

## 審査の結果の要旨

中村 正樹

本研究は破骨細胞の機能および生存を制御する細胞内シグナルの解明を明らかにすることを目的とした。生存についてはデスレセプターのアダプター蛋白である FADD (Fas associated death domain) の dominant negative 型遺伝子を強制発現させ、マウス破骨細胞のアポトーシスにおけるデスレセプター経路の関与を検討した。また機能については、破骨細胞特異的ノックアウトマウスを作出・解析することにより、class IA PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) による制御機構の解明を試みた。本研究により下記の結果を得ている。

1. マウス破骨細胞のアポトーシス過程において Caspase-8 が活性化されていることを確認した。Dominant negative 型 FADD (FADD<sup>DN</sup>)としてヒト型 FADD の death effector domain の一部を欠失した構造を用い、これをアデノウイルスベクターに組み込んで破骨細胞に強制発現させたもの、および Caspase-8 阻害剤投与群はアポトーシスが抑制され、生存が亢進していた。このことから破骨細胞のアポトーシスにおいて FADD – Caspase-8 を介する経路が関与していることが示された。
2. デスレセプターに対するリガンドである FasL、TRAIL、TNF- $\alpha$  および Fas の agonist として作用する抗体を投与して、破骨細胞のアポトーシスへの影響を検討した。しかしながらこれらのいずれによってもアポトーシスへの影響は見られなかった。
3. class IA PI3K による破骨細胞の制御を解明することを目的として、Cathepsin-K-Cre ノックインマウスと *Pik3r1* (p85 $\alpha$  およびそのスプライシングバリエントである p55 $\alpha$ 、p50 $\alpha$  をコードする) flox マウス、および *Pik3r2* (p85 $\beta$  をコードする) ノックアウトマウスを交配させ、p85 の破骨細胞特異的ノックアウトマウスを作出した。p85 $\alpha$  cKO マウスはコントロールマウスと比較して明らかな骨量の変化が認められなかったが、p85 $\alpha$  cKO  $\beta^{-/-}$  マウスは p85 $\alpha$  flox/flox  $\beta^{-/-}$  マウスと比較して放射線学および組織学的に骨量が増加していた。骨形態計測の結果は骨吸収・骨形成ともに低下していたが、破骨細胞数に違いはなかった。また骨石灰化速度に違いはなかった。これらの結果から、p85 $\alpha$  cKO  $\beta^{-/-}$  マウスは破骨細胞の機能低下による低代謝回転型の骨量増加を示すと考えられた。
4. p85 $\alpha$  cKO  $\beta^{-/-}$  マウス由来の骨髓細胞から分化させた破骨細胞 (p85 DKO) は細胞の広がり少なく、アクチンもリングを形成せず瀰漫性に存在しており、細胞骨格の障害が認められた。また骨吸収窩測定により骨吸収機能を評価すると、p85 DKO 破骨

5. p85 DKO 破骨細胞の生存については、増殖因子などを加えない定常状態では有意差が見られなかった。M-CSF を加えた培養条件下では p85 DKO 破骨細胞の方が生存が亢進していた。

以上、本論文は前半部分において、マウス破骨細胞のアポトーシスには FADD – Caspase-8 を介する経路が関与しており、その上流には既知のデスレセプター刺激以外からのシグナルが作用している可能性を示した。また後半部分においては、class IA PI3K が破骨細胞の細胞骨格および骨吸収機能を制御していることを明らかにした。本研究は、これまで未解明の点が数多く残されていた破骨細胞の機能および生存を制御する細胞内シグナル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。