

博士論文版号 : 0881022

破骨細胞分化過程におけるスフィンゴ脂質代謝
関連遺伝子の機能解析

包.錫林其其格
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞増殖学講座
(竹家 達夫 教授)

平成 21 年 1 月 28 提出

目 次

目次	1
序論	3
骨代謝	3
破骨細胞及び分化	3
RANKL-RANK シグナル	4
酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASM)	6
スフィンゴ脂質	7
材料と方法	14
培地、試薬	14
細胞培養	14
可溶性 RANKL	15
破骨細胞分化誘導	16
発現ベクター構築	17
細胞への遺伝子導入・レトロウイルス産生	21
TRAP 染色法	21
細胞抽出液の回収とタンパク質定量、ウイスタンブロットティング法	22-23
培養細胞からの全 RNA 抽出	24
RT-PCR 及びリアルタイム PCR	25
ASM の酵素活性測定	27
結果	28
ASM は NFAT2 の下流で発現誘導される	28
破骨細胞における ASM の役割	28
ASM は SphK1 と SphK2 の発現を調節する	29

SphK1 と SphK2 の破骨細胞形成への逆効果.....	31
考察	46
謝辞	48
参考文献	50

序 論

骨代謝

脊椎動物において、骨はその体系を維持するための支持器官、外力から内臓を保護するための防御器官として機能するだけでなく、カルシウムなどのミネラルの貯蔵や造血系細胞産生の場合など生理的な機能も有する。これらの機能を維持するために、骨は、ほかの臓器と同様、常に骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収を繰り返す代謝を行っている（参考図 1.A）。この両過程により骨代謝のバランスが保たれることで、骨量は一定に保たれている（Harada and Rodan, 2003; Teitelbaum and Ross, 2003）。このバランスの破綻は骨粗鬆症、大理石骨病などの様々な骨疾患を引き起こすことが知られている（参考図 1.B）。これら骨疾患の根本的治癒には骨代謝機構の解明が不可欠なものであると考えられる。

破骨細胞及分化

破骨細胞は生体内で骨を分解出来る唯一の細胞であり、単球/マクロファージ系造血細胞を前駆細胞とし、未分化間葉系細胞由来である骨芽細胞が産生する破骨細胞分化誘導因子により分化が誘導される。分化誘導因子としては M-CSF (macrophage colony stimulating factor) および RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) が必須であることが明らかにされている。

in vivo では、分化誘導因子 RANKL が前駆細胞に発現する RANK に作用することにより単核破骨細胞へと分化を開始し、さらに細胞融合を経て成熟多核破骨細胞が形成される（参考図 2.A）。一方、初代骨髄細胞、RAW264 細胞を用いた *In vitro* 分化誘導系が確立されており、72-96 時間の培養により骨吸収活性を有する多核破骨細胞が形成される（参考図 2.B）。

骨吸収を担う破骨細胞は、2～数十の核をもつ多核細胞であり、主に海綿骨表面に埋没するように局在する。破骨細胞は明帯と呼ばれるリング状の領域で骨表面に接着している。明帯はアクチンフィラメント、インテグリンに富み、骨の認識、接着や運動に関与していると考えられている。また、明帯内部の細胞膜は波状縁と呼ばれる膜構造を形成する。波状縁上には H^+ ATPase が局在し、プロトン能動輸送により骨表面側へ放出することで、破骨細胞と骨表面間の微小環境が酸性となり無機骨基質が溶解される。また波状縁を介してカテプシン K や酸性フォスファターゼなどの加水分解酵素が骨基質側へ放出され、有機骨基

質であるコラーゲンなどが分解される。分解されたタンパク質は破骨細胞に取り込まれ、エンドサイトーシスにより細胞外へ放出され血液へ送られる。また、遊離したカルシウムは細胞内に取り込まれ、破骨細胞の外側壁膜に局在する Na^+ ポンプにより細胞外へ能動輸送されると考えられる。

大理石病を表現型とする自然変異マウス系統の1つである *op/op* マウスはマクロファージや破骨細胞が存在しない。*op/op* マウスでは M-CSF ORF 上にチミン(T)の挿入変異があり、フレームシフトを起こした結果、活性のある M-CSF が存在しないことが明らかとなった (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990 ; Yoshida et al., 1990)。破骨細胞において M-CSF 刺激により、転写因子 Mitf(microphthalmia transcription factor)が活性化され(Weilbaecher et al., 2001)、アポトーシスを制御する Bcl-2 の発現を Mitf が誘導することが報告されており(McGill et al., 2002)、また Bcl-2 欠損マウスにおいて大理石病が引き起こされることも報告されている。*op/op* マウスにおいて Bcl-2 を過剰発現するとマクロファージや破骨細胞が出現し、大理石病の症状が軽減されることから(Lagasse and Weissman, 1997)、破骨細胞において M-CSF は分化誘導よりも主にマクロファージや破骨細胞の生存維持を担っていると考えられている。

一方、RANKL は破骨前駆細胞の細胞膜上に発現している受容体 Receptor Activator of NF-kappa B (RANK)との結合を介して細胞内にシグナルを伝え破骨細胞への分化を誘導する。RANKL ノックアウトマウスおよび RANK ノックアウトマウスにおいては、破骨細胞欠損による大理石病を呈することから、RANKL-RANK シグナルが破骨細胞分化に必須であることが明らかとなった。また、RANKL デコイレセプターである OPG のノックアウトマウスは成熟破骨細胞過形成による骨粗鬆症、関節炎を引き起こすことが知られている (Bucay et al.,1998)。このことから、OPG は RANKL シグナルを負に制御することにより、破骨細胞の分化を抑制していると考えられる (Li et al., 2000 ; Theill et al., 2002)。

RANKL-RANK シグナル

RANK の細胞内ドメインには、アダプター分子である TRAF (TNF receptor-associated factor)ファミリーが結合する。その細胞内ドメインには3箇所の TRAF6 結合サイト、2箇所の他の TRAF ファミリー (TRAF2、TRAF3、TRAF5) 結合サイトが確認されている (Galibert et al., 1998; Hsu et al., 1999 ; Ye et al., 2002 ; Gohda et al., 2005)。TRAF ファミリーの中でも TRAF6 ノックアウトマウスは大理石病を呈することが2つのグループから報告されていることから(Lomaga et al., 1999 ; Naito et al., 1999)、破骨細胞分化において TRAF6 が RANK のアダプター分子として最も重要であるとされている。TRAF6 の下流では、

NF- κ B、MAPKs (p38、JNK、ERK)などが活性化される(参考図 3)(Wong et al., 1998 ; Matsumoto et al., 2000 ; Hotokezaka et al., 2002)。

活性化された MAPKs により、破骨細胞分化過程において主要な転写因子である AP-1 (activator protein-1)が活性化される。AP-1 は Fos ファミリー (c-Fos、FosB、Fra-1、Fra-2)、Jun ファミリー (c-Jun、JunB、JunD)から形成される 2 量体タンパク質である。Fos ファミリーはホモダイマーを形成せず Jun ファミリーとヘテロダイマーを形成するのに対し、Jun ファミリーはホモダイマー及びヘテロダイマーを形成する (Chinenov and Kerppola 2001 ; Wagner and Eferl 2005)。AP-1 構成タンパク質のうち、c-Fos ノックアウトマウスは大理石病を呈し (Jonson et al, 1992 ; Wang et al, 1992)、また c-Fos の下流で Fosl-1/Fra-1 が誘導されること、Fra-1 を発現させることで *c-fos* 遺伝子欠損における破骨細胞分化をレスキューできること、から破骨細胞分化において Fra-1 は c-Fos の主たる標的因子の一つであることが示唆された (Matsuo et al., 2000 ; Fleischmann et al., 2000)。c-Jun シグナルも NFAT2 や RANK によって制御される破骨細胞分化において重要な役割を果たすことが報告され (Grigoriadis et al., 1994 ; Ikeda et al., 2004)、AP-1 が破骨細胞分化過程において必須であると考えられている。

破骨細胞の分化異常、特に骨吸収活性の異常亢進は骨粗鬆症の原因になることから、その分化機構の解明は重要な課題であり、多くの研究がなされてきた。当研究室では、マウスマクロファージ由来細胞株 RAW 264 に RANKL を添加することにより成熟破骨細胞へと分化させる *in vitro* 分化誘導系を用いて、破骨細胞の分化機構の解明を行ってきた(参考図 2.B)。これまでの当研究室における研究及び、高柳らによる研究から、RANKL 刺激後に発現誘導される NFAT2 (nuclear factor of activated T cells-2)が破骨細胞分化過程において必須な転写因子であることが明らかとなった (Ishida et al., 2002; Takayanagi et al., 2002)。NFAT2 の発現や核内移行を阻害すると分化が抑制されること、また破骨前駆細胞に NFAT2 を発現させると RANKL 刺激がなくても成熟破骨細胞へ分化することから (Takayanagi et al., 2002 ; Hirotsu et al., 2004)、NFAT2 は分化に必要なかつ十分な転写因子であり、破骨細胞分化過程において中心的な役割を担っていることが明らかにされた。また *c-fos* 欠損マウス初代骨髄細胞では、RANKL 刺激に伴う NFAT2 の誘導が全く認められなかったが、恒常活性型 NFAT2 を発現させると RANKL 刺激により破骨細胞へ分化したことから (Matsuo et al., 2004 Takayanagi et al., 2002)、RANKL シグナル伝達において c-Fos の下流に NFAT2 が存在していることが明らかとなっている。さらに、TRAF6 欠損マウス由来初代骨髄細胞では、RANKL 刺激による NFAT2 の誘導がわずかに認められること (Takayanagi et al., 2004)、NF- κ B によっても NFAT2 が活性化される (Asagiri et al, 2005)ことから、NFAT2 は RANKL 刺激後、NF- κ B、c-Fos により TRAF6 依存的、または非依存的

に誘導されることが示唆されている(参考図.3) (Hogan et al., 2003 ; Tanaka et al., 2003 ; Ishida et al., 2006)。

酸性スフィンゴミエリナーゼ Acid Sphingomyelinase (ASM)

われわれの研究室では、破骨細胞分化における鍵因子 NFAT2 の標的遺伝子を探索し、それら遺伝子の機能解析を行うことにより未だ不明な点が多い破骨細胞の細胞融合機構、骨吸収機構を明らかにできると考えた。そこで *in vitro* 破骨細胞分化誘導系を用いて、1) RANKL 依存的に発現誘導される遺伝子群のうち、2) NFAT2 核内移行阻害剤であるシクロスポリン A(CsA) 処理によりその発現が抑制される遺伝子群を DNA チップ解析にて網羅的に探索した (Ishida et al., 2006)。その結果、酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASM) が標的候補遺伝子の一つとして見出された。

スフィンゴミエリナーゼ (SM) は細胞の脂質二重層を構成する 4 つの主要なリン脂質の 1 つであるスフィンゴミエリンを加水分解してセラミドとフォスフォコリンを産生する酵素であり、反応する最適 pH により中性、アルカリ性及び酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASM) に分類される(参考図 4.A)。ASM はリソソームに存在する 2 価カチオン非依存性 ASM と Zn 依存性の分泌性 ASM が知られているが(Russell et al., 2009)、両者とも同じ遺伝子由来でありヒト及びマウス遺伝子がクローニングされている。ASM は小胞体からリソソームへ運ばれる間に広範囲のプロセッシングを受ける。ASM は細胞外からのシグナルに応じてカベオラまたはラフトに局在が変化する。例として CD95 による刺激により ASM が細胞膜に移行して、さらにスフィンゴ脂質に富むラフトに局在してセラミドを産生し、細胞死を起こすことが報告されている。(Grassme et al., 2001; Cremestiet al., 2001)。ヒト ASM 遺伝子はスフィンゴミエリンやコレステロールが肝臓、脾臓、肺、中枢神経などへ蓄積する遺伝疾患であるニーマンピック病 A・B 型の原因遺伝子として知られている (Brady et al., 1996)。さらに遺伝子組み換えにより生み出された ASM ノックアウトマウス由来細胞はアポトーシスを引き起こすシグナルに対し抵抗力を示すことが知られているが(Schissel et al., 1996)、ASM の反応産物であるセラミドがアポトーシスを正に制御する結果であると考えられている (Adriana et al., 1997)。また、破骨細胞については SM が F-actin リングの形成や骨吸収を抑制することが報告されているが (Hiroyuki et al., 1998)、その詳しいメカニズムはまだ解明されていない。

ASM の触媒作用により生成されたセラミドやその代謝物は、アポトーシスや細胞の分化、増殖など、多彩な現象に関わるシグナル分子として機能することが知られていることから、破骨細胞分化鍵因子の制御下で ASM が発現するこ

とはASMの反応生成物であるセラミドおよびそのさらなる代謝産物が破骨細胞分化において重要な役割を果たしている可能性が考えられる(参考図 4.B)。近年、ASMを含むスフィンゴ脂質代謝と細胞内情報伝達機構との関連性について様々な研究が行われているが、破骨細胞におけるスフィンゴ脂質とその代謝の意義に関して未だ不明な点が多く残されている。

スフィンゴ脂質

スフィンゴ脂質は生体膜脂質を構成する一群の脂質であり、細胞内ではL-Serを初発基質として生成・代謝される。L-セリンは細胞にとっては非必須アミノ酸ではあるが、他のアミノ酸、フォスファチジルセリン、神経調節物質の合成前駆体として働く他、細胞増殖時においてデオキシチミジン 1 リン酸の新規合成にも必要であり、また脳の発達と機能にも重要であることが知られており、L-セリンは条件的に細胞にとっては重要であると考えられる (de Koning et al., 2003)。セリン代謝経路の一つとして、*de novo* セラミド合成に続く様々なスフィンゴ脂質代謝経路がある (参考図 4.B)。セリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT)及びその後の一連の *de novo* セラミド代謝系により生体膜脂質微小領域(ラフト)の構成成分の1つであるスフィンゴ脂質に転換される。神経細胞、特に小脳プルキンエ細胞の生存維持、軸策や樹状突起形成はスフィンゴ脂質合成に依存し、スフィンゴ脂質の枯渇はアポトーシスによる細胞死が引き起こされる。

またスフィンゴ脂質は生体膜構成成分であるだけでなく、セラミドやその代謝物はアポトーシスや細胞の分化、増殖など、多彩な現象に関わるシグナル分子として機能することが知られている (Kitatani et al., 2008, Hait et al., 2006)。スフィンゴ脂質に由来するS1Pは、セラミドからスフィンゴシンへと代謝され、スフィンゴシンキナーゼによるリン酸化を受け生成され、細胞の分化や増殖、運動性、アポトーシスといった現象に関わる分子である (Spiegel et al., 2003 ; Futerman and Hannun et al., 2004)。また、細胞表面のS1P受容体に結合し、血管形成やリンパ球の遊走に関わるホルモン様の作用をもち、一方細胞内ではカルシウムの流入を引き起こす二次情報伝達物質としての作用を兼ね備えたユニークな脂質メディエーターとして知られている。

今までの研究によって、細胞内のセラミドはスフィンゴミエリナーゼ経路、*de novo* 経路、及びサルベージ経路などの複数の代謝経路によって代謝され、そこで、SPT、及びスフィンゴシンキナーゼ(SphK)はそれぞれ重要な役割を果たしていることが明らかになっている。そして、セラミドはセラミダーゼによってスフィンゴシンへ分解され、逆に再-アセチル化にてセラミドを再生できる。また、スフィンゴシンはSphKにリン酸化され、S1Pを産生する。この様に、スフ

インゴシンセラミドの相互交換は複数の経路によって制御され (Hait et al., 2006; Zeidan et al., 2010)、細胞中のセラミドの量が調節されていると考えられる (参考図 4.B)。

