

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 中村春彦

本研究は骨粗鬆症などの骨減少性疾患において重要な役割を持っていると考えられている破骨細胞の分化に関わる分子について明らかにするため、破骨細胞分化の過程でヒストン修飾が活性型に変化する遺伝子の同定、解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. マウスの骨髄細胞に M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) 及び RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) を加え破骨細胞に分化させる系にて、RANKL 刺激前後でヒストン修飾が準備状態である H3K4me3(+)H3K27me3(+) から活性型の H3K4me3(+)H3K27me3(-) に変化する遺伝子を ChIP シークエンスを用いて同定した。それらの中で細胞膜に発現する遺伝子に着目し、発現量解析から *Cd97* と *Pcdh7* を候補遺伝子として解析することとした。
2. マウスの骨髄細胞を破骨細胞に分化させる系で、*Cd97* および *Pcdh7* は分化に伴い発現量が上昇することが示された。また、同様の系で NFATc1 (Nuclear factor of activated T cells c1) の自己複製に関するカルシニューリンを抑制する効果を持つシクロスポリン A を投与し、*Cd97* と *Pcdh7* の発現に対する影響を調べたところ、*Cd97*、*Pcdh7* 双方ともにシクロスポリン A 非投与群に比べ発現が抑制され、これらの分子は NFATc1 により制御されている可能性が示された。
3. マウスの骨髄細胞を破骨細胞に分化させる系でレトロウイルスを用いた shRNA の導入による *CD97* と *Pcdh7* の発現抑制実験を行った。*Pcdh7* の発現抑制では shLuc 群に比較し破骨細胞の形成が有意に減少していたが、*CD97* の発現抑制では有意差は生じなかった。また、破骨細胞の骨吸収能について pit formation assay を行ったが、*CD97* 発現抑制群、*Pcdh7* 発現抑制群ともに、shLuc 群に対して吸収窩の量に明らかな有意差は見出せなかった。したがって、*Pcdh7* は破骨細胞の分化に関連する遺伝子であると考えられた。
4. *Pcdh7* の発現抑制の系で RANKL 刺激後の破骨細胞分化及び機能に関連する遺伝子発現を定量的逆転写 PCR での解析の結果、*Dstamp*、*Ocstamp* 及び *Atp6v0d2* 等の破骨細胞の融合・多核化に関連する遺伝子の発現が shLuc 群に比べ有意に低下していることが示された。したがって、*Pcdh7* は破骨細胞の融合に働く遺伝子である可能性が考えられた。

5. **Pcdh7** の発現抑制の系で、**RANKL** 刺激後の破骨細胞数および核数をイメージングサイトメーターを用いて評価した。**Pcdh7** の発現抑制群では **shLuc** 群に比べ 9 核以上の破骨細胞の数が減少しており、破骨細胞の融合が抑制されていることが示された。したがって、**Pcdh7** は **NFATc1** の制御下で破骨細胞融合関連遺伝子の発現を促進することにより破骨細胞融合を誘導すると考えられた。

以上、本論文は破骨細胞の分化におけるヒストン修飾の変化に関する解析から、新しい破骨細胞分化に働く分子 **Pcdh7** の存在を明らかにした。本研究は、いまだ未知な部分が残されている破骨細胞分化における分子間ネットワークの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。