

## [別紙1]

### <論文の内容の要旨>

#### 論文題目

The Role of Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor in Osteoclastogenesis and the Identification of a Novel Molecular Mechanism for Osteoclast Differentiation

破骨細胞分化におけるイノシトール 1, 4, 5 -三リン酸受容体の役割と新規

破骨細胞分化メカニズムの解明

指導教員 御子柴克彦 教授

東京大学大学院医学系研究科 平成 15 年 4 月入学

医学博士課程 脳神経医学専攻

黒田有希子

#### <内容の要旨>

私は破骨細胞分化におけるイノシトール 1, 4, 5 -三リン酸受容体 ( $IP_3R$ ) の役割の解明と  $IP_3R$  ノックアウトマウスの解析を進めることで発見した新規破骨細胞分化メカニズムについての解析を行なった。

骨疾患は高齢化の進む現代社会の大きな問題であり、早期の骨疾患の原因究明・新規治療薬の開発が望まれている。そのため、近年骨形成機構の分子レベルでの解析が盛んに行われてきた。その一端として、破骨細胞分化因子 (RANKL: receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) による破骨細胞分化誘導時においてカルシウムオシレーションが観察されること、また破骨細胞の分化には nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1 の活性が必要かつ十分であることが報告された (Takayanagi et al. (2002) Dev. Cell 3, 889-901)。そこで、私は、カルシウムオシレーションの制御因子の一つであり、かつ NFAT の活性化にも寄与することが報告されている  $IP_3R$  のノックアウトマウスを用いて、破骨細胞

分化における  $IP_3R$  の役割を解明することを目的とした。

破骨細胞における  $IP_3R$  の役割を調べるために、まず破骨細胞に発現している  $IP_3R$  のサブタイプを調べ、各サブタイプのノックアウトマウス由来の細胞を用いて RANKL による *in vitro* での破骨細胞分化を検討した。哺乳類において、 $IP_3R$  は type1、type2、および type3 の 3 つのサブタイプが報告されているが、破骨細胞では  $IP_3R$  type2 と type3 が発現しており、type1 の発現はウエスタンプロットティングでは確認できなかった。さらに全てのサブタイプを認識する共通配列に対する抗体である Pan $IP_3R$  抗体を用いて各サブタイプの発現量の比を調べたところ、破骨細胞に発現している  $IP_3R$  の多くは type2 であることを明らかにした。また、*in vitro* での RANKL 誘導による破骨細胞分化は  $IP_3R$  type3 をノックアウトした細胞では野生型 (WT) と同様に多核の破骨細胞への分化が観察されたのに対し、 $IP_3R$  type2 をノックアウトした細胞ではこの分化が著しく阻害された。さらにこの結果と一致して、RANKL 刺激によるカルシウムオシレーション、および NFATc1 の活性化（核内移行）も  $IP_3R$  type2 を欠損した細胞では観察されなかった。これらの結果から、RANKL 添加によって観察されるカルシウムオシレーションには  $IP_3R$  type2 が重要であることが明らかとなった。次に  $IP_3R$  type2 を欠損した細胞の破骨細胞分化異常の原因が、カルシウムオシレーションを介した NFATc1 の活性化の欠損に起因するかを調べる為に、 $IP_3R$  type2 および type3 のダブルノックアウト ( $IP_3R2/3KO$ ) マウス由来の細胞に活性化型 NFATc1 を発現させ、破骨細胞分化を検討した。その結果、活性化型 NFATc1 を発現させた  $IP_3R2/3KO$  細胞は WT と同様に多核の破骨細胞へ分化した。以上の結果から、*in vitro* における RANKL 誘導による破骨細胞分化において、 $IP_3R$  type2 はカルシウムオシレーションに必須な分子であり、 $IP_3R$  type2 を介したカルシウムオシレーションが NFATc1 の活性化に必要であることが明らかとなった（図 1）。