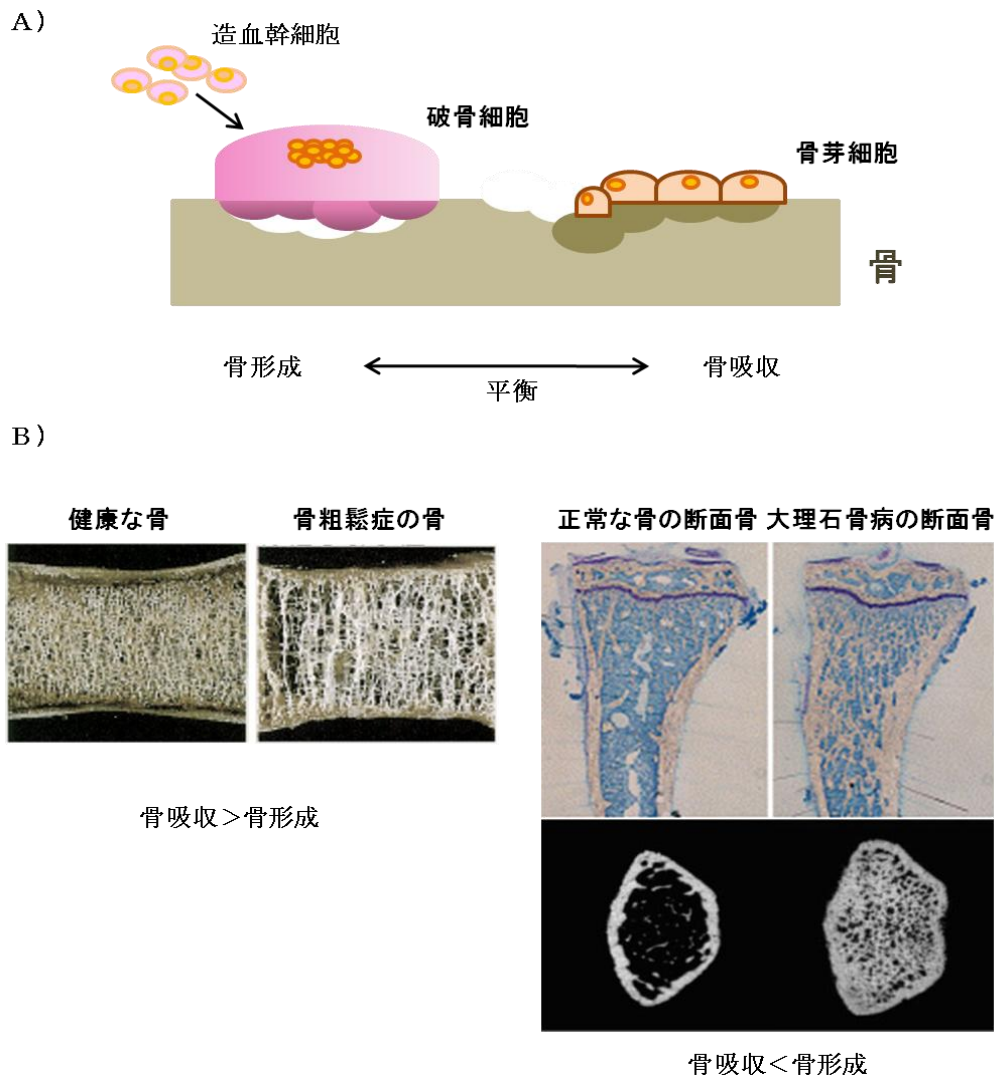
破骨細胞において、膜上に形成されるラフトには RANKL のレセプター、RANK が局在すると考えられており、ラフトの崩壊により破骨細胞の生存と骨吸収能が低下すること (Ha et al., 2003)、またグルコシルセラミド合成酵素阻害剤 (D-PDMP) を処理することでラフト構成成分のスフィンゴ糖脂質合成が阻害され、破骨細胞分化、MAPK、 $I\kappa B$ のリン酸化が抑制されることが報告されている (Fukumoto et al., 2006) ことから RANKL/RANK シグナルにおいてスフィンゴ脂質およびラフトが重要であることが示唆されている。

また破骨細胞におけるスフィンゴ脂質の機能は、ラクトシルセラミドが破骨細胞分化に必須であることや、スフィンゴシンからスフィンゴシン-1 リン酸 (S1P) を生成するスフィンゴシンキナーゼ 1 (SphK1) が破骨細胞分化の負の制御因子であることなどが知られている。SphK には 2 つのアイソタイプがあり (SphK1/SphK2)、スフィンゴシンからスフィンゴシン 1 リン酸へのリン酸化反応を触媒する点では共通していますが、細胞内での局在、セラミド量の制御機構など、それぞれ異なる性質を有することも知られている (参考図 5)。また当研究室ではスフィンゴ脂質合成初発酵素セリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) の基質である L-Ser が破骨細胞分化に必須であること、また破骨細胞形成を阻害する L-Ser アナログ H-Ser(tBu)-OMe·HCl が SPT によって 3-ketodihydrosphingosine が合成されるのを阻害することを見出しており、破骨細胞においてスフィンゴ脂質が重要な機能を担うことが予想されてきた。破骨細胞の分化との関連では、S1P が破骨細胞分化に関与するという報告がある (Ryu et al., 2006)。SphK をノックダウンしたマウス骨髄マクロファージでは破骨細胞分化が促進されることから、S1P が破骨細胞分化を抑制する可能性が示された。

SphK1 と SphK2 は、スフィンゴ脂質代謝、細胞増殖及びアポトーシスにおいて弁別的に機能していることも証明されている (Maceyka et al., 2005)。しかしながら、SphK1 と SphK2 の発現と機能の主なメカニズムは不明瞭である。

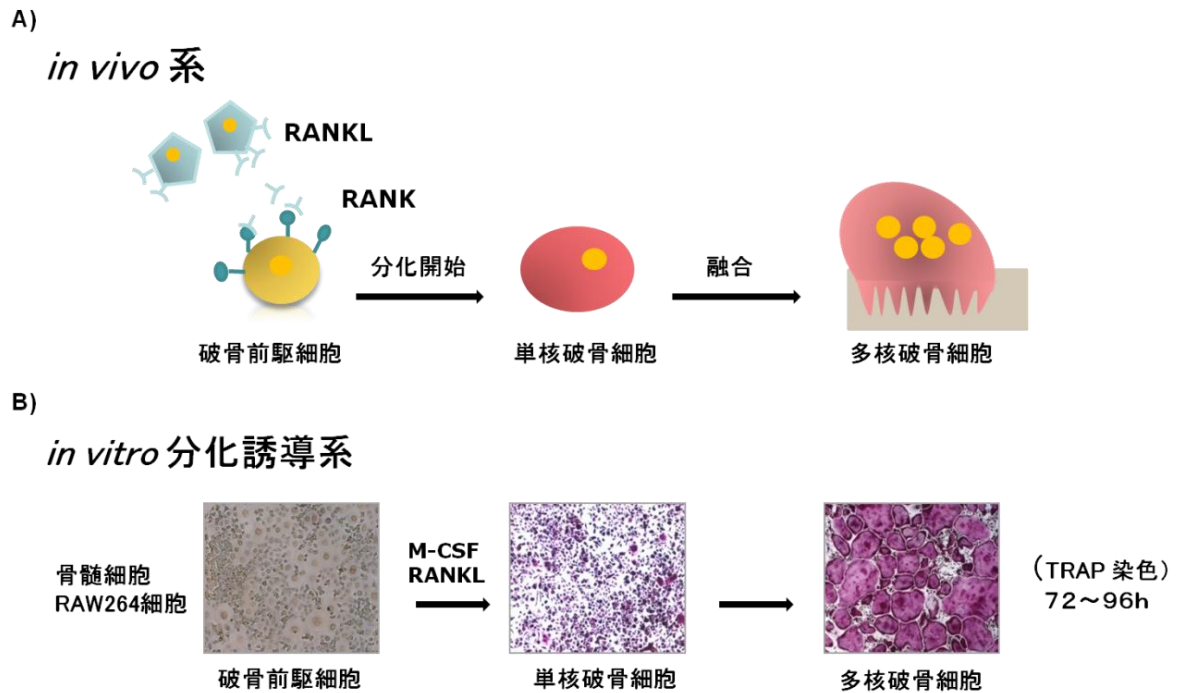
本研究の目的

以上の知見に基づき、本研究では、スフィンゴ脂質代謝経路とその分子機構に関して、破骨細胞分化における ASM の作用の検討を中心に、その分子レベルでの解析を行うことを目的とした。



参考図.1 骨代謝と疾患

- A) 骨代謝のモデル図。
- B) 骨代謝異常によって引き起こされる骨疾患例。骨吸収活性が優勢となると骨内腔海綿骨の減少など骨粗しょう症となる。一方、骨形成が優勢となると骨密度の増加とともに、骨内腔が海綿骨により埋め尽くされて骨髓領域が減少する大理石骨病となる。



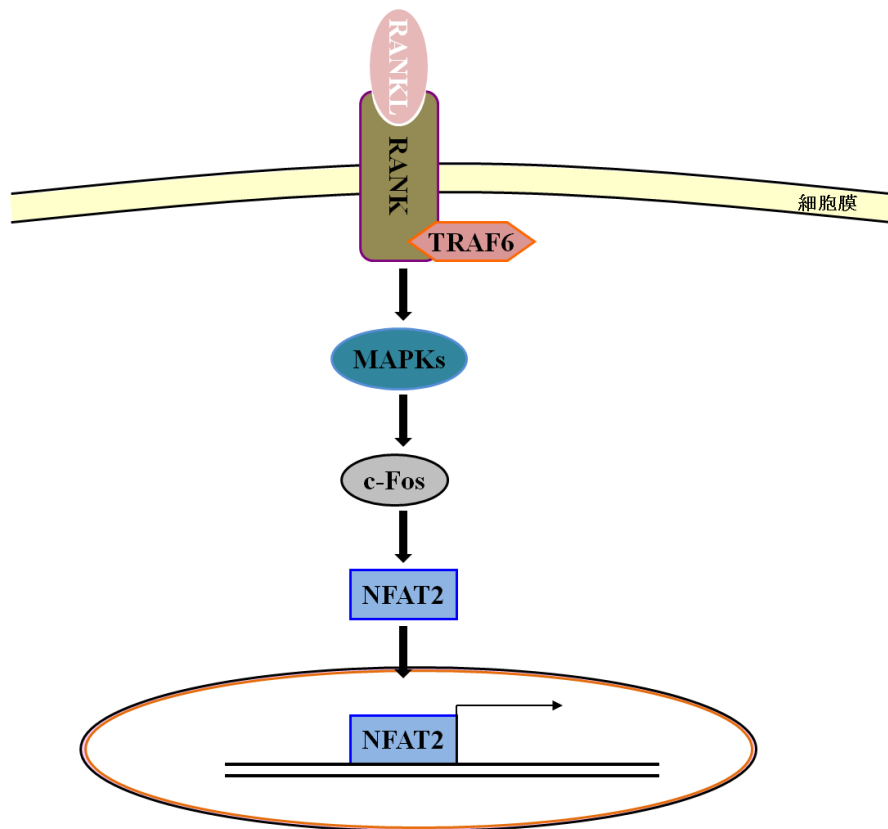
参考図. 2 破骨細胞分化過程

- A) *in vivo* では、単球・マクロファージに由来する破骨前駆細胞が破骨細胞により提示された分化誘導因子 RANKL 刺激により分化を開始する。RANKL 刺激により酒石酸耐性フォスファターゼ陽性単核破骨細胞へと分化した後、細胞融合を繰り返し、骨吸収能を持つ多核成熟破骨細胞へと分化する。(写真は各分化段階における細胞を TRAP 染色したもの。)
- B) 初代骨髓細胞、RAW264 細胞を用いた *In vitro* 分化誘導系が確立されており、72~96 時間の培養により骨吸収活性を有する多核破骨細胞が形成される。

RANKL: Receptor Activator of NF kappaB Ligand

MCSF: Macrophage-Colony Stimulating Factor

TRAP: Tartrate-Resistant Acid Phosphatase

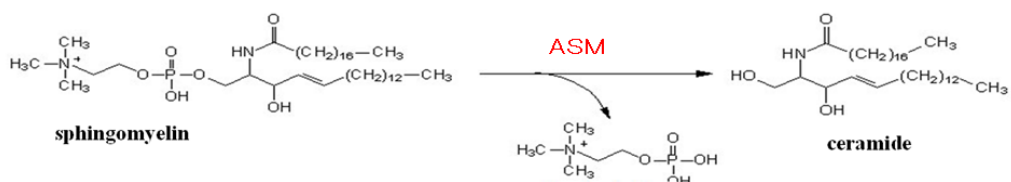


参考図.3 RANKL/RANK シグナル伝達経路

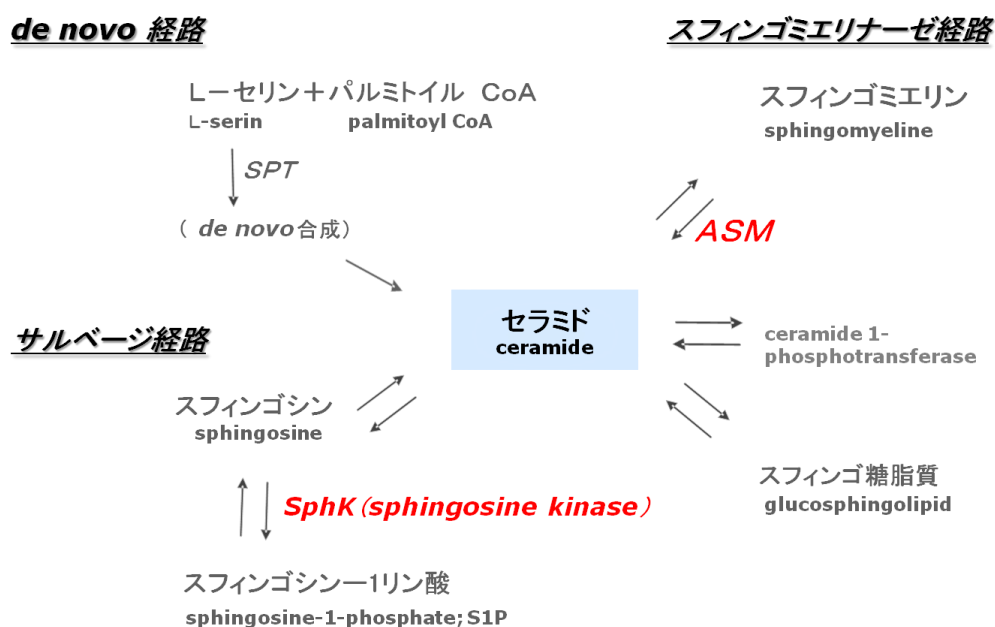
破骨細胞の分化過程において、RANKL-RANK シグナル伝達経路は中枢的な分化制御系として知られている。RANKL は、その受容体である RANK、さらに TRAF6、MAPKs (p38,ERK,JNK) などの活性化を介して、c-Fos や NFAT2 など破骨細胞分化に必須の遺伝子の発現を誘導する。

A)

ASMの酵素反応式

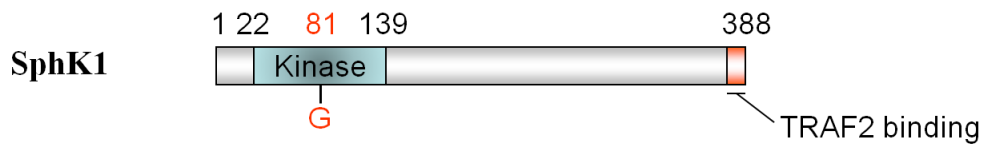


B)

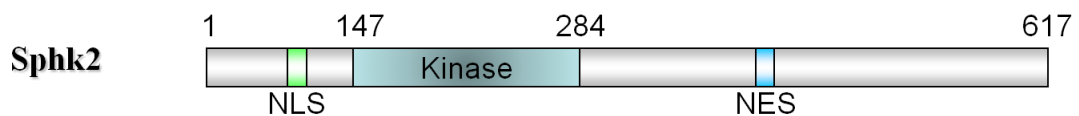


参考図.4 ASM 及びスフィンゴ脂質代謝経路の概要

- A) ASM は酸性条件で、スフィンゴミエリンを加水分解し、セラミドを生成する。
B) スフィンゴミエリナーゼ経路、*de novo* セラミド合成経路に続く様々なスフィンゴ脂質代謝経路がある。



- 分子量:約49K
- TNF- α によるアポトーシスシグナル系への関与
- Erk、PKCによる酵素活性並びに局在の制御



- 分子量:約65K;核、小胞体に局在する
- SPP1(スフィンゴシンホスファターゼ)と共役してセラミド量を増加させる
- 機能に関しては不明な点が多い

参考図.5

スフィンゴシンキナーゼには2つのアイソタイプがあり(SphK1/SphK2)、それぞれここに示す特徴をもっている。スフィンゴシンからスフィンゴシン1リン酸へのリン酸化反応を触媒する点では共通していますが、細胞内での局在、セラミド量の制御機構など、それぞれ異なる性質を有することも知られている。

方法と材料

【培地・試薬】

Eagle's MEM

4.7g の Eagle's MEM [ニッスイ]を 500 mL の培地用蒸留水に溶かし、120°C、20 分間、高圧蒸気滅菌した。その後、室温まで冷ました培地に、5 mL の L-グルタミン [200 mM SIGMA]、12.5 mL の 7.5 % NaHCO₃ 溶液、5 mL の MEM NEAA (non-essential amino acid[GIBCO])、50 mL のウシ胎児血清 [Thermo]を添加した。尚、L-グルタミン添加以降は、培養室のクリーンベンチ内で無菌操作を行った。

