

## 論文の内容の要旨

論文題目 破骨細胞における Stat5 の機能解析に関する研究

氏名 廣瀬 旬

### 【要旨】

骨は主に破骨細胞が担う骨吸収と骨芽細胞が担う骨形成を繰り返すこと、いわゆるリモデリングにより維持されている。この骨吸収と骨形成のアンバランスが骨粗鬆症や大理石骨病の原因となる。破骨細胞は生体内で唯一の吸収能を有する多核巨細胞であり、単球・マクロファージ系の前駆細胞にマクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor、M-CSF) および RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) が作用することにより分化することが知られている。近年、破骨細胞に関連する遺伝子やサイトカインを標的とした研究や治療が推し進められており、実際にこのような因子が少しずつ同定されている。それらの中には疾患治療の標的として臨床試験が行われているものもあり、注目を集めている。しかしながら、いまだ破骨細胞の分化メカニズムにも不明な部分は多く、活性化メカニズムに至ってはほとんど解明されていないと言っても過言ではない。

Stat (Signal transducers and activators of transcription) は様々なサイトカインや成長因子の刺激を細胞内に伝達し、下流分子の転写を促進あるいは抑制する転写因子である。この Stat の中でも Stat5 は体中の多くの組織で発現し、非常に多彩なサイトカインや成長因子によって活性化することが知られている。特に血球系の細胞において Stat5 は様々な機能を果たしていることが明らかになっているが、血球系の細胞である破骨細胞における機能についてはこれまでに報告がない。

本研究においては血球系由来の破骨細胞において Stat5 がその分化・生存・機能に関わっているのはいかと考え、破骨細胞における Stat5 の機能についての解析を行うこととした。

まず Stat5a および Stat5b の遺伝子を loxP 配列で挟み込んだ Stat5<sup>fl/fl</sup> マウスと Cathepsin K のプロモーター領域に Cre リコンビナーゼ遺伝子をノックインさせた Cathepsin K-Cre ノックインマウスを交配させることにより、破骨細胞特異的 Stat5 ノックアウトマウス (Stat5 cKO マウス) を作成し、その表現型を解析した。

Stat5 cKO マウスは成長障害などは見られなかったが、レントゲン写真や DEXA、マイクロ CT において骨量の低下が認められた。骨形態計測では単位骨量の減少、eroded surface / bone surface ratio の有意な増加がみられたが、破骨細胞数および破骨細胞面に有意な差はみられなかった。骨形成パラメー

ター (MAR、BFR / BS) についても有意な差はみられなかった。骨吸収マーカーである CTx-I および骨形成マーカーである osteocalcin の血清中濃度を測定したところ、CTx-I は *Stat5*cKO マウスにおいて *Stat5<sup>fl/fl</sup>* マウスと比較して有意に濃度が上昇していたが、osteocalcin 濃度には有意差がみられなかった。これらの結果は *Stat5*cKO マウスにおいて破骨細胞の骨吸収活性の亢進により骨量が減少していることを示す結果であった。

次に、*in vitro* において *Stat5* のノックアウトが破骨細胞の分化・生存・機能に与える影響を調べた。*Stat5<sup>fl/fl</sup>* マウスより採取した骨髄細胞にレトロウイルスベクターを用いて Cre recombinase を強制発現させて *Stat5* を *in vitro* にてノックアウトした。この *Stat5* ノックアウト細胞およびレトロウイルスベクターにて GFP を強制発現させたコントロール細胞に RANKL を添加して破骨細胞分化を誘導したところ、破骨細胞分化に明らかな差はなく、破骨細胞分化に対して *Stat5* は重要ではないと考えられた。*Stat5<sup>fl/fl</sup>* マウスおよび *Stat5*cKO マウスより採取した骨髄細胞から作成した破骨細胞につき生存率を調べたところ、やはり両者に有意な差は見られなかった。これにより *Stat5* は破骨細胞の生存能に対しても重要ではないことが明らかとなった。同様の細胞を用いて pit formation assay を行い骨吸収活性を評価したところ、*Stat5* ノックアウト破骨細胞において骨吸収活性が有意に亢進していた。この結果から、*Stat5* は破骨細胞の骨吸収活性を負に制御していることが示唆された。

