

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 23 年度博士課程 進学
氏 名 辻 直也
指導教員名 秋山 徹

論文題目 破骨細胞における新規骨量調節因子 **Dennd2A** の生体内機能解析

第一章 序論

破骨細胞は骨吸収を担う主要な骨細胞種の一つであり、正常な骨代謝及び骨量維持に必須な役割を果たしている。破骨細胞は造血幹細胞由来のマクロファージ系前駆細胞から分化し、細胞融合により多核成熟化する細胞である。多核成熟化した破骨細胞は、Cathepsin K などのプロテアーゼ群や酸を分泌することで骨吸収を行う。破骨細胞の分化や機能制御の概要は明らかにされつつあるものの、骨量調節における破骨細胞分化・機能を制御する因子群の全容は明らかにされておらず、そのメカニズムも不明な点が多いのが現状である。

破骨細胞が正常な骨吸収を行うためには、細胞融合による多核成熟化が必須である。破骨細胞の融合・多核化には DC-STAMP をはじめとする様々な因子群が関与することが知られているが、細胞融合の際に起こるアクチン細胞骨格の再構築や細胞接着に寄与することが知られる Rho GTPase ファミリーをターゲットとする guanine nucleotide exchange factor (GEF)の重要性が近年明らかになってきた。Rac GTPase をターゲットとする GEF の一種である Vav 3 のノックアウトマウスは、破骨細胞の走化性やアクチンリングの形成に異常を認め、多核成熟化破骨細胞の減少による骨吸収不全を主原因とする、骨量増加の表現型を呈することが明らかにされた<Nature Med. 2005 11(3): 284-90. >。

Vav 3 と同様な GEF 活性を持つタンパク質ドメインとして DENN/MADD ドメインがよく知られている。DENN/MADD ドメインを有するタンパク質は 17 のファミリータンパク質が存在し、それぞれ特異的な GTPase をターゲットにもつ GEF として機能していることが報告されている<J. Cell Biol. Vol. 191 No. 2 367-381>。なかでも我々は、Rab 9 特異的に働く GEF として知られる Dennd2A が、マウスの成熟破骨細胞に強く発現していること、破骨細胞の分化過程に沿って発現が上昇することを見出した。

Dennd2A は C 末端側に DENN/MADD ドメインを有するタンパク質であるが、その生体内機能に関してはほとんど明らかにされていない。Vav 3 と同様な GEF 活性をもち、破骨細胞の分化過程で顕著に発現が上昇することから、成熟破骨細胞において重要な機能を有し

ていることが強く示唆された。そこで本研究では、Dennd2A のノックアウト(KO)マウスを作出し、その表現型解析を行なうことで Dennd2A が実際の生体内、特に骨代謝制御機構においてどのような機能を持つのか明らかにすることを目的とした。

第二章 Dennd2A 遺伝子欠損マウスの作出

KO マウスは、組織特異的な遺伝子欠損マウスの作出が可能な Cre/loxP システムを用いて行った。Dennd2A は 19 個の Exon から構成される 1000 個のアミノ酸からなるタンパク質である。Exon3 を欠損させると Exon2-4 の間でフレームシフトを起こすことができるため、Exon3 の 5'側及び 3'側に loxP 配列を挿入するよう targeting vector の設計を行った。BAC を鋳型とした PCR 増幅法により targeting vector を構築し、エレクトロポレーション法を用いて ES 細胞に導入した。ネオマイシンによる薬剤耐性を利用した選択の後、サザンブロットィング法により相同組換え体の確認を行った。取得した ES 相同組換え体をアグリゲーション法によりマウス 8 細胞期胚に導入し、得られたキメラマウスの germline transmission を確認した。キメラマウスを野生型マウスと交配して得られた Dennd2A flox マウスと、全身で Cre recombinase を発現する CMV-Cre トランスジェニックマウスを掛け合わせることで、全身で Dennd2A 遺伝子を欠損する Dennd2A total KO マウス(Dennd2A^{-/-})を作出した。生まれたマウスの遺伝子型をゲノム PCR によって調べたところ、Dennd2A のゲノム DNA の欠損を確認することができた。また、KO マウスから抽出した RNA を用いてリアルタイム PCR を行ったところ、KO マウスにおける Dennd2A の発現が 100%消失している事を確認した。

以上の結果より、Dennd2A flox マウス及び Dennd2A total KO マウス(Dennd2A^{-/-})の作出に成功した。

第三章 全身性 Dennd2A 遺伝子欠損マウスの表現型解析

1. 骨組織における表現型解析

まず初めに、作出した Dennd2A^{-/-} マウスの全身的な影響を調べたところ、Dennd2A^{-/-} マウスは lethality を示さず、対照群と比較して身長や体重、臓器重量には差を認めず、正常な生育を確認した。

次に X 線学的解析手法を用いた骨組織の表現型解析を行った。16 週齢において、軟 X 線撮影及び Dual energy X-ray Absorptiometry (DXA)法による骨密度測定を用いた骨解析を行ったところ、Dennd2A^{-/-} 雌マウスは対照群と比較して X 線透過性の低下を認め、大腿骨骨密

度の有意な増加を示した。また、マイクロ CT を用いた大腿骨海綿骨領域の 3D 画像解析においても *Dennd2A*^{-/-} 雌マウスは対照群と比較して有意な骨量増加を認めた。