α-MEM

α-MEM [Wako]にペニシリン (50 U/mL [明治製菓]を 1/100 濃度で使用)、ストレプトマイシン (50 mg/mL [明治製菓] を 1/100 濃度で使用)(※ 以下 PS)、ファンギズン (500 µg/mL を 1/500 濃度で使用)、非動化 FBS を 10%量添加し、使用直前に M-CSF CM(M-CSF condition medium)を必要量添加し、初代骨髄細胞の実験に用いた。

M-CSF CM

M-CSF 発現 NIH3T3 細胞クローン 3 を 20 枚の 100 mm ディッシュ[CORNING]に播種し、D-MEM(1% PS, 10% FCS)で 100%コンフルエントになるまで培養した。PBS で細胞を 2 回洗い、α-MEM 10 mL に交換して 5 日間培養した。培養上清を回収後、0.2 µm フィルターに通し、適量に分注して-30°Cで保存した。以下、この M-CSF を用いて初代骨髄細胞から破骨細胞分化誘導を行った。

【細胞培養】

RAW264 細胞

マウスの単球マクロファージ由来である RAW264 を播種し、37 °C、CO₂ 濃度 5 %において 10 %FBS 含有 Eagle's MEM 培地で培養した。継代は以後 3 日ごとに 1/10 継代を行った。

初代培養細胞

試薬：

α-MEM

26 G ニードル

セルストレーナー[BD Falcon]

溶血 buffer (0.16 M NH₄Cl : 0.17 M Tris-Cl (pH6.5) = 9:1)

M-CSF CM

方法：

マウスの大腿骨および脛骨から 26 G ニードルを用いて骨髓液を 100 mm ディッシュの 10 mL α -MEM に回収した。クリーンベンチ内で、回収した骨髓液をセルストレーナーにかけ濾過後、遠心(1500 rpm、3 min)してペレットを回収した。次に溶血 buffer を 2 mL 加え、室温で 2 分間静置し、溶血処理を行った。その後、遠心(1500 rpm、3 min)でペレットを回収し、10 mL α -MEM を加え懸濁し、再び遠心(1500 rpm、3 min)を行うことで溶血 buffer を取り除く作業を 2 回行った。そのあと、ペレットを 4 mL の α -MEM で懸濁し、4 枚の 100 mm ディッシュに 1mL ずつ播種し、1/200 量の M-CSF CM を加えた α -MEM で一晩培養を行った。翌日、上清中を回収し、浮遊系の細胞を回収し、遠心(1500 rpm、3 min)後ペレットを 20~30 mL の α -MEM で懸濁し血球計算版を用いて細胞を数えた。得た骨髓細胞を 8×10^5 cells / mL に希釈し、100 mm ディッシュに播し、10 mL α -MEM に 1/5 量の M-CSF CM を添加し三日間培養を行い、培養後、接着系骨髓細胞のみを回収しこれを初代培養細胞として実験に用いた。

【可溶性 RANKL】

試薬：

Super Broth 培地(Tryptone Peptone 25 g、BactoTMYeast Extract 15 g、NaCl 5 g)

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)

NET buffer (20 mM Tris pH 8.0、100 mM NaCl、1 mM EDTA)

NETN buffer (20 mM Tris pH 8.0、100 mM NaCl、1 mM EDTA、0.5% NP-40)

Glutathione SepharoseTM4B [Amersham Pharmacia Biotech AB]

Glutathione-NaCl buffer (100 mM Tris pH 8.0、120 mM NaCl、20 mM glutathione) *pH がアルカリ性でありことを確認する

Detoxi-GelTM Endotoxine Removing Gel [PIERCE]

Sodium deoxycholate (1% SDOC)

方法：

可溶性 RANKL の発現ベクターは、RANKL の C 末端領域 244 アミノ酸を pGEX-2TK に挿入したものである (Meiyanto E et al.,2001)。この pGEX-2TK-RANKL 及び、発現ベクターである pGEX-2TK をそれぞれ大腸菌

JM109 へ導入して組み換えタンパク質の発現に用いた。これらの大腸菌を Super Broth 培地 50 mL(アンピシリン終濃度 50 ng/mL)中において 37°Cで 8 時間、前培養をし、続いて培地 500 mL あたり前培養液を 5mL 加え、OD₆₀₀ が 0.6~0.8 の範囲内になるまで 37°Cで培養を (計 6 L)を行った (約 3 時間)。次に IPTG を終濃度 0.25 mM になるように培養液に添加してタンパク質の発現誘導を開始し、約 6 時間、18°Cで培養した。

全ての培養液を遠心 (6000 rpm、4°C、15 min)して集菌し、上清を捨てたのち、主培養液 1 L 分の集菌量あたり 40 mL の NET buffer に懸濁し新しいチューブに移し再度遠心 (600 rpm、4°C、15 min)した。上清を捨て、氷上で 40 mL の NETN buffer に懸濁しソニケーション (20 sec×4回)を行って大腸菌を破砕した。遠心 (9000 rpm、4°C、30 min)して上清を新しいチューブに移し、この操作をもう一度繰り返して目的のタンパク質を含む溶液を得た。約 40 mL の上清あたり、あらかじめ NETN buffer で平衡化した Glutathione SepharoseTM4B (50% slurry)を 1 mL 加えて 4°Cで 8 時間反応させた。

反応液を遠心 (3000 rpm、4°C、2 min)して上清を除き、ビーズを氷冷した PBS で 5 回洗い、最後に 27G ニードルを用いて PBS を出来る限り取り除いた。Glutathione Sepharose 1 mL あたり 1.6 mL の Glutathione-NaCl buffer を加えて低温室で 2 時間反応させ、タンパク質を溶出した。全液を 1.5 mL エッペンチューブに分注し、遠心 (6000 rpm、4°C、1 min)した後、ビーズの混入を防ぐために上清を新しい 15 mL チューブに回収し、クリーンベンチ内で 0.2 μm フィルターに通した。破骨細胞分化誘導に対するエンドトキシンの影響を極力除くために、エンドトキシン除去カラム (Detoxi - GelTM Endotoxine Removing Gel)に通した。方法は添付のプロトコールに従って行った。SDS-PAGE を行って CBB 染色により組み換えタンパク質が十分回収されている事を確認した後、得られた RANKL に最終量の 1/100 量の 10%BSA を加え、50%Glycerol ストックになるように Glycerol を加えてエッペンチューブに各 150 μL ずつ分注し、-30°Cで保存した。

【破骨細胞の分化誘導】

RAW264 細胞及び初代骨髄マクロファージを 5×10^4 cells/mL になるように播種し、37°C、CO₂ 濃度 5%の条件において 24 時間培養した。その後、可溶性 GST-RANKL 250 ng/mL を含んだ培地と交換し、同様の条件で培養した。培地交換 72 時間後、再度調製した可溶性 GST-RANKL を含んだ培地と交換し、24 時間培養した。

【発現ベクターの構築】

ASM(smpd1)発現ベクターの作成

マウス ASM cDNA は、マウス単球から調製した cDNA から下記のプライマーを用い、PCR で増幅した。

プライマー	核酸配列
mSMPD1F	GGAATTCTGTCTACGAGCCTGGCAATG
mSMPD1dTR	GGAATTCTCGCACAAACAGGGGGCGTGAC

反応条件

98°C 2min

98°C 10sec

62°C 15sec

72°C 2sec

72°C 7min

4 °C

40 cycles

増幅した PCR 産物を pCX4MF-ble の *EcoR* I サイトに組み込み、pCX4MF-mASM-ble を作製した。

SphK1/2、SphK1(G81D)、SphK2(G213D)発現ベクターの作成

マウス SphK1/2、SphK1(G81D)、SphK2(G213D)の cDNA は、RANKL 刺激後 96 時間後の RAW264 細胞から調製した cDNA から下記のプライマーを用い、PCR で増幅した。

	プライマー	核酸配列
SphK1	mSphK1_FL_F	GGAATTCATGGAACCAGAATGCCCTCG
	mSphK1_FL_R	GCGGCCGCTTATGGTTCTTCTGGAGGTG
SphK1 (G81D)	mSphK1(G81D)_F	GTCCGGTGATGATCTGATGCATGAGGTGG
	mSphK1(G81D)_R	CCACTTCATGCATCAGATCATCACCGGAC
SphK2	mSphK2_FL_F	CGGAATTCATGGCCCCACCACCTACTGCCAGT
	mSphK2_FL_R	GCGGCCGCTGGTTCCACCAACTCGCCATGCTT
SphK2 (G213D)	mSphK2(G213D)_F	GTCTGGAGACGATCTGCTTTACGAGG
	mSphK2(G213D)_R	CCTCGTAAAGCAGATCGTCTCCAGAC

反応条件 (SphK1)

98°C 2min	
98°C 10sec	} 5 cycles
57.4°C 5sec	
72°C 75sec	
98°C 10sec	
64.2°C 5sec	} 25 cycles
72°C 75sec	
4 °C	

反応条件 (SphK2)

98°C 2min	
98°C 10sec	} 5 cycles
64°C 5sec	
72°C 2min	
98°C 10sec	
66.8°C 5sec	} 25 cycles
72°C 2min	
4 °C	

SphK1 は、増幅した PCR 産物を pBluescript[®] II SK+ [STRATAGENE] にサブクローニングし、pCX4HM6-puro の *EcoR* I - *Not* I サイトに組み込み、pCX4HM6-mSphk1-puro を作製した。SphK2 は同様に pCX4HM6-mSphk2-puro を作成後、pCX4HA-bsr の *Not* I - *EcoR* I サイトに組み込み、pCX4HA-mSphk2-bsr を作製した。

SphK1(G81D)、SphK2(G213D)は、サブクローニング後のベクター 20 ng をテンプレートに以下の条件で PCR を行い、精製後 *Dpn* I で処理し、XL-10 Gold コンピテントセルに形質転換して得られた大腸菌から目的のプラスミドを抽出した。抽出後のプラスミドから、同様に pCX4HM6-puro [Roche]の *EcoR* I - *Not* I サイトに組み込み pCX4HM6-mSphk1(G82D)-puro、pCX4HA-mSphk2(G212D)-bsr を作製した。

反応条件 (SphK1 (G81D)、SphK2 (G213D))

98°C 30sec
 98°C 10sec
 55°C 5sec
 72°C 5min
 72°C 5min
 4 °C

} 20 cycles

ASM (smpd1)shRNA 発現ベクターの作成

オリゴ DNA	核酸配列
SMPD1-6765-F	TGCTGTTGACAGTGAGCGAGGAAAGTTCATGTATCAGAAA TAGTGAAGCCACAGATGTA
SMPD1-6765-R	TCCGAGGCAGTAGGCAGGGAAAGTTCATGTATCAGAAA TACATCTGTGGCTTCAC
SMPD1-18666-F	TGCTGTTGACAGTGAGCGCGGCTCTGTGGCCATCAAGATA TAGTGAAGCCACAGATGTA
SMPD1-18666-R	TCCGAGGCAGTAGGCAAGGCTCTGTGGCCATCAAGATA TACATCTGTGGCTTCAC

プライマー	核酸配列
5'miR30PCR XhoI F	CAGAAGGCTCGAGAAGGTATATGCTGTTGACAGTGAGCG
3'miR30PCREcoRIR	CTAAAGTAGCCCCTTGAATTCCGAGGCAGTAGGCA

反応溶液:

5 × PCR buffer 4 μL
 2.5 mM dNTP 1.6 μL
 10 μM 5' primer 1 μL
 10 μM 3' primer 1 μL
 1 μM template oligo (59 nt) 0.5 μL (\approx 15 ng)
 1 μM template oligo (55 nt) 0.5 μL (\approx 15 ng)
 PrimeSTAR HS [TaKaRa] 0.2 μL
 滅菌水 11.7 μL

 total 20 μL

方法:

オリゴ DNA、各プライマーを上記のように全量 20 μL とし、下記の条件で

PCR を行った後、精製したオリゴ DNA を pCX6#Red の *Xho* I-*EcoR* I サイトに組み込み、各種 shRNA 発現ベクターを作製した。

反応条件：

98°C 5min
 98°C 10sec
 54°C 15sec
 72°C 1min
 98°C 10sec
 68°C 1min
 68°C 10min
 4 °C

1 cycle
 29 cycles

SphK1 shRNA 発現ベクター の作成

プライマー	核酸配列
shmSPHK1JR-5	5'-GATCCCCTATGGAACCTTGACTGTCCATTCAAG AGATGGACAGTCAAGTTCCATATTTTAA-3'
shmSPHK1JR-3	5'-AGCTTAAAAATATGGAACCTTGACTGTCCATCTC TTGAATGGACAGTCAAGTTCCATAGGG-3'

試薬：

shmSphK1JR-5
 shmSphK1JR-3
 10×アニーリングバッファー
 蒸留水

方法：

105°Cで4分間、70°Cで10分間インキュベートし、その後徐々に室温に戻しオリゴ DNA のアニーリングを行った。調製したオリゴ DNA を pSUPER Retro-GFP/Neo [oligoengine]の *Hind* III-*Bgl* II サイトに組み込み、pSRGN-shSPHK1 を作製した。

SphK2 shRNA 発現ベクター の作成

標的配列 (CCTGCCTTTCTTGATGTCCAA)
 pSM2c-shSphk2 (OpenBiosystems[Clone ID : V2MM_192448]) から shSphk2 を切

り出し、pCX6#Red-puro ベクターに組み込み、pCX6#Red-shSphk2-puro を作製した。

【細胞への遺伝子導入・レトロウイルス産生】

エクトロピック受容体発現 RAW264 細胞(EcoR-RAW)は、FugeneHD [Roche]を用いて RAW264 細胞に EcoR を一過的に遺伝子導入し作製した。レトロウイルスの産生は、リン酸カルシウム法を用いた。まず、作製した発現ベクターを 10 µg、pGP 4 µg、pE-Eco 4 µg、pCMX-hGFP 2 µg を滅菌水で 450 µL に調製し、そこに 2.5 M CaCl₂ 50 µL を添加しボルテックスに 10 秒ほどかけた。その後、BBS(50 mM BES、280 mM NaCl、1.5 mM Na₂HPO₄)を 500 µL 添加し、正確に 2 分経過後、PLT 細胞(Kitamura et al.,2000)に添加した。PLT 細胞は前日に 5×10⁶(cells / 10cm plate)の細胞数で播種したものをを用いた。その後、6 時間後に培地交換し、その後 3 日後まで毎日培養上清を回収した。回収したウイルス液は、8000 G、4°C で 16 時間遠心し濃縮したものをを用いた。遠心後、ウイルスのペレットを少量の E-MEM (或は α-MEM) で懸濁し、EcoR-RAW (或は BMM) に 1 日感染させた。感染後培地を交換して一晩培養後、PBS で細胞を 5 回洗浄し、Puromycin (5 µg/mL)、bleomycin(1000µg/mL)、BlastcidinS (2 µg/mL)、入りの培地で培地交換し選別を行い、各種細胞株を樹立した。

【TRAP 染色】

試薬：

0.1M acetate buffer (adjust pH 5.2 with NaOH)

Tartrate acid [SIGMA]

Naphtol AS-BI phosphoric Acid [Wako]

N, N-Dimethylformamide[Wako]

Fast garnet GBC [SIGMA]

0.8 µm フィルター [CORNING]

方法：

tartrate を 0.1 M acetate buffer で溶解し 0.026 M tartrate solution を作製した。次に Naphtol AS-BI phosphoric Acid を N,N-Dimethylformamide で溶解し 12.5 mg/mL Naphtol AS-BI phosphate solution を作製した。0.026 M tartrate solution と 12.5 mg/mL Naphtol AS-BI phosphate solution を 24:1 の容積比率で混ぜ、Fast garnet GBC を適量加えて 0.8 µm フィルターに通し、TRAP 反応溶液を作製した。

細胞培養液を除き、PBS で三回洗った後、3.7% formaldehyde/PBS を加え 37°C で 10 分間細胞を固定した。3.7% formaldehyde/PBS を除いてから、0.5% Triton x-100/PBS を加え室温で 10 分間置いた。その後に TRAP 反応溶液を加え、37°C で 15~20 分間反応させた。光学顕微鏡を用いた検鏡により染色されていることを確認後、TRAP 反応溶液を除き、蒸留水で洗い乾燥させた。

【細胞抽出液の回収とタンパク質定量】

試薬：

Lysis buffer

20 mM Tris-HCl pH7.5, 1% NP40, 150 mM NaCl and 1 mM EDTA, 2mM Na₃VO₄, 20 mM NaF, protein inhibitor mix (Roche).

