

審査の結果の要旨

氏名 田口 祐

本研究は骨吸収を司る細胞である破骨細胞の分化メカニズムを明らかにするため、分化シグナルを担う受容体 RANK の細胞質内領域に関して分子生物学的解析を試みたもので、下記の結果を得ている。

1. マウス RANK 膜貫通領域・細胞質内領域とヒト CD40 細胞外領域を融合させたキメラ受容体 h40/mRK-EAA において細胞内領域欠失変異体をシリーズで構築し、それぞれの変異受容体における破骨細胞分化誘導能の検討を行い、破骨細胞分化誘導に必須である新規領域を同定した。また、各動物種由来の RANK アミノ酸配列におけるアライメント解析から同定した新規領域が高度に保存されていることが明らかになり、**Highly Conserved domain in RANK (HCR)**と名付けた。
2. RANK 下流のシグナル分子を解析したところ、RANK や h40/mRK-EAA への刺激では I κ B α と PLC γ 2 のリン酸化が刺激 24 時間後以降まで持続しているのが見られたが、HCR 欠失変異受容体への刺激ではその持続が消失していた。HCR には RANK シグナルの活性化を長時間維持する機能が有ると推察された。
3. 破骨細胞分化を誘導できない受容体 CD40 に HCR を挿入することで、破骨細胞分化誘導能が付与された。また、この挿入キメラ受容体への刺激では PLC γ 2 のリン酸化が刺激 24 時間後以降まで持続しているのが明らかになった。これらのことより、HCR は新規機能領域であることが示唆された。
4. 破骨前駆細胞の RANK を刺激してから 24 時間後に PLC γ に対する阻害剤を添加したとこ

ろ、破骨細胞分化が阻害された。この結果より、RANK シグナルの活性化が長時間維持されることが破骨細胞分化に重要であることが示唆された。

5. 293T 細胞を用いた過剰発現実験系において、アダプター分子 Gab2 と DAP12 が HCR と会合することが明らかになった。また、破骨前駆細胞において Gab2 が刺激依存的に h40/mRK-EAA と結合することが明らかになり、HCR において新規シグナル複合体が形成されることが示唆された。
6. HCR のアミノ酸配列をペプチドとして破骨前駆細胞内に発現させることで、破骨細胞分化誘導が抑制された。HCR は骨吸収性疾患に対する治療法開発において標的に成り得ることが示唆された。
7. 刺激依存的な受容体の局在変化を検討したところ、HCR を持つ受容体は刺激依存的に細胞内へ internalization され、late endosome / lysosome へと局在を変化させることが明らかになった。HCR は受容体の internalization を促進する役割を担っていることが示された。

以上、本論文は受容体 RANK において破骨細胞分化誘導に必須である新規機能領域 HCR を同定し、更に HCR の機能と分子機構を明らかにしたものである。本研究はこれまで未知であった受容体 RANK における破骨細胞分化誘導シグナルの分子メカニズムの解明に重要な貢献をなし、更に骨吸収性疾患への新規治療方法開発へも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。