*Stat5* ノックアウト破骨細胞における骨吸収活性の亢進の原因を調べるため、破骨細胞内のシグナルの中でも活性化に重要と考えられるシグナルであるMAPK 経路、NF $\kappa$ B 経路、Akt 経路、Src 経路につき、その活性化をWesternブロッティング法によるリン酸化の検出により調べたところ、*Stat5* ノックアウト破骨細胞においてMAPK、特に Erk の活性化が亢進していた。*Stat5* は転写因子であることから、MAPK 活性の亢進は *Stat5* による何らかの遺伝子の発現制御を介して行われていると考えた。この *Stat5* により制御される遺伝子を同定するため、*Stat5* ノックアウト破骨細胞とコントロール破骨細胞より採取した RNA を RT-DNA マイクロアレイに提出した。*Stat5* ノックアウト破骨細胞にて発現が 1/2 未満に低下していた遺伝子の中で MAPK のリン酸化に関与する遺伝子を抽出したところ、*Dual specificity phosphatase (Dusp)2* が同定された。*Dusp* とはリン酸化チロシンおよびセリン/スレオニンを脱リン酸化する一群のタンパクである。現在のところ 1 から 30 までが知られており、その約半分は MKPs (mitogen-activated protein kinase phosphatases)としての機能、すなわちMAPKの不活性化機能を持ち、それぞれが各々の MAPKに対する特異性をもつ。さらに詳細に *Stat5* ノックアウト破骨細胞における *Dusp* family の発現変化を調べるため、*Stat5* ノックアウト破骨細胞において real-time RT PCR を行い MAPK phosphatase 活性を持つ *Dusp* family 遺伝子の発現を調べたところ、*Dusp1*、*Dusp2* の発現が *Stat5* ノックアウト破骨細胞で有意に低下していた。*Stat5*cKO マウスおよび*Stat5<sup>fl/fl</sup>* マウスの骨髄細胞から培養した破骨細胞に、*Dusp1*、*Dusp2* アデノウイルスを感染させることで回復実験を行ったところ、*Stat5* ノックアウト破骨細胞における骨吸収活性亢進は、*Dusp1*、*Dusp2*の導入により回復した。

最後に破骨細胞において *Stat5* を活性化させる因子を同定するため、*Stat5* を活性化することが知られてい

る既知の因子である IL-2、IL-3、IL-5、GH、PRL、EGF にて破骨細胞を刺激した時の Stat5 リン酸化を調べた。これらの因子の中で、IL-3 のみが Stat5 をリン酸化することが示された。また、破骨細胞を IL-3 にて刺激した後、細胞質および核分画のタンパクを回収して、Western ブロットニングを行ったところ、IL-3 刺激後 15 分後をピークにリン酸化 Stat5、Stat5a、Stat5b とも核内に移行することが確認された。破骨細胞を IL-3 にて刺激し、*Dusp1*、*Dusp2* 発現量の変化を検討したところ、コントロール破骨細胞においてはIL-3 刺激後 20 分で *Dusp1*、*Dusp2* の発現が上昇したのに対し、Stat5 ノックアウト破骨細胞ではこのような発現の上昇がみられなかった。成熟破骨細胞の骨吸収能をIL-3存在下および非存在下において評価したところ、IL-3存在下においては、有意に破骨細胞の骨吸収活性が低下していた。成熟破骨細胞を RANKL 刺激したところ、刺激後 2 時間をピークに IL-3 の発現量の上昇がみられた。

以上の事実より、Stat5 は破骨細胞において *Dusp1* および *Dusp2* の発現調節を介して骨吸収活性を負に制御していることが示唆された。また、破骨細胞における Stat5 の活性化は IL-3 の刺激により誘導されている可能性が示唆された。