BCA™ Protein Assay Kit [PIERCE]

方法：

培養細胞を氷上で、培養細胞の培地を除き氷冷した PBS で 3 回洗浄した。PBS を除去し適量の Lysis buffer を加えスクレーパーで細胞を掻きとった。掻きとった溶液をピペットで懸濁後、1.5 mL エッペンチューブに移し氷上で 30 分間静置して細胞を破壊した。その後、遠心 (15000 rpm、4°C、10 min) して上清を新しいエッペンチューブに移し、これを細胞抽出液とした。保存は液体窒素で凍結後、-80°C で保存した。タンパク質定量は BCA™ Protein Assay Kit に添付のプロトコールに従って行った。

【SDS-PAGE】

試薬：

アクリルアミド溶液 (30% Acrylamid、

0.8% Bis N,N'-Methylene-bis-acrylamide)

4× Tris-Cl/SDS pH 8.8 (1.5 M Tris-Cl、0.4% SDS)

4× Tris-Cl/SDS pH 6.8 (0.5 M Tris-Cl、0.4% SDS)

20% APS (Ammonium Peroxodisulfate)

TEMED (N, N, N, 'N'-Tetramethylethylenediamine)

6× Sample buffer (4× Tris-Cl/SDS pH 6.8 7 mL、glycerol 3 mL、

SDS 1 g、DTT 0.93 g、BPB 1.2 mg adjust volume to 10 mL)

SDS-PAGE 電気泳動 buffer (3.02 g Tris、14.4 g glycine、1 g SDS in 1 L H₂O)

方法：

必要量の lysate に 6×Sample buffer を加えて、105°C、5 分間煮沸した。目的タンパク質の質量に応じたアクリルアミドゲルを作製し、電気泳動を行った。

【ウイスタンブロットング法】

試薬：

Transfer buffer (9.09 g Tris、43.26 g glycine、300 mL MeOH in 2.7 L H₂O)

PVDF 膜 [MILLIPORE]

濾紙 (chromatography paper)

TBS (20×TBS : 48.4 g Tris、160 g NaCl、adjust pH 7.6 with HCl adjust volume to 1 L use at 1×)

TBS-T (1×TBS、0.1% Tween 20)

Blocking buffer (5% BSA [EQUITECH-BIO, INC.]、0.1% Sodium Azide in TBS-T)

スキムミルク溶液 (5% skim milk in TBS-T)

Immobilon™ Western Detection Reagent [U.S.A]

各種一次抗体

方法：

SDS-PAGE が終了する少し前に PVDF 膜を MeOH に浸して 2 分間侵盪し、続いて Transfer buffer に浸した。SDS-PAGE が終了したゲルも Transfer buffer に浸して 5 分間侵盪した。転写はタンクブロッカーを用いて 100 mA で一晩、もしくは 200 mA で 3 時間行った。転写後、PVDF 膜を TBS-T で洗浄し、ハイブリバック[COSMO BIO CO,LTD]中で Blocking buffer によるブロッキングを 1 時間行った。ブロッキング後、新しい Blocking buffer で希釈した一次抗体と室温で 2 時間、もしくは低温室で一晩反応させた。反応後は TBS-T で 5 分、15 分、5 分洗浄した。次にスキムミルク溶液で希釈した二次抗体と室温で 40 分間反応させた。そして TBS-T で 5 分、15 分、5 分洗浄を行い、Immobilon Western と一分間反応させ、目的タンパク質を検出した。一次抗体と二次抗体は以下の抗体を用いた。

purchased from	Antibodies
Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)	Anti Sphk1 antibody Anti Sphk2 Antibody Anti NFAT2 monoclonal antibody (sc-7294) Anti c-Fos (sc-52) rabbit polyclonal antibody

Cell Signaling Technology (CO, USA)	Anti rabbit phospho-p38 Antibody Anti rabbit p-38 Antibody Anti SAPK/JNK Antibody
Jackson ImmunoResearch (PA, USA)	Anti mouse HRP Anti goat HRP Anti rat HRP Anti rabbit HRP
Sigma-Aldrich Inc. (MO, USA)	Anti β -actin monoclonal antibody (AC-74) Anti mouse FLAG Antibody(M2)
GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, England)	HRP-conjugated sheep anti-mouse IgG HRP-conjugated protein-A

【培養細胞からの全 RNA 抽出】

全 RNA 抽出

試薬：

ISOGEN [Nippon Gene]

RNase-free DW (0.2% DEPC を加えた培地用蒸留水を攪拌後、高圧蒸気滅菌)

方法：

培養細胞の培地を除去した後に PBS で 3 回洗浄を行い、ISOGEN 1 mL を加えスクレーパーで細胞を掻き取った後、15 回ピペッティングして細胞膜を破壊後、エッペンに移し 5 分間室温で静置した。その後、クロロホルムを 200 μ L 加え攪拌するまでボルテックスを十分行い、2 分間室温で静置後遠心 (15000 rpm、4 $^{\circ}$ C、20 min) した。水層を 400 μ L 新しいエッペンへ移し、2-プロパノールを 500 μ L 加えボルテックスした後、遠心 (15000 rpm、4 $^{\circ}$ C、10 min) を行い、上清を除去し、70% エタノールでペレットを洗浄した。洗浄後、遠心 (15000 rpm、4 $^{\circ}$ C、5min) した後 70% エタノールを除去し、10 分間乾燥させ RNase-free DW を 50 μ L 加え、氷上で 2 分間静置しその後ボルテックスを行った。

DNase 処理

試薬：

サンプル (total RNA) 50 μ L あたり

0.1M DTT 2 μ L

RNase inhibitor 0.5 μ L

DNase I	0.1 μ L
10 \times PCR buffer	10 μ L
RNase-free DW	37.4 μ L/100 μ L

方法：

以上の試薬を用いて、全量を 100 μ L 調整し、37 $^{\circ}$ Cインキュベーターで 30 分間 DNase 処理を行った。100 μ L Phenol / Chlopoform をサンプルに加え、ボルテックスした後、遠心 (15000 rpm、4 $^{\circ}$ C、5 min)を行い、上清を新しいエッペンに移した。さらにクロロホルムを 100 μ L 加え遠心 (15000 rpm、4 $^{\circ}$ C、5 min)を行い、上清を新しいエッペンに移し、3M NaoAc 10 μ L (pH5.2)、EtOH 250 μ L を加え遠心 (15000 rpm、4 $^{\circ}$ C、20 min)を行い、上清を除去した。1ml の 70%エタノールでペレットを洗浄した後、遠心 (15000 rpm、4 $^{\circ}$ C、2 min) して 70%エタノールを除去し、10 分間乾燥させ RNase-free DW を 20 μ L 加え、2 分間静置し、その後ボルテックスで完全に溶解し、これを全 RNA 溶液とした。溶液の RNA 濃度は、吸光度計 (DU 640 BECKMAN) で 260 nm の吸光度を測定し、その値をもとに算出した。

【RT-PCR 及びリアルタイム PCR (qPCR)】

RT-PCR は PrimerScript[®] II kit (Takara Bio)を用い、付属のプロトコールに従って行った。

試薬：

Oligo dT Primer or Random 6 mers Primer
dNTP Mixture (10 mM each)
鋳型 RNA
RNase free dH₂O
5 \times PrimeScript[®] Buffer
RNase Inhibitor (40 U/ μ L)
PrimeScript[®] RTase (200 U/ μ L)

方法：

RNA からの逆転写反応は最終 10 μ L の系で行った。
まず、下記のサンプルなどで全量 5 μ L とするサンプルを調製する。
総 RNA 1 μ g
Oligo dT (or Random 6 mers Primer) 0.5 μ L
dNTP Mixture 0.5 μ L

RNase-free DW (必要量)

全量 5 μL のサンプルを 65°C、5 分間インキュベートした後、氷上で 2 分以上急速冷却した。これに 5×PrimeScript[®] Buffer 2 μL 、PrimeScript[®] RTase 0.5 μL 、RNase Inhibitor 0.25 μL を加え (サンプル全量 10 μL)、30°C で 10 分 (Rando 6 Primer のみ)、42°C で 60 分間のインキュベートにより逆転写を行った。その後、95°C、5 分間のインキュベートで PrimeScript[®] RTase を失活させた。反応後、サンプルは滅菌した TE で 10 倍希釈した。

この cDNA 2 μL を鋳型とし 20 μL の系 (プライマー 各 1 μL 、dNTP 1.6 μL 、10×PCR buffer 2 μL 、rTaq 0.1 μL 、滅菌水 12.3 μL) で以下の条件で PCR 反応を行った。

プライマー	核酸配列
<i>mSphk1</i> F1	AGCCGCCGTTACCTCTAGCA
<i>mSphk1</i> R1	GTTCAGCAGCACCAGCACTC
<i>mSphk2</i> F1	TGAGGAGAATCGTGCAGAGG
<i>mSphk2</i> R1	GCAGCAATTCAGGGGTGATT
<i>mSphk2</i> F2	ATGAGGAGAATCGTGCAGAG
<i>mSphk2</i> R2	CCCAAAGGGATTGACCAATA
<i>gapdh</i> F	CATGTTCCAGTATGACTCCACTC
<i>gapdh</i> R	GGCCTCACCCCATTTGATGT

反応条件:

mSphk1 PCR

96°C 5min

94°C 30sec

60°C 30sec

72°C 30sec

} 34 cycles

4 °C

mSphk2 PCR

96°C 5min

94°C 30sec

60°C 30sec

72°C 30sec

} 34 cycles

4 °C

gapdh PCR

96°C 5min
94°C 30sec
60°C 30sec
72°C 30sec
4 °C

} 23 cycles

【リアルタイム PCR (qPCR)】

上記と同様に得られた cDNA を LightCycler 480[®] I Master Mix (Roche)を用いてリアルタイム PCR (LightCycler 480[®] system (Roche)により発現解析を行った。得られた結果は内在性コントロールとして用いた *Gapdh* の発現量で補正し、発現量を定量的に解析した。cDNA 5 μ を鋳型とし 20 μ L の系 (プライマー各 1 μ L、2 \times Master Mix 10 μ L、滅菌水 3 μ L)で以下のプライマーを用いて PCR 反応を行った。

プライマー	核酸配列
mSMPD1F	GGAGGTGTGGACACGTTTCAG
mSMPD1dTR	AGAGCACTCCTGTCAATGGC
<i>gapdh</i> F	CATGTTCCAGTATGACTCCACTC
<i>gapdh</i> R	GGCCTCACCCATTTGATGT

【ASM の酵素活性測定】

RANKL 刺激 96 時間後の BMM 細胞を 50mM Tris(pH 7.4) で回収し、超音波処理を行った。細胞破片は 10 分間の 3,000x g で遠心によって取り除かれた。酵素反応に用いたサンプルは総量 50ul 液に対して 25ug 蛋白質が含まれるように調整し、50 ul 反応混合物 (1mM EDTA、250mM 酢酸ナトリウム(pH5.0)、100mM[choline-methyl-¹⁴C]、および 0.1%の Triton-X を含む) と 30 分間 37°Cで反応させた。0.75ml chloroform/methanol (2:1) の添加により酵素反応を中止し 200ml 水を加え、3,000x g で 5 分間遠心をかけて上層から 200ul 液を取り、シンチレーション計測を行った。ASM の酵素活性は、放出される放射性 phosphocholine の放射能を測定することによって評価された。

結 果

1) ASM は NFAT2 の下流で発現誘導される

私の研究グループは破骨細胞分化における転写因子 NFAT2 の標的候補遺伝子を探索する目的で、マウスマクロファージ細胞株 RAW264 を前駆細胞とした *in vitro* 破骨細胞分化誘導系において、破骨細胞分化過程で発現誘導される遺伝子群のうちその発現誘導が NFAT2 核内移行阻害剤シクロスポリン A (CsA) 処理により抑制される遺伝子群を、DNA チップ解析を用いて網羅的に探索を行った (Ishida et al., 2006)。その結果酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASM) が候補遺伝子の一つとして同定された。現在に至るまで、破骨細胞分化におけるスフィンゴ脂質代謝あるいはセラミドの関与に関する断片的な知見は得られているが、NFAT2 からのシグナル系という全体的な視点からの分析は行われていない。そこで、破骨細胞分化過程における ASM 発現誘導の意義、またその役割についての解析を進めることにした。

まず、分化過程における ASM の mRNA、タンパク質の発現プロファイルを、RT-PCR 法及びウェスタンブロッティング法により調べた。その結果、BMM 細胞を用いた分化誘導において、ASM mRNA (Fig. 1A)、タンパク質 (Fig. 1B) ともに RANKL 刺激後 48 時間以後に経時的に発現上昇が認められた。また、その発現誘導は NFAT2 の核内移行阻害剤であるシクロスポリン A により抑制されることも確認された (Fig. 1A, C)。これらの結果は、ASM が破骨細胞分化過程の後期において、その役割を果たしていることを示唆する。

2) 破骨細胞における ASM の役割

次に、ASM が NFAT2 の下流で発現誘導される意義、ASM が破骨細胞の分化で果たす役割を詳しく調べるために、まず、ASM 強制発現細胞とノックダウン細胞を作成し、分化への影響を検討した。ASM 強制発現細胞は、C 末端に FLAG タグを付加した ASM を発現するレトロウィルスベクターを構築し、BMM に感染させることにより樹立した。その発現は、抗 FLAG 抗体及び ASM 抗体を用いてウェスタンブロッティング法により確認した (Fig. 2A)。一方、ASM ノックダウン細胞は、RNA 干渉法により 2 種類のノックダウンレトロウィルスベクター (shASM1, shASM2) を構築し、BM 細胞へ感染させることにより作成した。なお、樹立した細胞におけるノックダウン効果は、リアルタイム PCR 法及び免疫沈降法により mRNA とタンパク質レベルでそれぞれの発現低下を確認した (Fig. 3A)。さらに、ASM 酵素活性を測定することにより ASM のノックダウン

を最終的に確認することができた (Fig. 3A)。

続いて、作成した ASM 強制発現とロックダウン細胞を用いて *in vitro* 分化誘導実験を行った結果、ASM 強制発現細胞においては分化への影響は認められなかったが (Fig. 2B)、ASM ロックダウンにより TRAP 陽性多核細胞への分化が明らかに亢進された (Fig. 3B)。ASM 強制発現細胞においては分化への影響が見られなかった理由としては分化過程の後期で発現が上昇する ASM の発現と活性が最大値に達しているため、過剰発現させても、ASM が破骨細胞の形成をネガティブに調節することを示唆する。

次に、ASM ロックダウン細胞を用いて、破骨細胞分化過程で中枢的な役割を果たしているシグナル伝達経路の分子 c-Fos および NFAT2 の発現を調べた。その結果、ロックダウンによる ASM の発現抑制は c-Fos の発現を誘導し、NFAT2 の発現をさらに増強することが分かった (Fig. 4A)。これは細胞レベルで見られた分化促進効果と合致する。さらに、関連する分子経路を明らかにするために、破骨細胞において c-Fos の上流で発現する MAP キナーゼの発現と活性を調べた。その結果、ASM ロックダウンにより p38 が活性化を受けていることが分かった (Fig.4A)。これらの結果は、ASM の発現による細胞内シグナルが p38-c-Fos-NFAT2 の経路を介して伝達される可能性を示唆している。すなわち、ASM が破骨細胞分化を抑制する現象を説明するものである。

ASM の発現が抑制されることによって破骨細胞の分化が亢進する結果から、ASM の産生物質であるセラミドが破骨細胞の分化に影響している可能性が考えられた。そこで、細胞中のセラミド量と破骨細胞形成との関係を確認するために、破骨細胞分化過程に C6-セラミドを培地中に添加し、破骨細胞形成への影響を調べた。その結果、破骨細胞への分化が著しく抑制された (Fig.5)。これは破骨細胞形成に対するセラミドの抑制効果を示すものであり、ASM ロックダウンによって破骨細胞の分化が促進されることが観察された上記の破骨細胞誘導実験結果を支持する。さらに、その発現プロファイル (Fig.1) を考え合わせると、ASM は分化後期過程で発現し、分化の進行を抑制的に制御している可能性を示唆している。

3) ASM は SphK1 と SphK2 の発現を調節する

以上の実験結果は、細胞内のセラミド量/濃度が破骨細胞分化の決定因子である可能性を示唆する。スフィンゴシンキナーゼ(SphK)も ASM と同様に細胞中のセラミドを調節する重要な酵素として機能することが知られている。すなわち、細胞中のセラミドはスフィンゴミエリナーゼ経路及びデ・ノボ経路などの様々な代謝経路により合成され、さらにスフィンゴシン、スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) へ代謝される。スフィンゴシンをリン酸化して S1P を産生する酵素はス