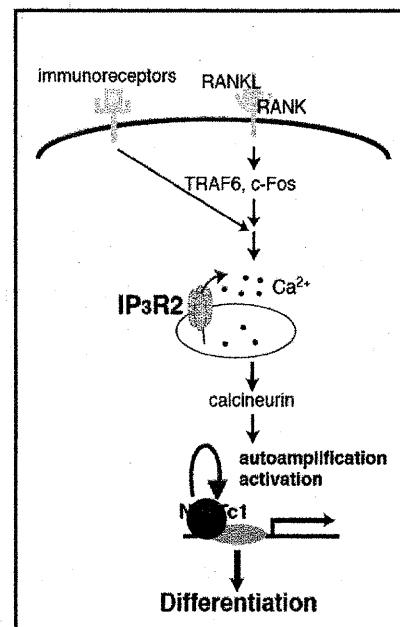


図1. RANKL添加により誘導される  
破骨細胞分化メカニズム

しかしながら、*in vitro* の実験結果に反して IP<sub>3</sub>R type2 ノックアウトマウスおよび IP<sub>3</sub>R2/3KO マウスの大腿骨では、分化した破骨細胞が数多く観察された。この結果から、私は生体内では IP<sub>3</sub>R 非依存的な新規破骨細胞分化メカニズムが機能している可能性が高いと考えた。そこで、この新しい分化メカニズムを明らかにするため、RANKL 添加による破骨細胞分化誘導よりも生体内の状態に近いと考えられる骨芽細胞による破骨細胞分化誘導を行い、IP<sub>3</sub>R type2 をノックアウトした細胞の分化状態を解析した。すると、RANKL 添加による分化誘導時とは異なり、骨芽細胞との共存培養により IP<sub>3</sub>R type2 をノックアウトした細胞でも多核の破骨細胞へ分化した。現在までの知見では、破骨細胞分化において必須分子である NFATc1 の活性化にはカルシウムオシレーションが必要であると考えられている為、骨芽細胞によって IP<sub>3</sub>R 非依存的なカルシウムオシレーションが起きている可能性が高いと考え、次に骨芽細胞との共存培養下でのカルシウムオシレーションの計測を行った。すると、驚くべきことに、分化した IP<sub>3</sub>R type2 欠損細胞は NFATc1 が活性化しているにも関わらず、カルシウムオシレーションは全く観察できなかった。さらに、このカルシウム非依存的な破骨細胞分化シグナルの存在を確かめる為に、骨芽細胞との共存培養条件下でカルシニューリンの阻害剤 FK506 の破骨細胞分化への影響を調べた。カルシニューリンはカルシウムによって活性化する phosphatase で、NFAT を活性化することが知られている。つまり、FK506 存在下でも破骨細胞の分化が確認されれば、カルシウムおよびカルシニューリン非依存的な分化メカニズムの存在が強く示唆されることになる。RANKL 添加によるカルシウム依存的な破骨細胞分化誘導時には、FK506 によって破骨細胞分化が完全に阻害されるのに対し、骨芽細胞との共存培養条件下では、FK506 によって分化した細胞は約半数に減少したものの、破骨細胞への分化は完全には阻害されなかった。これらの結果は、生体内および骨芽細胞との共存培養下ではカルシウム／カルシニューリン依存的、および非依存的な破骨細胞分化メカニズムがともに機能しているという、破骨細胞分化メカニズムにおいて全く新しい概念を提示しており、非常に興味深い結果であった。

次にこの新規破骨細胞分化メカニズムの分子機構を調べるためにあたって、まず、Cot/Tpl2 kinase に注目した。Cot/Tpl2 kinase は培養細胞に過剰発現することによってカルシウム、カルシニューリン非依存的に NFAT を活性化すること

