の細胞融合を誘導する。重要なことに、近年こうした転写因子を介した融合関連遺伝子の発現誘導に加えて、細胞融合には個々の TRAP 陽性単核細胞がお互いに出会うために移動能を獲得する必要があるということも分かってきた。そして以上のイベントを経て細胞融合が果たされると、アクチンリングの形成等、最終的な活性化を経て成熟破骨細胞が形成される。

これまで上記した様に TRAF6 が **canonical NF- $\kappa$ B 経路** や **MAPKs 経路** を活性化させることを通じて NFATc1 の発現が誘導される、という知見が長い間定説化されてきた。しかしながら、この知見は NF- $\kappa$ B 活性が完全に消失する p50/52 二重欠損マウスでは NFATc1 の発現誘導が起らなくなること、NF- $\kappa$ B が NFATc1 のプロモーターに直接結合すること、MAPKs の活性化が c-Fos の核移行を誘導すること、c-fos の遺伝子欠損マウスでは NFATc1 の発現が起らず大理石骨病を呈すること、c-Fos が NFATc1 のプロモーターに直接結合すること等を示した報告に、*Traf6*<sup>-/-</sup> 細胞では **canonical NF- $\kappa$ B** 及び **MAPKs** の活性化そして NFATc1 の発現レベルが減弱していると

いった報告が組み合わされることでひとりでは定説化されていたものであり、実際に *Traf6*<sup>-/-</sup> 細胞を用いてシグナルの繋がりが証明されているものではない。またこうした知見が広く受け入れられてきた一方で、破骨細胞形成における TRAF6 の根本的な機能に関しては現在もコントラバーシャルなものとなっている。というのも現在までに 1999 年に当研究室が報告したマウスを含め三種類の *Traf6* 遺伝子欠損マウスが作出され解析が行われてきたが、それぞれの遺伝子欠損マウスで大理石骨病を呈するという事実は共通している一方で、その原因となるメカニズム (破骨細胞における defect) が異なっているのである。

以上を背景として本研究ではまず、三種類の遺伝子欠損マウスについてマウスの系統、遺伝子の欠損方法及び表現型についてまとめた。すると大変興味深いことに *Traf6* 遺伝子の Exon3 を欠損させるという方法が同じでも C57BL/6 もしくは 129 系統と、マウスの系統が異なれば表現型が変わってしまっているという事実があることが分かった。そこで本研究では以前の報告で使用していた C57BL/6 系統のマウスではなくそのマウスを Balb/c の系統にバッククロスさせたマウスを解析し (バッククロス回数 = 7)、マウスの系統を越えても破骨細胞に関する表現型が一致するかを検討することで、TRAF6 の機能に関して以前の当研究室の報告で示した「TRAF6 が TRAP の発現及び細胞融合の過程に関与する」という知見が妥当なものであるのかを初めに検討し、その後 TRAF6 が誘導するシグナル伝達経路の詳細について実際に *Traf6*<sup>-/-</sup> 細胞を用いることで解析した。

Balb/c 系統の *Traf6*<sup>+/+</sup> 及び *Traf6*<sup>-/-</sup> マウスに由来する大腿骨切片を作成し、破骨細胞を赤染する TRAP 染色さらに核を青紫色に染色するヘマトキシリン染色を行うことで *in vivo* における破骨細胞形成能を検討した。その結果、*Traf6*<sup>+/+</sup> では多くの TRAP 陽性の融合細胞が認められたが、*Traf6*<sup>-/-</sup> では TRAP 陽性細胞の数がそもそも少なく、融合した細胞は全く認められなかった。また *in vitro* での役割も次に検討した所、同様に *Traf6*<sup>-/-</sup> 細胞では TRAP 陽性の単核細胞のみが認められ、さらに TRAP 及び TRAP の上流の転写因子である NFATc1 発現の減弱が認められた。これらの結果は TRAF6 が *in vivo* 及び *in vitro* の両者において TRAP の発現及び細胞融合の誘導に関与することを示しており、これらの知見は以前当研究室が C57BL/6 系統のマウスを用いて示した解析結果と一致していた。そしてこの事実は「TRAF6 が TRAP の発現と細胞融合に関与する」という知見の妥当性を示唆していた。

TRAF6 が TRAP の発現と細胞融合に関与する因子であることが分かったので、本研究では次にこれらを誘導する分子機構について検討した。はじめに *Traf6*<sup>+/+</sup> および *Traf6*<sup>-/-</sup> 細胞において NFATc1 の下流因子で細胞融合に必須な 2 つの遺伝子の発現量を解析した。すると *Traf6*<sup>-/-</sup> 細胞ではこれら融合に必須な 2 つの遺伝子の発現量が減少していた。そこで次にこれらの上流の制御因子として可能性のある 3 種類の転写因子の発現における TRAF6 依存性を検討した。すると *Traf6*<sup>-/-</sup> 細胞ではこの中の 1 つの AP-1 family の転写因子の発現が完全に抑制されており、TRAF6 がその発現に必須であることが分かった。また阻害剤を用いた検討から TRAF6 下流でこの AP-1 family の転写因子の発現がどのように制御されているのかを解明した。またこの AP-1 family の転写因子は NFATc1 の発現にも関与することが解明されていたので、実際に *Traf6*<sup>-/-</sup> 細胞にこの

転写因子を強制発現させた細胞を解析した所、*Traf6*<sup>-/-</sup>で減少していた NFATc1、TRAP 及び上述の融合に必須な2つの遺伝子の発現量の回復が認められた。これらの結果は TRAF6 が TRAP の発現と細胞融合を誘導する上でのこの AP-1 family の転写因子の重要性を強調していた。

また近年では TRAP 陽性単核細胞、pre-osteoclast = pre-OC とも呼ばれるが、これらの細胞が融合するには融合に必須な遺伝子の発現誘導に加えて、個々の pre-OC が互いに出会うために移動能を獲得する必要があることが分かってきた。しかしながらこれまで pre-OC の移動能に関して、RANKL 刺激がそれを獲得させる、といった僅かなことしか解明されておらず詳細な解析が待たれている。そこで本研究では *Traf6*<sup>+/+</sup>及び *Traf6*<sup>-/-</sup>pre-OC を用いて TRAF6 が pre-OC の移動能もまた制御することがあるのかを検討した所、TRAF6 が pre-OC の移動能を制御していることを示唆する解析結果を得た。

本研究では、これまで意見が分かっていた破骨細胞形成における TRAF6 の根本的な機能に関して TRAF6 が TRAP の発現と細胞融合に関与するというのを改めて解明し、さらに TRAF6 がそれらを制御する機構について、論文の組み合わせではなく実際に *Traf6*<sup>-/-</sup>細胞を用いて検討することでその一端を初めて解明した。

本研究で得られた成果が骨疾患に対する新たな治療戦略を考案する上で役に立つことを願って止まない。