フィンゴシンキナーゼ (SphK) である。

そこで、まず、破骨細胞分化過程における SphK1 と SphK2 の発現プロファイルを調べた。BMM 細胞を用いて *in vitro* 破骨細胞分化誘導実験を行い、RANKL 刺激後 0 時間、24 時間、48 時間、96 時間後に全 RNA 及び細胞抽出液を回収し、RT-PCR 法、もしくはウエスタンブロッティング法を用いて SphK1/2 の mRNA、タンパク質の発現レベルを調べた。その結果、SphK1 は破骨細胞分化過程の後期に著しく発現が増加するのに対し、SphK2 の発現レベルは比較的一定であった (Fig. 6)。このような SphK1 と SphK2 のそれぞれの独特の発現プロファイルは、それらが分化過程において異なった役割を果たしていることを示唆する。

近年、スフィンゴシンキナーゼのアイソタイプの 1 つである SphK1 に関して、破骨細胞分化を負に制御しているとの報告がある (Ryu et al., 2006)。しかし、以前のわれわれの研究ではマウスマクロファージ細胞株である RAW264 細胞や初代骨髄マクロファージを用いた *in vitro* 分化誘導系において、SphK の特異的阻害剤 SKI の添加により、破骨細胞分化が抑制される結果が得られている。これはスフィンゴシンキナーゼが破骨細胞分化を正に制御しているとの矛盾することになる。

そこで本研究ではこの理由を明らかにするため、SKI を用いて、SphK1/2 の破骨細胞分化への関与を検討した。RAW264 細胞に対し、RANKL 刺激と同時に (i) 0~96 時間、(ii) 0~24 時間、(iii) 48~96 時間、(iv) 72~96 時間 SKI 処理を行った (Fig.7A)。また、条件をそろえるため 24 時間おきに RANKL 刺激を行った。処理後、96 時間後に TRAP 染色を行い破骨細胞の分化を確認した。その結果、すべての実験区において、濃度依存的に破骨細胞の分化が抑制されていることが示唆された。しかし、実験区 (i) や (iii) のように、長時間阻害剤を暴露させることにより、細胞毒性の影響が強くなったため、1 μM よりも高い濃度では細胞が死滅している可能性も考えられた。一方、実験区 (iv) では、暴露時間が短すぎたため 6 μM でも僅かながら破骨細胞の分化が見られた。しかし、RANKL 刺激後から 24 時間 SKI 処理した実験区 (ii) に関しては、SKI による細胞毒性も少なく、1 μM の濃度で成熟破骨細胞分化が抑制されていることから、スフィンゴシンキナーゼは RANKL 刺激後初期の段階で破骨細胞分化に関与し、細胞の多核化を抑制していることが示唆された (Fig.7B)。

さらに、実験区(ii)に関して詳しく調べるために、RANKL 刺激と同時に SKI を異なった濃度 (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 μl) で添加した結果、SKI 添加後 24 時間内に、濃度依存的に破骨細胞分化が抑制され (Fig. 8A)、同時に c-Fos と NFAT2 の発現も低下することが確認された (Fig. 8B)。これは、分化過程の初期では SphK2 のみが発現しているという結果と照らし合わせて、破骨細胞分化過程初期での SphK2 の発現が破骨細胞分化の開始に重要であることを示唆するもの

である。

さらに、以上の結果は、破骨細胞分化におけるスフィンゴ脂質代謝系／セラミドの役割、またその過程での ASM、SphK 1/2 の強い関与を示唆する。

続いて、ASM ノックダウン細胞を用いて、ASM が SphK1 および SphK2 の発現におよぼす影響を調べた。ASM ノックダウン初代骨髄細胞を RANKL 刺激により分化誘導させて、96 時間の細胞抽出液をウェスタンブロッティング法により検討した。その結果、SphK2 の発現はタンパク質レベルではコントロール細胞とノックダウン細胞の間で差は認められませんが、SphK1 の発現はノックダウン細胞の方が著しく減少していた(Fig. 9)。

4) SphK 1 と SphK 2 の破骨細胞形成への逆効果

さらに、破骨細胞分化過程での SphK 1 と SphK2 の役割をより詳細に明らかにするために、SphK 1 と SphK2 それぞれの強制発現とノックダウン細胞を樹立し、それらの分化への影響を検討した。

まず、SphK1 の過剰発現による破骨細胞分化への影響を検証した。また、SphK1 の触媒部位である 81 番目のグリシンをアスパラギン酸に置換した変異体 (G81D) を過剰発現させると、優性不能型 SphK1 として機能することが報告されている(Stuart et al., 2000)ことから、それぞれ、HA タグ付の SphK1 と SphK1 (G81D) の発現ベクターを作製した。次に、これらのベクターが正常にタンパク質を発現するかどうかを確認するため、HEK293T 細胞に Lipofectamin 2000 [invitrogene] を用いて一過的に発現させ、ウェスタンブロッティング法によって SphK1 と SphK1 (G81D) の発現をそれぞれ確認した。その結果、両者ともに抗 HA 抗体で認識されるタンパク質のバンドが検出された (Fig.10A)。

次に、レトロウイルスベクターを用いて、両タンパク質を安定的に発現する RAW264 細胞を作成し、SphK1 と SphK1 (G81D) の過剰発現による破骨細胞分化への影響を検証した。RANKL 刺激後、96 時間後に TRAP 染色を行い、多核破骨細胞の形成を確認した。その結果、空ベクターを導入した対照と比較し、SphK1 過剰発現細胞では、破骨細胞の分化が顕著に抑制されていた。一方、SphK1 (G81D) 過剰発現細胞では、対照と比較しても分化効率に差は見られなかった (Fig.10B)。よって、SphK1 は破骨細胞の分化過程において、多核細胞の形成に抑制的に働くことが確認された (Ryu et al., 2006)。

続いて、SphK のもうひとつのサブタイプである SphK2 に関しては、shRNA 発現ベクターを作製し、RAW264 細胞において、SphK2 の発現抑制による破骨細胞分化への影響を検証した。レトロウイルスベクターを用いて、shRNA を安定的に発現する RAW264 細胞を作成した後、通常の分化誘導の条件で播種し、RANKL 刺激後 96 時間後の細胞から全 RNA (shSphK2) を回収し、RT-PCR 法によ

り *SphK2*mRNA の発現量よりノックダウンの確認を行った。また、タンパク質レベルでも確認するため、RANKL 刺激後 96 時間後の細胞抽出液をウェスタンブロッティング法により *SphK2* の発現レベルを確認した。コントロールとして、GFP のノックダウンベクターを発現させたものを用いた。

その結果、sh*SphK2* では対照と比較して、*SphK2*mRNA の発現量の減少が見られ、タンパク質レベルではより顕著に発現抑制が見られたことから (Fig.9A)、ノックダウンが正常に行われていることを確認した。次に、作製した *SphK2* 発現抑制細胞を RANKL で刺激し、96 時間後に TRAP 染色により、多核破骨細胞の形成を調べた。その結果、GFP ノックダウンコントロールベクターを導入した対照と比較し、多核破骨細胞の形成が抑制されていることが示唆された (Fig.11B)。さらに、*SphK2* ノックダウン細胞については c-Fos の発現減少も見られた (Fig.11 C)。同様に、BMM 細胞においても *SphK2* の発現抑制による破骨細胞分化が抑制され (Fig.12B), c-Fos の発現減少が確認された (Fig.12A)。これらの結果より、*SphK2* は破骨細胞の分化において、多核細胞の形成に促進的に寄与することが示唆された。また、その抑制には c-Fos の発現低下が関与している可能性が示唆された。

上記の *SphK1* と *SphK2* の強制発現とノックダウン細胞を用いた *in vitro* 分化誘導実験の結果から、*SphK1* と *SphK2* は破骨細胞分化過程において負の調節因子と正の調節因子としてそれぞれ異なった役割を果たしていることが示唆された。これには、破骨細胞形成過程でみられた *SphK1* と *SphK2* の異なった発現プロファイルがそれぞれの役割と深く関連していることが考えられる。

以上の結果は、破骨細胞分化過程において初期から恒常的に発現している *SphK2* は分化の進行とポジティブに関わる。一方、ASM は後期において発現が誘導され、*SphK2* の発現には影響を及ぼさないが、分化に対して抑制的に働く *SphK1* の発現を誘導することにより、分化の進行に抑制的に働くこと、また、ASM→*Sphk* 制御系は破骨細胞分化の中核シグナル系である MAPKs→c-Fos→NFAT2 に働きかけることにより機能することが明らかとなった (Fig.13)。

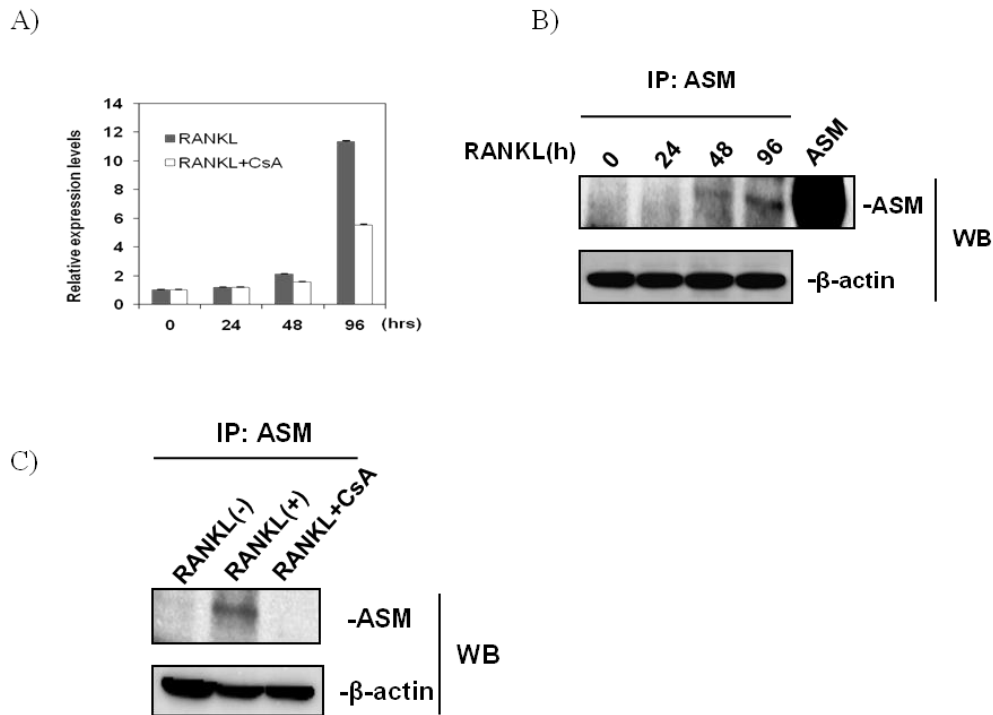


Figure.1 破骨細胞分化過程における ASM の発現プロファイル

- A) ASM mRNA の発現プロファイル。マウス初代破骨前駆細胞を用いた *in vitro* 破骨細胞分化培養系において、CsA 添加/非添加実験区で RANKL 刺激後表記時間において mRNA を回収し、q-PCR 法により ASM mRNA の発現を定量した。CsA : NFAT2 阻害剤。Gapdh : 内在コントロールとして使われた。
- B) ASM タンパク質 の発現プロファイル。A) と同様に、マウス初代破骨前駆細胞を用いた *in vitro* 破骨細胞分化培養系において、RANKL 刺激後経時的にタンパク質を回収し、免疫ブロッティング法により ASM タンパク質の発現を解析した。 β -actin は内在性コントロール。
- C) マウス初代破骨前駆細胞を用いた *in vitro* 破骨細胞分化培養系において、CsA 添加/非添加実験区で RANKL 刺激 96 時間後の細胞抽出液を回収し、免疫ブロッティング法により ASM タンパク質の発現を解析した。RANKL 刺激なし実験区 RANKL(-) : ネガティブコントロール。

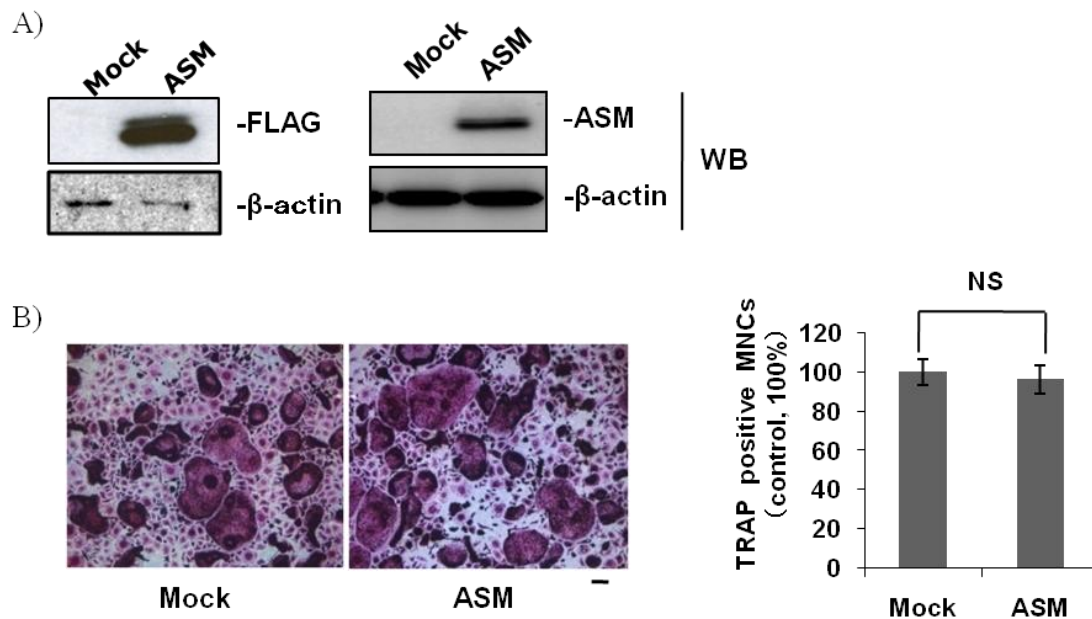


Figure.2 破骨細胞分化過程における ASM 強制発現の効果

- A) ASM 強制発現細胞の樹立。Flag タグ付きの ASM を発現するレトロウイルスベクターを BMM に感染させて安定した ASM 強制発現細胞を作製した。抗 FLAG 体 (左) 及び ASM 抗体 (右) を用いてウエスタンブロッティング法によりそれぞれの発現を確認した。Mock : empty vector, ASM : Flag-mASM, β-actin は内在性コントロール。
- B) ASM 強制発現細胞における多核破骨細胞形成。ASM 強制発現細胞を 5×10^4 cells/mL の濃度で播き、RANKL 刺激 96 時間後に細胞を TRAP 染色し、多核破骨細胞の形成を観察した (左)。得られた画像より多核破骨細胞数を計測し、統計処理を行った (右)。NS: nonsignificant. **, $p < 0.01$ and *, $p < 0.05$

