

## 論文内容の要旨

申請者氏名 錫林其其格

破骨細胞は分化誘導因子 RANKL の刺激により単球・マクロファージ系の前駆細胞から分化する多核巨細胞である。当研究室ではこれまでに、転写因子 NFAT2 が破骨細胞分化の鍵因子であり、破骨細胞の特徴的な形質である細胞融合活性および骨吸収性の獲得に必須であることを報告している。さらに、NFAT2 標的候補遺伝子を DNA チップ解析で行った先行研究において、酸性条件下でスフィンゴミエリンを加水分解しセラミドを産生する酵素である ASM(Acid Sphingomyelinase)を見出していた。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が、その代謝や作用機序については未だ不明な点が多い。以上の知見に基づき、本研究では破骨細胞におけるスフィンゴ脂質の代謝や働きの理解を目指し、NFAT2 制御下で発現する ASM の作用機序を中心に分子レベルでの解析を行った。

まず、初代骨髄マクロファージ (BMM) を用いた *in vitro* 分化誘導系における ASM の発現変動を検討した結果、ASM は mRNA およびタンパクともに RANKL 刺激 48 時間後から NFAT2 依存的に発現誘導されることを確認した。

次に、ASM の破骨細胞分化やその機能における役割を理解するため、強制発現および発現抑制実験を行った。作成したノックダウン細胞を用いて分化誘導実験を行った結果、TRAP 陽性多核細胞への分化が明らかに亢進していた。本知見は ASM がセラミド産生を介して破骨細胞分化を負に制御することを示唆している。また、ASM は p38-c-Fos-NFAT2 経路を負に制御することで破骨細胞分化を抑制することを示した。

セラミドは、様々な酵素により代謝されその細胞内含有量が調節されている。スフィンゴシンキナーゼ(SphK)1 および 2 は細胞内セラミド量をそれぞれ正および負に調節することが知られているが、ASM ノックダウン細胞において、SphK2 の発現は対照細胞と変わらなかったのに対し、SphK1 は発現が抑制されていた。破骨細胞分化過程では、SphK1 が RANKL 刺激 48 時間以降に発現量が増加するのに対し、SphK2 は若干の増加が認められたのみであった。SphK1 および 2 をともに阻害する SKI を *in vitro* 分化系に添加すると破骨細胞の分化が阻害された。さらに、SphK 1/2 の強制発現とノックダウンを行った結果、SphK2 は発現抑制により破骨細胞への分化を抑制したのに対し、SphK1 は強制発現により分化を抑制した。以上の結果は、破骨細胞形成には SphK2 が正の、SphK1 が負の調節因子としてそれぞれ機能することが示唆された。

これまでの研究結果を踏まえて本論文では、ASM は SphK1 の発現誘導を介して p38-c-Fos-NFAT2 経路を負に制御し、SphK1-SphK2 間のバランスを調節することによって破骨細胞分化過程を制御するというモデルを提唱する。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 錫林其其格

破骨細胞は分化誘導因子 RANKL の刺激により単球・マクロファージ系の前駆細胞から分化する多核巨細胞である。破骨細胞は骨吸収を担う唯一の細胞として骨代謝の中心的な役割を果たしており、その分化や機能の破綻は骨粗しょう症などの疾患に関係していることから、破骨細胞の分化や骨吸収機構を明らかにすることは非常に重要な課題である。

申請者は、先行研究で得られていた分化制御機構に関する知見を基に、分化過程で誘導される遺伝子 ASM(Acid Sphingomyelinase)を対象として破骨細胞分化制御機構の理解を深める目的で研究を行った。特に、ASM は、酸性条件下でスフィンゴミエリンを加水分解しセラミドを産生する酵素であることから、本研究では破骨細胞におけるスフィンゴ脂質の代謝や働きに注目し、NFAT2 制御下で発現する ASM の作用機序を中心に分子レベルでの解析を行った。

その結果、申請者は、

- ①ASM は mRNA およびタンパクともに RANKL 刺激 48 時間後から発現誘導され、かつこの発現誘導は NFAT2 核内移行阻害剤であるシクロスポリン A により阻害されることを確認した。
- ②ASM の役割を理解するため、強制発現ならびに発現抑制系を確立し、分化におよぼす影響を解析することにより、ASM がセラミド産生を介して破骨細胞分化を負に制御することを示した。また、ASM は p38-c-Fos-NFAT2 経路を負に制御することで破骨細胞分化を抑制するというメカニズムにも迫った。
- ③ASM ノックダウン細胞において、SphK2 の発現は対照細胞と変わらなかったのに対し、SphK1 は発現が抑制されていた。すなわち、両者の間には分化過程での役割の違いを示唆する結果であった。そこで、SphK1 および 2 についての恒常的発現細胞およびノックダウン細胞株を樹立、利用した解析から、破骨細胞形成には SphK2 が正の、SphK1 が負の調節因子としてそれぞれ機能することを明らかにすることが出来た。

これらの研究結果を踏まえて、申請者は、ASM は SphK1 の発現誘導を介して p38-c-Fos-NFAT2 経路を負に制御し、SphK1-SphK2 間のバランスを調節することによって破骨細胞分化過程を制御するというモデルを提唱している。

以上のように、本論文は骨代謝において中心的な役割を果たすと共に様々な骨疾患に関わる破骨細胞分化に関する新しい制御機構を見出したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。