が報告されている kinase である。Cot/Tpl2 をノックアウトした細胞の RANKL 添加、および骨芽細胞による破骨細胞分化誘導を観察したところ、RANKL 添加による分化誘導に関しては WT と全く差が無かったが、骨芽細胞との共存培養条件下で FK506 を添加した際の分化誘導、つまりカルシウム／カルシニューリン非依存的な分化メカニズムによる分化誘導は、WT と比べて有意に減少していた。この結果は Cot/Tpl2 kinase がカルシウム非依存的な破骨細胞分化メカニズムに寄与していることを強く示唆している。さらに、この新規破骨細胞分化メカニズムが生体内でも機能しているかどうかを調べる為に、IP<sub>3</sub>R type2 と Cot/Tpl2 kinase のダブルノックアウト (IP<sub>3</sub>R2/CotKO) マウスを作製し、生体内での破骨細胞の数、活性等を IP<sub>3</sub>R type2 ノックアウトマウスと比較した。その結果、カルシウム依存的およびカルシウム非依存的な分化シグナルの両方が阻害されている IP<sub>3</sub>R2/CotKO マウスは、カルシウム依存的破骨細胞分化シグナルのみが阻害されている IP<sub>3</sub>R type2 ノックアウトマウスに比べて、生体内での破骨細胞数、活性ともに有意に減少していた。以上の結果より、Cot/Tpl2 kinase を含むカルシウム非依存的な破骨細胞分化メカニズムが実際に生体内でも機能していることが明らかとなり、生体内では破骨細胞分化においてカルシウム依存的、および非依存的な分化メカニズムが共に機能していることが強く示唆された（図 2）。

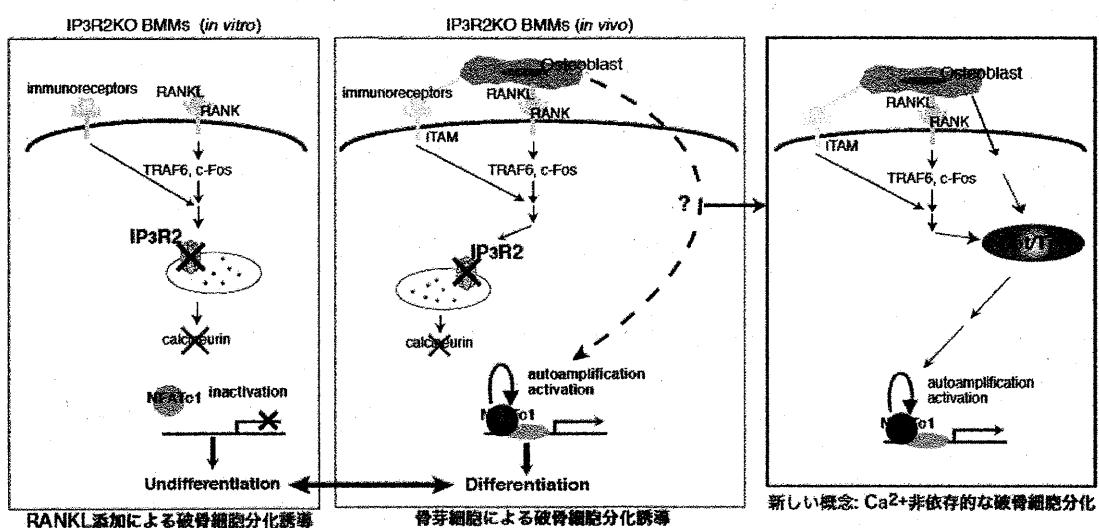


図2.本論文のまとめ

私は、本研究において、破骨細胞分化に重要な働きを持つカルシウムシグナルに IP<sub>3</sub>R type2 が必須な分子であることをノックアウトマウスを用いて明らかにした。また、本研究の最も重要な点は生体内の破骨細胞分化において、力

ルシウム非依存的な分化メカニズムが存在するという全く新しい概念を提示し、その新しいメカニズムの分子機構の一端を明らかにした点である。今後の骨疾患の原因究明・新規治療薬の開発において、この新しいメカニズムの発見は大きな貢献をし得るものと考えている。