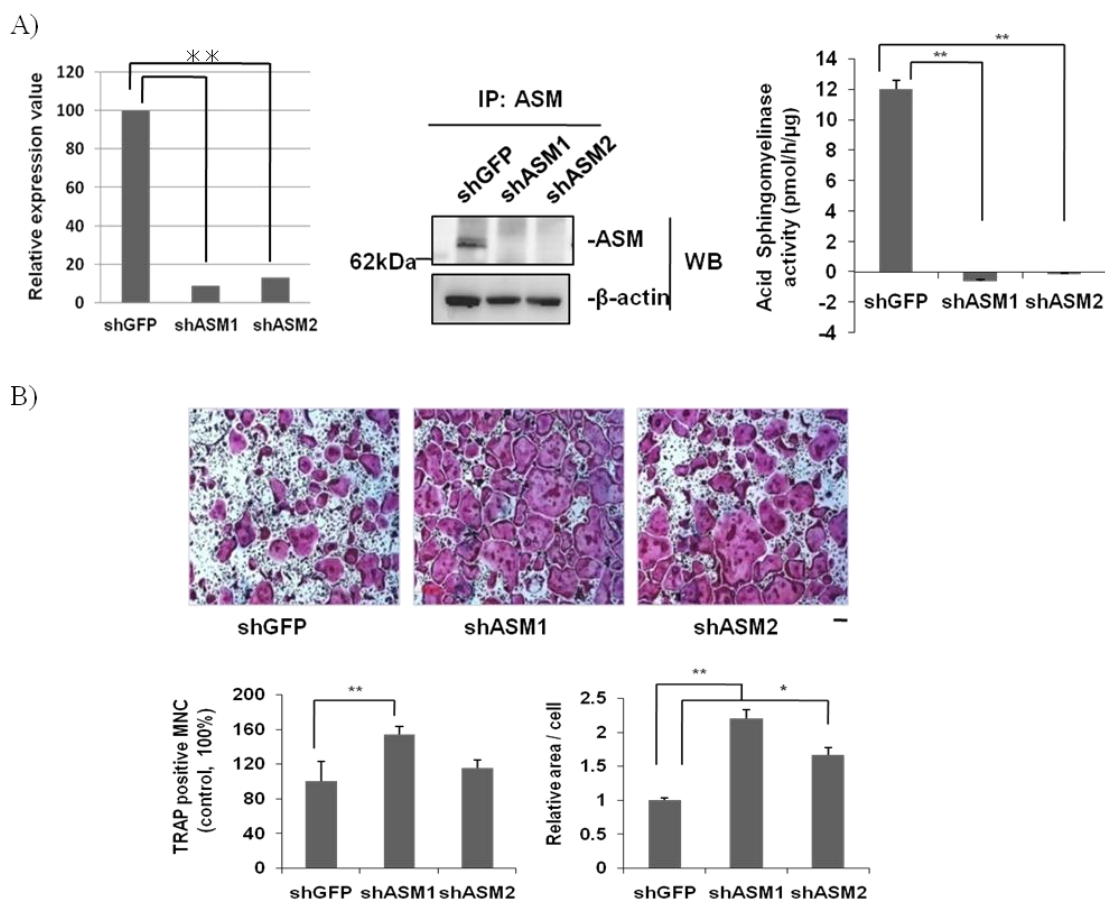


Figure.3 破骨細胞分化過程における ASM ノックダウンの効果

- A) ASM ノックダウン細胞の樹立。RNA 干渉法により 2 種類のノックダウンレトロ ウィルスベクターを作成し、BMM 細胞へ感染させて、ASM ノックダウン細胞を作成した (shRNA1 と shRNA2)。shGFP はコントロール。作成したノックダウン細胞を用いた *in vitro* 破骨細胞分化培養系において、RANKL 刺激後 96 時間ごとに mRNA 及びタンパク質を回収し、ASM mRNA (左) 及び ASM タンパク質 (中) の発現をリアルタイム PCR 法及び免疫沈降法によりそれぞれ解析した。β-actin は内在性コントロール。同様に、ASM ノックダウンによる酵素活性の低下も測定できた (右)。
- B) ASM ノックダウン細胞における多核破骨細胞形成。ASM ノックダウン細胞を 5×10^4 cells/mL の濃度で播き、RANKL 刺激 96 時間後に細胞を TRAP 染色し、多核破骨細胞の形成を観察した (上)。得られた画像より多核破骨細胞の数と多核細胞の面積をそれぞれ計測し、統計処理を行った (下)。P<0.05

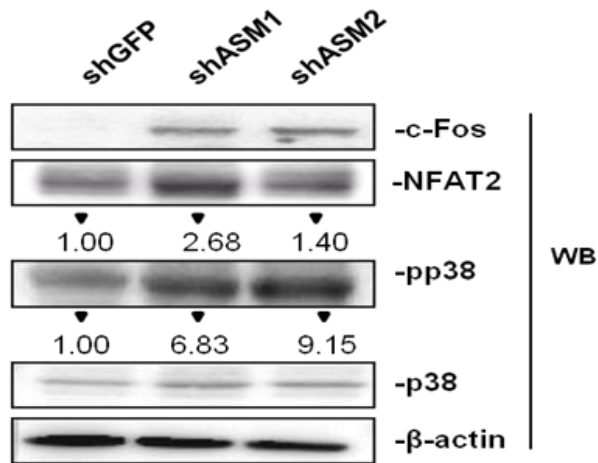


Figure.4 ASM ノックダウンにおける破骨細胞分化マーカーの発現プロファイル

ASM ノックダウン細胞を用いた *in vitro* 破骨細胞分化培養系において、RANKL 刺激 96 時間後に抽出液を回収し、c-Fos、NFAT2、pp38、p38 の抗体を用いて、ウエスタンブロッティング法によりそれぞれの発現を確認した。β-actin は内在性コントロール。各列における密度は定量化された。

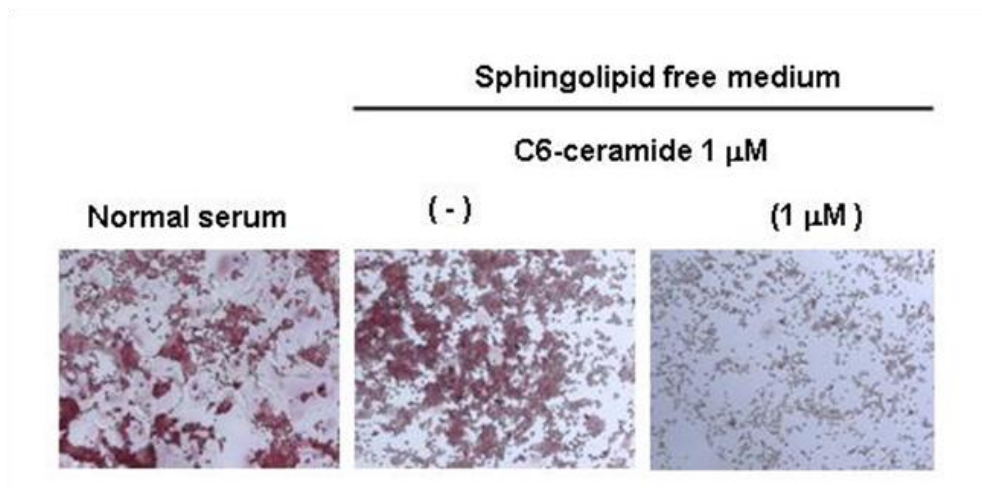


Figure.5 破骨細胞分化におけるセラミドの効果

骨髄前駆細胞を 5×10^4 cells/mL の濃度で播き、スフィンゴ脂質を除いた培地中に $1 \mu\text{M}$ C6-Ceramide を添加 (右) /非添加 (中) 実験区で破骨細胞分化誘導を行って、96 時間後の細胞を TRAP で染色し、多核破骨細胞の形成を調べた。ポジティブコントロールとして Normal serum を含む培地で細胞を分化誘導させた (左)。

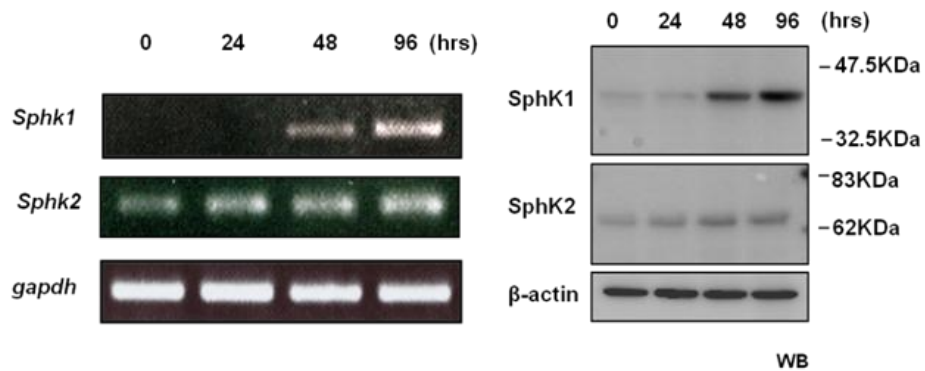


Figure.6 破骨細胞分化過程における SphK1/2 の発現プロファイル

破骨細胞分化誘導時の SphK1/2 発現量の経時変化。BMM 細胞を用いた *in vitro* 破骨細胞分化培養系において、分化誘導後表記時間において mRNA 及びタンパク質を回収し、*SphK1/2* の mRNA(左)及び SphK1/2 タンパク質(右)の発現をそれぞれ RT-PCR 法及びウエスタンブロッティング法により解析した。Gapdh と β -actin はそれぞれ内在性コントロールとして使用された。

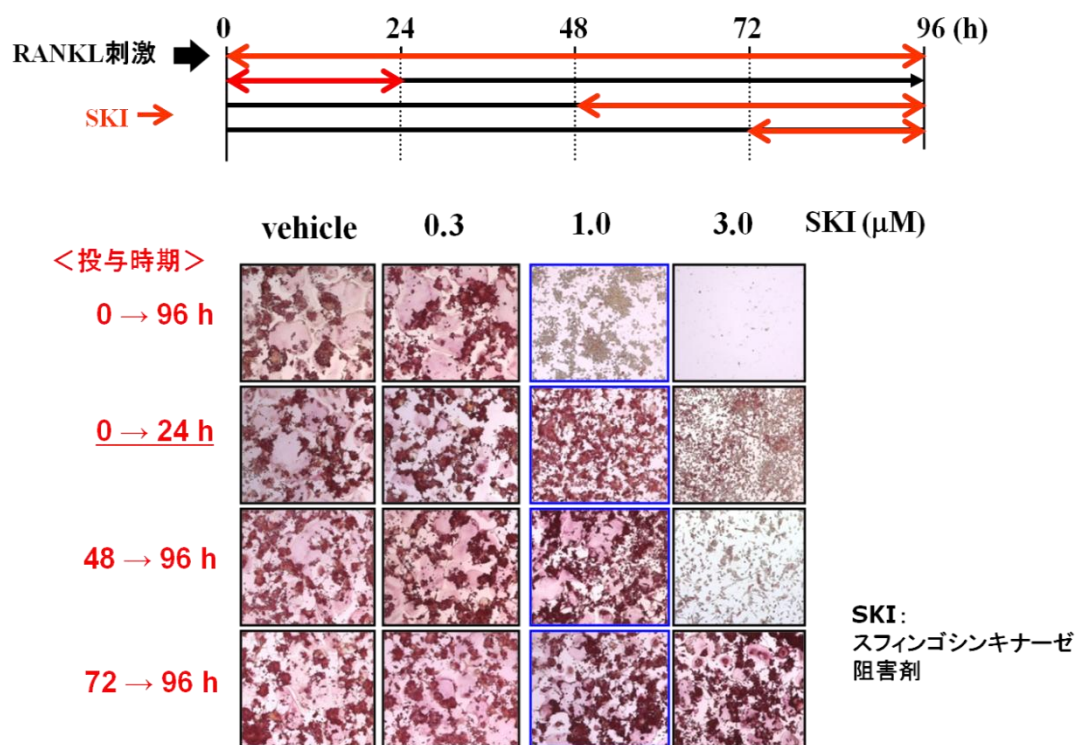
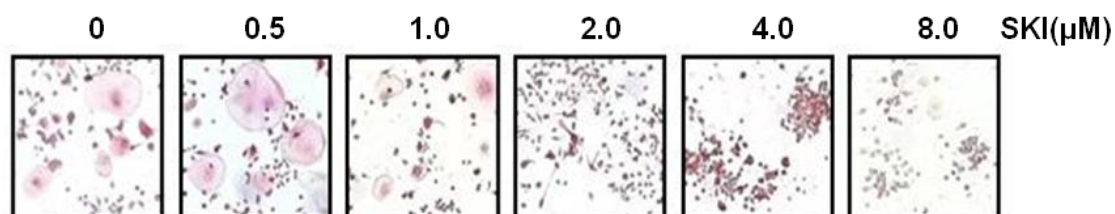


Figure.7 SKI 添加による破骨細胞分化への影響 (1)

- A) RAW264 を 5×10^4 cells/mL の濃度で播き、RANKL 刺激と同時に(i) 0～96 時間、(ii) 0～24 時間、(iii) 48～96 時間、(iv) 72～96 時間 SKI 処理を行った。
- B) RANKL 刺激後 96 時間後に TRAP 染色を行い、多核破骨細胞の形成を確認した。

A)



B)

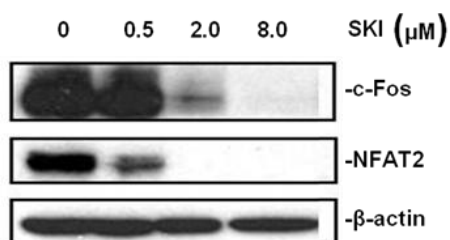


Figure.8 SKI 添加による破骨細胞分化への影響 (2)

- A) マウスマクロファージ由来の RAW264 細胞を用いた *in vitro* 分化誘導系において、SphK の阻害剤である Sphingosine Kinase Inhibitor (SKI) を RANKL 刺激と同時に表記の濃度 (0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 μl) で添加し、破骨細胞分化における影響を TRAP 染色法によって確認した。
- B) 上記と同様に、RAW264 細胞を用いた *in vitro* 分化誘導培養において、RANKL 刺激と同時に SKI を表記濃度 (0、0.5、2.0、8.0 μl) で添加し、24 時間後に細胞抽出液を回収し、c-Fos、NFAT2 の抗体を用いて、ウェスタンブロッティング法によりそれぞれの発現を確認した。β-actin は内在性コントロール。

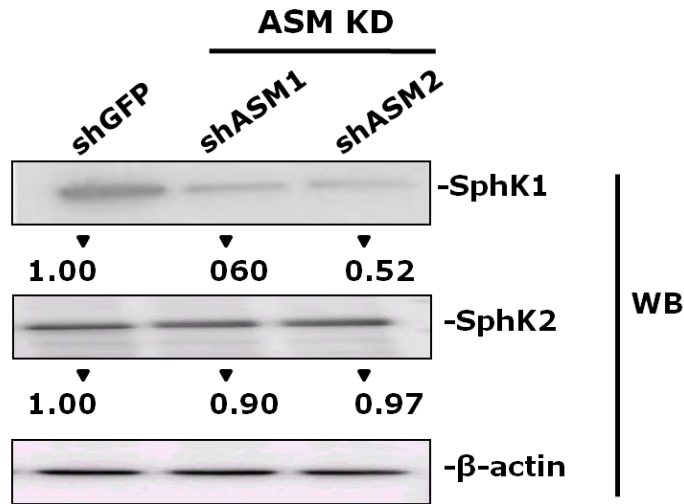
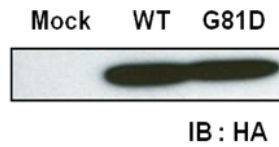


Figure.9 ASM ノックダウン細胞における SphK の発現プロファイル

ASM ノックダウン細胞を用いた *in vitro* 破骨細胞分化培養系において、RANKL 刺激 96 時間後に抽出液を回収し、SphK1 と SphK2 の抗体を用いて、ウエスタンブロッティング法によりそれぞれの発現を確認した。β-actin は内在性コントロール。

A)



B)

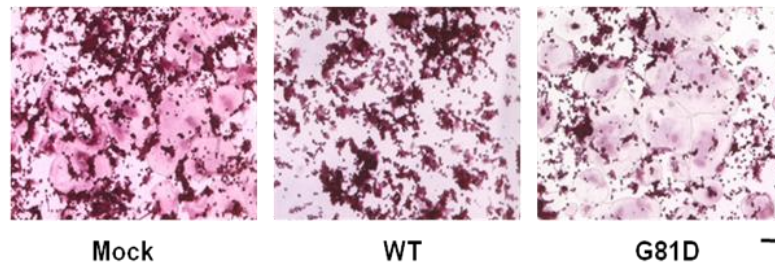


Figure.10 SphK1 過剰発現による破骨細胞分化への影響

- A) HA タグ付きの、SphK1 と優性不能型 SphK1(G81D)の発現ベクターを作製し、Lipofectamin2000 [invitrogene]を用いて HEK293T に一過的に発現させた。一晚培養後、細胞抽出液を回収し、ウエスタンブロッティング法により SphK1、SphK1 (G81D)の発現を確認した。Mock : empty vector, WT : HA-mSphK1, G81D : HA-mSphK1 (G81D)
- B) 作製したベクターを、EcoR を発現させた RAW264 にレトロウイルスによるインフェクションにより安定的に発現させた。得られた細胞を 5×10^4 cells/mL の濃度で播き、RANKL 刺激後 96 時間後に TRAP 染色を行い、多核破骨細胞の形成を確認した。