この骨量増加の原因を探索するために骨形態計測を行ったところ、対照群と比較して *Dennd2A*^{-/-} マウスにおいて骨吸収パラメータの著しい低下を認めた。また血清中の骨吸収マーカーである TRAP-5b も *Dennd2A*^{-/-} マウスで低下していることがわかった。

2. 破骨初代培養細胞を用いた *in vitro* 解析

Dennd2A^{-/-} マウスの骨表現型解析により、*Dennd2A*^{-/-} マウスは成熟破骨細胞の減少による骨吸収不全を主要原因とする、骨量増加の表現型を呈することが明らかとなった。この骨表現型の分子メカニズムの一端を明らかにするべく、マウス的大腿骨骨髓細胞から単離した、破骨初代培養細胞を用いた *in vitro* 解析を行った。

対照群と *Dennd2A*^{-/-} マウスの骨髓中からマクロファージ様の破骨前駆細胞を単離し、分化成熟に必須な M-CSF と RANKL 存在下で培養することで、細胞同士が融合した多核成熟破骨細胞へと分化させた。分化誘導後 TRAP 染色を行い、TRAP 陽性且つ核の数が 3 つ以上の細胞を多核成熟破骨細胞としてカウントした。対照群と比較して *Dennd2A*^{-/-} マウスの骨髓中から単離した細胞は成熟破骨細胞の数が顕著に減少しており、骨量増加の表現型と一致するものであった。また分化の段階にそって細胞を回収し、それぞれから抽出した RNA を用いて破骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現を調べた。その結果、対照群と比較して *Dennd2A*^{-/-} マウス由来の破骨細胞は分化初期段階において、分化の master regulator である NFATc1 遺伝子の発現が低下していることがわかった。

以上の結果より、*Dennd2A* は破骨細胞の分化成熟過程において、分化を促進し成熟破骨細胞の数を増加させることで、骨量を負に調節する因子であることが明らかになった。

第四章 総合討論

本研究では、破骨細胞の分化・成熟に伴って *Dennd2A* の発現が上昇することに着目し、機能未知因子である *Dennd2A* の全身性遺伝子欠損マウスの作出および骨表現型解析を行うことで、骨代謝制御機構における *Dennd2A* の生体内機能の解明を試みた。

Dennd2A 遺伝子欠損マウスの作出

本研究では、Cre/loxP システムを用いることでより汎用性の高い *floxed* マウスの作出に成功した。*Dennd2A floxed* マウスと、目的の組織でのみ Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスを掛け合わせることで、組織特異的な *Dennd2A* マウスの作出が簡単に行える。今後、全身だけでなく、様々な組織特異的 *Dennd2A* 欠損マウスを作出することで、より詳

細な Dennd2A の生理機能の解明につながることを期待される。

Dennd2A は骨代謝制御機構において負の骨量調節因子として働く

Dennd2A は Vav 3 と同様に GEF 活性をもつ DENN/MADD ドメインを有するタンパク質であり、成熟破骨細胞に強く発現していることから、破骨細胞において重要な機能をもつ因子であることが示唆された。実際に全身性 Dennd2A 欠損マウスの骨表現型解析により、Vav 3 KO マウスとよく似た骨表現型を呈することが明らかになった。

Dennd2A^{-/-} 雌マウスは対照群と比較して X 線透過性の低下を認め、大腿骨骨密度の有意な増加を示す。この骨量増加は多核成熟破骨細胞の減少による骨吸収不全を主要原因とするものであることが、骨形態計測と破骨初代培養細胞を用いた *in vitro* 解析から明らかとなった。

しかし、この骨量増加の表現型は雌の KO マウスでのみ見られ、雄の KO マウスでは有意な差を認めなかったことから、雄の骨組織においては何らかの代替経路が存在し、Dennd2A 欠損による影響が表面化していないことが推察された。Vav 3 の上流に位置する非レセプター型 tyrosine kinase である c-Src は、破骨細胞の分化の際に M-CSF の受容シグナルを PI3 kinase と協調して下流に伝えることで、破骨細胞の分化を促進する因子であることが知られている。c-Src は女性ホルモン受容体である ER α と協調して破骨細胞の Cathepsin K や TRAP の分泌量を調節することや、アポトーシスによって破骨細胞の寿命を調節することも近年明らかにされつつあることから、雌において Dennd2A 欠損の影響がより顕著に現れる一因であることも推察される。今後、更に詳細な分子メカニズムとともに、雌雄における骨量調節機構の差異の究明にも期待がかかる。

また今後は、Dennd2A の特異的なターゲットとして知られている Rab 9 の欠損によっても同様の表現型を呈するかどうかなど、破骨細胞の分化や機能制御機構のなかで、GTPase や GEF がどのような意義をもつかを明らかにしていく必要がある。

総括

以上、本研究では全身性 Dennd2A 遺伝子欠損マウスを作成し、その骨表現型を解析することにより、骨代謝制御機構における Dennd2A の生体内機能の一部が、破骨細胞が担う骨吸収を正に制御することによる骨量調節への寄与であり、Dennd2A が新規骨量調節因子であることを解明することが出来た。今後、更に詳細な分子メカニズムが解明されれば、骨量調節における破骨細胞分化・機能を制御する仕組みの全容が明らかになることが期待できる。