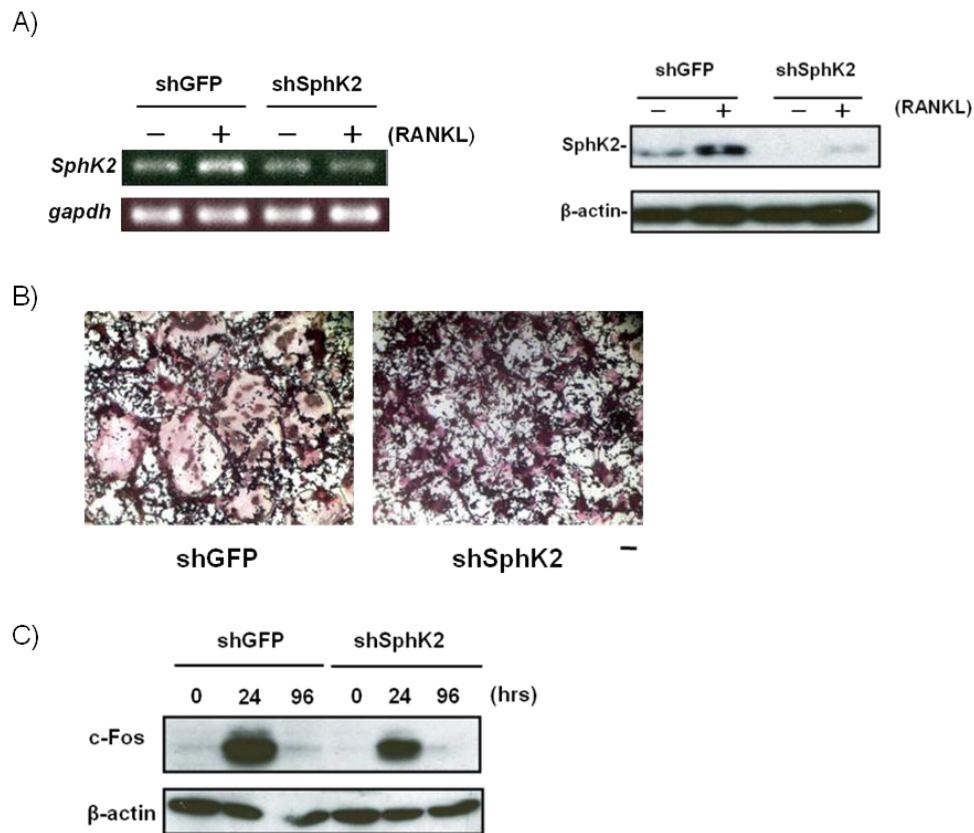


Figure.11 SphK2 ノックダウンによる破骨細胞分化への影響 (RAW264 細胞)

- A) SphK2 発現抑制による破骨細胞分化への影響 (1)。SphK2 のノックダウンベクターを作製し、EcoR を発現させた RAW264 にレトロウイルスを用いたインフェクションにより安定的に発現させた。作製したノックダウン細胞を 5×10^4 cells/mL の濃度で播き、RANKL 刺激後 96 時間の細胞から全 RNA を回収後、RT-PCR 法により *SphK* mRNA の発現レベルを解析しノックダウンの確認を行った。対照として GFP(shGFP)を用いた(左)。同細胞を 5×10^4 cells/mL の濃度で播き、RANKL 刺激後 96 時間後の細胞抽出液をウエスタンブロッティング法により SphK2 のノックダウンの確認を行った (右)。
- B) 破骨細胞の形成。同細胞を 5×10^4 cells/mL の濃度で播き、RANKL 刺激後 96 時間後に TRAP 染色を行い、多核破骨細胞の形成を確認した。Bar : 200 μ l。
- C) SphK2 発現抑制による c-Fos の発現確認。RAW264 を 5×10^4 cells/mL の濃度で播き、分化誘導後表記時間 (0,24,96 時間) において、細胞抽出液を回収し、ウエスタンブロッティング法により c-Fos の発現確認を行った。 β -actin は内在性コントロール。

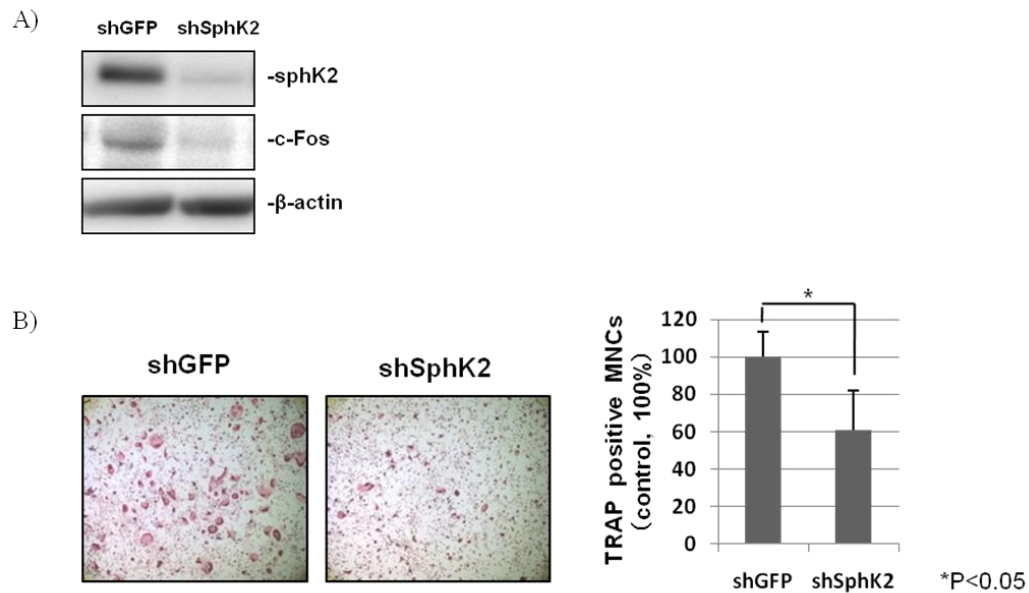


Figure.12 SphK2 ノックダウンによる破骨細胞分化への影響 (BMM 細胞)

- A) SphK2 発現抑制による破骨細胞分化への影響 (2)。Fig11 と同様に、SphK2 のノックダウンベクターを用いて BMM 細胞にレトロウイルスを用いたインフェクションにより安定的に発現させた。作製したノックダウン細胞を 5×10^4 cells/mL の濃度で播き、RANKL 刺激後 96 時間後の細胞抽出液をウェスタンブロットティング法により SphK2 のノックダウンの確認、及び c-Fos の発現を確認した。対照として GFP(shGFP)を用いた。β-actin は内在性コントロール。
- B) 破骨細胞の形成。同細胞を 5×10^4 cells/mL の濃度で播き、RANKL 刺激後 96 時間後に TRAP 染色を行い、多核破骨細胞の形成を確認した。得られた画像より多核破骨細胞数を計測し、統計処理を行った (右) P<0.05。

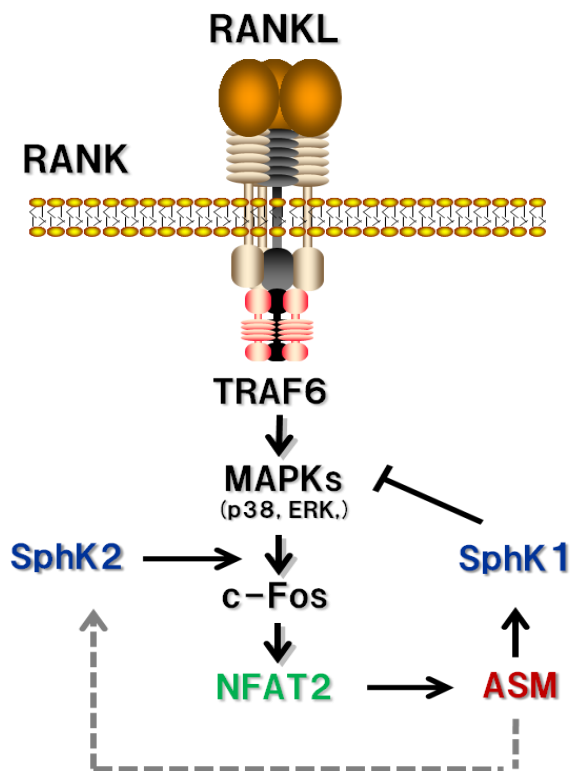


Figure.13 破骨細胞における ASM の作用機構のモデル図

NFAT2によりASMが発現誘導され、更にSphK1を誘導する。SphK1はMAPKsからc-Fosへの反応を負に制御することにより、分化を抑制する。一方、正の調節因子であるSphK2の発現に対しては、ASMの影響は認められませんでした

考 察

骨機能の維持には骨代謝が正常に保たれる必要がある。骨代謝の異常は骨粗鬆症などの骨疾患に結び付くことから、骨代謝機構の解明は骨疾患の治療および予防に重要な課題である。私は本研究において、1) ASM が破骨細胞の分化に必須な転写因子である NFAT2 の下流で発現すること、2) 破骨細胞において ASM が分化抑制因子として機能すること。3) 破骨細胞形成過程では ASM が SphK1 と SphK2 を特徴的に制御することにより分化を抑制すること、4) ASM→Sphk 制御系は破骨細胞分化の中枢シグナル系である MAPKs→c-Fos→NFAT2 を制御すること、5) 2種類のアイスフォーム酵素である SphK1 と SphK2 は、破骨細胞の分化における負の調節因子と正の調節因子としてそれぞれ機能すること、の5点を見出した。

細胞内の ASM はスフィンゴ脂質の一種であるスフィンゴミエリンを加水分解して、セラミドを生成する (参考図 4A)。スフィンゴ糖脂質は生体膜を構成する脂質成分の一群であるだけでなく、シグナル伝達物質としての機能をも担う。ASM の反応生成物であるセラミドはアポトーシスを誘導する活性を持ち、この知見は ASM 遺伝子欠損マウス由来細胞が野生型細胞と比較してアポトーシスに耐性であることから裏付けられている。また SphK1/2 の反応生成物であるスフィンゴシン-1 リン酸は七回膜貫通型受容体分子のリガンドとして機能することが明らかになっている。スフィンゴシン-1 リン酸はリガンド分子として機能するだけでなく、細胞内シグナル分子としての機能も示唆されている。一例として2010年にスフィンゴシン-1 リン酸が E3 ユビキチンリガーゼ TRAF2 のコファクターとして機能することが挙げられる (Sergio E. et al., 2010)。

破骨細胞の分化や機能におけるスフィンゴ脂質の機能については、セラミド代謝産物であるラクトシルセラミドは破骨細胞分化に必須であること (Iwamoto et al., 2001)、またセラミドがアクチン骨格を破綻させること、が報告されている (Takeda et al., 1998)。これら報告は貴重な知見であるが、阻害剤やセラミドを細胞外に添加した際における実験結果であり、細胞内代謝を反映した結果とは言いきれない可能性がある。これに対して本研究では ASM 発現抑制実験により内在性 ASM の機能を解析した結果であり、本研究において示した ASM が破骨細胞分化における負の制御因子であることは破骨細胞分化におけるスフィンゴ脂質の機能を理解する上で重要な知見であると考えられる。

破骨細胞において、SphK1 は c-Fos/NFAT2 の発現を負に制御することにより、分化を抑制することが報告された (Ryu et al., 2006)。これに対して、本研究では SphK 阻害剤 (SKI) を破骨細胞分化誘導系に添加した際、c-Fos/NFAT2 経路

を抑制することで破骨細胞分化を初期段階で阻害することが示された (Fig.7)。Ryu らの報告と本研究は一見矛盾する結果に思われるが、本研究で示された SphK2 が破骨細胞分化における正の制御因子として機能することを考えることで説明しうる。

まず、SphK1 は RANKL 刺激 48 時間後から発現誘導されるのに対し、SphK2 は破骨前駆細胞においてすでに発現が確認されていることから (Fig.6)、破骨前駆細胞で機能する主な SphK は SphK2 であると考えられ、SKI は SphK2 を阻害した結果と考えられる。また破骨細胞分化における必須転写因子 c-Fos は SKI による阻害条件下ならびに SphK2 遺伝子発現抑制条件下においてともに発現が抑制されていたことから裏付けられる (Fig.8B、Fig.12A)。近年 SphK2 が MCF7 細胞における *c-fos* プロモーターの HDAC を抑制することを介して、c-Fos 発現を制御することが報告されており (Hait et al.,2009)、破骨細胞においても同様の機構で制御されている可能性が考えられる。

破骨細胞分化後期課程 (分化誘導 48~96 時間後) では SphK2 とともに SphK1 の発現も誘導される (Fig.6B)。本研究において SphK1 強制発現した前駆細胞では多核破骨細胞の形成が顕著に抑制されており (Fig.10)、本結果は SphK1 が破骨細胞分化の負の制御因子として機能することを示した既報と一致する。また不活性型変異 SphK1 発現細胞では分化抑制が認められなかったことから、SphK1 の分化抑制能はその酵素活性に依存することが示された。

破骨細胞形成における c-Fos/NFAT2 制御系の極めて重要な役割について、すでに報告されている (Ishida et al.,2002, Nemoto et al., 2009, Teitelbaum et al., 2007)。NFAT2 下流で発現する ASM を発現抑制すると c-Fos および NFAT2 の発現が亢進することは、ASM を介して c-Fos/NFAT2 系を負に制御するネガティブフィードバックループが存在することが示唆される。1) ASM 発現抑制細胞では、SphK2 の発現には影響せず、SphK1 の発現が抑制されていること、2) SphK1 を強制発現した破骨細胞において c-Fos および NFAT2 の発現抑制が認められること (Ryu et al., 2006)、から ASM を介した c-Fos/NFAT2 系に対するネガティブフィードバックループには SphK1 が関与していることが示唆される (Fig.13)。ASM が SphK1 発現を調節する機構や SphK1 が c-Fos の発現を抑制する機構については現時点では不明であり、本課題を解決することは重要な課題であると考えられる。また ASM-SphK1 を介した c-Fos-NFAT2 系に対するフィードバックループの骨代謝における意義は未だ不明である。ASM 遺伝子欠損マウスにおける骨代謝の表現型は未だ報告されておらず、野生型と遺伝子欠損マウスの骨代謝を比較することで、ASM の骨代謝における意義を明らかにするとともに、ASM の関連するニーマンピック病をはじめとするリソソーム病と骨代謝の関連について新たな知見が得られるかもしれない。

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始懇切なる御指導と御教示を賜りました竹家達夫教授、川市正史教授、稲垣直之准教授、片岡浩介准教授に心から厚く御礼申し上げます。

具体的に実験操作、適切な御助言、御指導を賜りました北川（石田）教弘 助教、小川拓哉 助教に心から感謝致します。

貴重な御意見を与え、支援して下さいました秋山元英 博士、Anton Bahtiar さん及び諸先輩の方々に心から感謝致します。

また、多岐にわたり、激励して下さいました後輩立ちにも深く感謝致します。特に、一部の実験データを提供してくれた瀬 聡君に深く感謝します。

そして、共に切磋琢磨し、お互いに激励し合った同期の佐藤みずほさん、田中国太郎さんに深く感謝致します。

最後に、大学院において学ぶ機会を与えてくれました家族のみんなに深く感謝致します。

感谢词

在奈良先端科技大攻读博士研究生的三年期间，我受到了竹家达夫教授的深切教导和真情关爱，还有在研究方面我得到了川市正史教授、稻垣直之准教授、片岡浩介准教授等三位助理指导员的认真指导，同时在具体的实验过程中得到了本研究室的北川(石田)教弘和小川拓哉两位助教的宝贵意见和耐心细致的指导。

在我即将毕业离开母校回归故乡的这一刻，向他们表示由衷地感谢。我将铭记你们的教导，用我毕生的精力来继续我的研究。

我还向曾给予贵重意见和支持的秋山原英博士、Anton Bahtiar 先生及对诸前辈表示衷心感谢，感谢他们对我的热心帮助和支持。尤其感谢在读博士研究生的三年里一同切磋，互相激励互相帮助的同届博士生佐藤瑞穗女士和田中国太郎先生，愿我们的友谊天长地久。

还有，非常感谢我的后辈们，更加感谢提供一部分实验数据的瀬聡君。

最后，我还想感谢远在中国内蒙古的家人，是他们一直支持和鼓励了我的学业。

参考文献

Adriana Haimovitz-Friedman, Richard N Kolesnick and Zvi Fuks(1997) Ceramide signaling in apoptosis. *British Medical Bulletin*,53 (3),539-553.

Asagiri, M., Sato, K., Usami, T., Ochi, S., Nishina, H., Yoshida, H., Morita, I., Wagner, E.F., Mak, T.W., Serfling, E., Takayanagi, H.(2005). Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J.Exp.Med.* 202,1261-9.

Bahtiar, A., Matsumoto, T., Nakamura, T., Akiyama, M., Yogo, K., Ishida-Kitagawa, N., Ogawa, T. and Takeya, T. (2009) Identification of a novel L-Serine analog that suppresses osteoclastogenesis in vitro and bone turnover in vivo. *J. Biol. Chem.* 284, 34157-34166.

Billich, A., Bornancin, F., Dévay, P., Mechtcheriakova, D., Urtz, N., and Baumruker, T. (2003). Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases. *J Biol Chem.* 278(48), 47408-15.

Chen, R.H., Abate, C., Blenis, J. (1993). Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90, 10952-6.

Chinenov, Y., Kerppola, T.K. (2001). Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene.* 20, 2438-2452.

Dougall, W.C., Glaccum, M., Charrier, K., Rohrbach, K., Brasel, K., De Smedt, T., Daro, E., Smith, J., Tometsko, M.E., Maliszewski, C.R., Armstrong, A., Shen, V., Bain, S., Cosman, D., Anderson, D., Morrissey, P.J., Peschon, J.J., Schuh, J. (1999). RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Gene Dev.* 13, 2412-2424

Edy, M., Hoshijima, M., Ogawa, T., Ishida, N., Takeya, T. (2001). Osteoclast Differentiation Factor Modulates Cell Cycle Machinery and Causes a Delay in S Phase Progression in RAW264 Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 278-283.

Fukumoto, S., Iwamoto, T., Sakai, E., Yuasa, K., Fukumoto, E., Yamada, A., Hasegawa, T., Nonaka, K., Kato, Y. (2006). Current topics in pharmacological research on bone metabolism: osteoclast differentiation regulated by glycosphingolipids. *J Pharmacol Sci.* 100, 195-200

Fleischmann, A., Hafezi, F., Elliott, C., Remé, CE., Rüther, U., and Wagner, EF. (2000). Fra-1 replaces c-Fos-dependent functions in mice. *Genes Dev.* 14(21), 2695-700.

Furuya, S., Tabata, T., Mitoma, J., Yamada, K., Yamasaki, M., Makino, A., Yamamoto, T., Watanabe, M., Kano, M., Hirabayashi, Y. (2000). L-serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 97, 11528-11533.

Futerman, AH., and Hannun, YA. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* 5(8), 777-82.

Galibert, L., Tometsko, M.E., Anderson, D.M., Cosman, D., Douqall, W.C. (1998). The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem.* 273, 34120-34127

Ginty, D.D., Bonni, A., Greenberg. (1994). Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell.* 77, 713-725.

Gohda, J., Akiyama, T., Koga, T., Takayanagi, H., Tanaka, S., Inoue, J. (2005) RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *EMBO J.* 24, 790-799

Grigoriadis, AE., Wang, ZQ., Cecchini, MG., Hofstetter, W., Felix, R., Fleisch, HA., and Wagner, EF. (1994). c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science.* 266(5184), 443-8.

Ha, H., Kwak, H.B., Lee, S.K., Na, D.S., Rudd, C.E., Lee, Z.H., Kim, H.H. (2003). Membrane rafts play a crucial role in receptor activator of nuclear factor kappaB

signaling and osteoclast function. *J Biol Chem.* 278,18573-80

Hait, N.C., Allegood, J., Maceyka, M., Strub, G.M., Harikumar, K.B., Singh, S.K., Luo, C., Marmorstein, R., Kordula, T., Milstien, S. and Spiegel, S. (2009) Regulation of Histone Acetylation in the Nucleus by Sphingosine-1-Phosphate. *Science* 325, 1254-1257.

Hanada, K., Hara, T., Fukasawa, M., Yamaji, A., Umeda, M., and Nishijima, M. (1998). Mammalian cell mutants resistant to a sphingomyelin-directed cytolysin. *J Biol Chem.* 273, 33787-94.

Hanada, K., Hara, T., Nishijima, M., Kuge, O., Dickson, RC., and Nagiec, MM.(1997). A mammalian homolog of the yeast LCB1 encodes a component of serine palmitoyltransferase, the enzyme catalyzing the first step in sphingolipid synthesis. *J Biol Chem.*272(51), 32108-14.

Hait, N.C., Oskeritzian, C.A., Paugh, S.W., Milstien, S. and Spiegel, S. (2006) Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphates, apoptosis and diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758, 2016-2026.

Harada, H., Tagashira, S., Fujiwara, M., Ogawa,S., Katsumata, T., Yamaguchi, A., Komori, T., and Nakatsuka, M.(1999). Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 274,6972-6978

Hayashi, S., Okada, T., Igarashi, N., Fujita, T., Jahangeer, S., and Nakamura, S. (2002). Identification and characterization of RPK118, a novel sphingosine kinase-1-binding protein. *J Biol Chem.* 277(36), 33319-24.

Hirotsani, H.,Tuohy, N.A., Woo, J.T., Stern, P.H., Clipstone, N,A. (2004). The calcineurin/nuclear factor of activated T cells signaling pathway regulates osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *J Biol Chem.* 279, 13984-92.

Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J., Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Gene. Dev.* 17, 2205-32.

Hotokezaka,H., Sakai, E., Kanaoka, K., Saito, K., Matsuo,K., Kitaura, H., Yoshida, N.,

Nakayama, K. (2002). U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells. *J Biol Chem.*277, 47366-72.

Hsu, H., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H.L., Elliott, G., Kelley, M.J., Sarsi, I., Wang, L., Xia, X.Z., Elliott, R., Chiu, L., Black, T., Scully, S., Capparelli, C., Morony, S., Shimamoto, G., Bass, M.B., Boyle, W.J. (1999). Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96, 3850-5.

Igarashi, N., Okada, T., Hayashi, S., Fujita, T., Jahangeer, S., and Nakamura, S. (2003). Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *J Biol Chem.* 278(47), 46832-9.

Ishida, N., Hayashi, K., Hoshijima, M., Ogawa, T., Koga, S., Miyatake, Y., Kumegawa, M., Kimura, T., Takeya, T. (2002). Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J. Biol. Chem.* 277, 41147-56.

Ishida, N., Hayashi, K., Hattori, A., Yogo, K., Kimura, T., Takeya, T. (2006). CCR1 acts downstream of NFAT2 in osteoclastogenesis and enhances cell migration. *J. Bone Miner. Res.* 21, 48-57.

Ikeda, F., Nishimura, R., Matsubara, T., Tanaka, S., Inoue, J., Reddy, S.V., Hata, K., Yamashita, K., Hiraga, T., Watanabe, T., Kukita, T., Yoshioka, K., Rao, A., and Yoneda, T. Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. (2004). *J Clin Invest.* 114(4), 475-84.

Iwamoto, T., Fukumoto S., Kanaoka K., Sakai, Eiko., Shibata M., Fukumoto, E., Inokuchi, J., Takamiya, K., Furukawa, K., Furukawa K., Kato, Yuzo., and Mizuno A. (2001) Lactosylceramide Is Essential for the Osteoclastogenesis Mediated by Macrophage-Colony-stimulating Factor and Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 46031-46038.

Johnson, R.S., Spiegelman, B.M., Papaioannou, V. (1992). Pleiotropic effects of a null mutation in the *c-fos* proto-oncogene. *Cell.* 71, 577-86.

Kanazawa, K., Kudo, A. (2005). Self-Assembled RANK Induces Osteoclastogenesis Ligand-Independently. *J. Bone Miner. Res.* 20, 2053-2060

Kong, Y.Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Mark, T.W., Boyle, W.J., Penninger, J.M. (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* 397, 315-323

Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, and Hannum YA. (2008) The sphingolipids salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal.* 20, 1010-1008.

Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M.M., Dickson, R. and Spiegel, S. (1998) Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 23722-23728.

Koning, T.J., Snell, K., Duran, M., Berger, R., Poll-The, B.T., Surtees, R. (2003). L-serine in disease and development. *Biochem. J.* 371, 653-61.

Lagasse, E., Weissman, J.L. (1997). Enforced Expression of Bcl-2 in Monocytes Rescues Macrophages and Partially Reverses Osteopetrosis in *op/op* Mice. *Cell.* 89, 1021-1031.

Liu, H., Sugiura, M., Nava, V.E., Edsall, L.C., Kono, K., Poulton, S., Milstein, S., Kohama, T. and Spiegel, S. (2000) Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol. Chem.* 75, 19513-19520

Lomaga, M.A., Yeh, W.C., Sarosi, I., Duncan, G.S., Furlonger, C., Ho, A., Morony, S., Capparelli, C., Van, G., Kaufman, S., van, der, Heiden, A., Itie, A., Wakeham, A., Khoo, W., Sasaki, T., Cao, Z., Penninger, J.M., Paige, C.J., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Boyle, W.J., Goeddel, D.V., Mak, T.W. (1999). TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.* 13, 1015-1024

Maceyka, M., Sankala, H., Hait, N.C., Le Stunff, H., Liu, H., Toman, R., Collier, C.,

Zhang, M., Satin, L.S., Merrill, A.H. Jr., Milstien, S., and Spiegel, S. (2005). SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem.* 280(44), 37118-29.

Matsumoto, M., Sudo, T., Saito, T., Osada, H., Tsujimoto, M. (2000). Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). *J. Biol. Chem.* 275, 31155-61.

Matsuo, K., Galson, D.L., Zhao, C., Peng, L., Laplace, C., Wang, K.Z., Bachler, M.A., Amani, H., Aburatani, H., Ishikawa, H., Wagner, E.F. (2004). Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos. *J. Biol. Chem.* 279, 26475-80.

Matsuo, K., Owens, J.M., Tonko, M., Elliott, C., Chambers, T.J., and Wagner, E.F. (2000). Fos11 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation. *Nat Genet.* 24(2), 184-7.

McGill, G.G., Horstmann, M., Widlund, H.R., Du, J., Motyckova, G., Nishimura, E.K., Lin, Y.L., Ramaswamy, S., Avery, W., Ding, H.F., Jordan, S.A., Jackson, I.J., Korameyer, S.J., Golib, T.R., Fisher, D.E. (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell.* 14, 707-718

Mizukami, J., Takaesu, G., Akatsuka, H., Sakurai, H., Ninomiya-tsuji, J., Matsumoto, K., Sakurai, N. (2002). Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. *Mol Cell Biol.* 22, 992-1000.

Nemoto, S., Nakamura, M., Osawa, Y., Kono, S., Itoh, Y., Okano, Y., Murate, T., Hara, A., Ueda, H., Nozawa, Y. and Banno, Y. (2009) Sphingosine kinase isoforms regulate oxaliplatin sensitivity of human colon cancer cells through ceramide accumulation and Akt activation. *J. Biol. Chem.* 284, 10422-10432.

Naito, A., Azuma, S., Tanaka, S., Miyazaki, T., Takaki, S., Takatsu, K., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Yamamoto, T., Inoue, J. (1999). Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient

mice. *Genes cells.* 4, 353-362

Oh, H.K., Chong, K, Lee., Young, I, L.(2005). The hematopoietic transcription factor PU.1 regulates RANK gene expression in myeloid progenitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 437-446.

Okada, T., Ding, G., Sonoda, H., Kajimoto, T, Haga, Y., Khosrowbeygi, A., Gao, S., Miwa, N., Jahangeer, S. and Nakamura, S. (2005) Involvement of N-terminal-extended form of sphingosine kinase 2 I serum-dependent regulation of cell proliferation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280, 36318-36325.

Ogawa, T., Ishida-Kitagawa, N., Tanaka, A., Matsumoto, T., Hirouchi, T., Akimaru, M., Tanihara, M., Yogo, K. and Takeya, T. (2006) A novel role of L-serine (L-Ser) for the expression of nuclear factor of activated T cells (NFAT)2 in receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis in vitro. *J. Bone Miner. Metab.* 24, 373-379.

Paddison, P.J., Clearly, M., Silva, J.M., Chang, K., Sheth, N., Sachidanandam, R. and Hannon, G.J. (2004) Cloning of short hairpin RNAs for gene knockdown in mammalian cells. *Nat. Methods* 1, 163-167.

Pitson, S.M., Moretti, P.A., Zebol, J.R., Xia, P., Gamble, J.R., Vadas, M.A., D'Andrea, R.J. and Wattenberg, B.W. (2000) Expression of a catalytically inactive sphingosine kinase mutant blocks agonist-induced sphingosine kinase activation. A dominant-negative sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* 275, 33945-33950.

Peichuan, Z., Barbara, C.(2002). The GCN2 eIF2 α Kinase Is Required for Adaptation to Amino Acid Deprivation in Mice. *Mol Cell Biol.* 22(19). 6681–6688.

Price. M.A., Cruzalegui, F.H., Treieman, R. (1996). The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light. *EMBO. J.* 15, 6552-63.

Ryu, J., Kim, HJ., Chang, EJ., Huang, H., Banno, Y., and Kim, HH. (2006). Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *EMBO J.* 25(24), 5840-51.

Sauane, M., Su, Z.Z., Dash, R., Liu, X., Norris, J.S., Sarkar, D., Lee, S.G., Allegood, J.C., Dent, P., Spiegel, S. and Fisher, P.B. (2009) Ceramide plays a prominent role in MDA-7/IL-24-induced cancer specific apoptosis. *J. Cell. Phys.* 222, 546-555.

Sanchez, T., Estrada-Hernandez, T., Paik, JH., Wu, MT., Venkataraman, K., Brinkmann, V., Claffey, K., and Hla, T. (2003). Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. *J Biol Chem.* 278(47), 47281-90.

Spiegel, S. and Milstien, S. (2003) Exogenous and intracellularly generated sphingosine 1-phosphate can regulate cellular processes by divergent pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1216-1219.

Sergio E. Alvarez, Kuzhuvilil B. Harikumar, Nitai C. Hait, Jeremy Allegood, Graham M. Strub, Eugene Y. Kim, Michael Maceyka, Hualiang Jiang, Cheng Luo, Tomasz Kordula, Sheldon Milstien & Sarah Spiegel.(2010) Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature*, 465, 1084-1088.

Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T., Martin, T.J. (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 20, 345-357

Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E.F., Mak, T.W., Kodama, T., Taniguchi, T. (2002). Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev.Cell.* 3,889-901.

Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, O., Suzuki, H., Sato, K., Yokochi, T., Oda, H., Nakamura, K., Ida, N., Wagner, E.F., Taniguchi, T. (2002). RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of IFN- β . *Nature.* 416, 744-9.

Takeda, H., Ozaki, K., Yasuda, H., Ishida, M., Kitano, S. and Hanazawa, S. (1998) Sphingomyelinase and ceramide inhibit formation of F-actin ring in and bone resorption by rabbit mature osteoclasts. *FEBS Lett.* 422, 255-258.

- Tanaka, S., Nakamura, I., Inoue, J., Oda, H., Nakamura, K. (2003). Signal transduction pathways regulating osteoclast differentiation and function. *J. Bone. Miner. Metab.* 32, 123-33.
- Tan, Y., Rouse, J., Zhang, A., Cariati, S., Cohen, P., Comb, M.J. (1996). FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO. J.* 15, 4629-42.
- Terasawa, K., Okazaki, L., Nishida, E. (2003). Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway. *Genes. Cells.* 8, 263-73.
- Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8,205-15
- Teitelbaum, S.L., and Ross,F.P.(2003). Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4,638-649
- Teitelbaum, S.L. (2007) Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am. J. Pathol.* 170, 427-435.
- Vessey, DA.,Kelley, M. Zhang, J., Li, L., Tao, R., and Karliner, JS. (2007). Dimethylsphingosine and FTY720 inhibit the SK1 form but activate the SK2 form of sphingosine kinase from rat heart. *J Biochem Mol Toxicol.* 21(5), 273-9.
- Wagner, E.F., Eferl, R. (2005). Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol. Rev.* 208, 126-40.
- Wang, Z.Q., Ovitt, C., Grigoriadis, A.E., Mohle-Steinlen, U., Ruther, U., Wagner, E.F. (1992). Bone and hematopoietic defects in mice lacking *c-fos*. *Nature.* 360, 741-5
- Weilbaecher, K.N., Motyckova, G., Huber W.E., Takemoto, C.M., Hemesath, T.J., Xu, Y., Hershey, C.L., Dowland, N.R.,Wells, A.G., Fisher, D.E. (2001). Linkage of M-CSF signaling to Mitf, TFE3, and the osteoclast defect in Mitf^{mi/mi} mice. *Mol Cell.* 8, 749-758.
- Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, Jr, A.W., Ahmed-Ansari, A., Sell, K.W.,

Pollard, J.W., Stanley, E.R. (1990). Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 87, 4828-32.

Wong, B.R., Josien, R., Lee, S.Y., Vologoskaia, M., Steinman, R.M., Choi, Y. (1998). The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem.* 273, 28355-9.

Ye, H., Arron, J.R., Lamothe, B., Cirilli, M., Kobayashi, T., Shevde, N.K., Seqal, D., Dzivenu, O.K., Vologodskaja, M., Yim, M., Du, K., Singh, S., Pike, J.W., Darnay, B.G., Choi, Y., Wu, H. (2002). Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* 418, 443-447

Yopp, AC., Fu, S., Honig, SM., Randolph, GJ., Ding, Y., Krieger, NR., and Bromberg, JS. FTY720-enhanced T cell homing is dependent on CCR2, CCR5, CCR7, and CXCR4: evidence for distinct chemokine compartments. (2004). *J Immunol.* 173(2), 855-65.

Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L.D. (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature.* 345, 442-444.

Zhiyuan, Z., Eijiro, J.(2003). Receptor Activator of NF-kB Ligand Stimulates Recruitment of SHP-1 to the Complex Containing TNFR-Associated Factor 6 That Regulates Osteoclastogenesis. *J. Immunol.* 171: 3620-3626.

Zeidan, YH. and Hannun, YA. (2010) The acid sphingomyelinase/ceramide pathway: biomedical significance and mechanisms of regulation. *Curr. Mol. Med.* 10, 454-466.