

審査の結果の要旨

氏名 廣瀬 旬

本研究は生体内で唯一骨吸収能を持つ細胞である破骨細胞における転写因子 Stat5 の機能を明らかにするため、破骨細胞特異的 Stat5 ノックアウトマウスを用いた *in vivo* および *in vitro* の両面での解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. *Stat5^{fl/fl}* マウスと *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) を作成して骨の表現型を解析したところ、骨量が有意に減少していることが示された。*Stat5 cKO* マウスにおいては骨形態計測における破骨細胞の骨吸収パラメーターおよび血清骨吸収マーカーが上昇しており、*Stat5 cKO* マウスは骨吸収亢進による骨粗鬆症を呈することが示された。
2. *Stat5^{fl/fl}* マウスより採取した骨髓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後、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かった。*Stat5 cKO* マウスより採取した骨髓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、コントロール細胞と差はなかった。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ることが示された。
3. Stat5 ノックアウト破骨細胞において、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、NFκB 経路、Akt 経路、Src 経路につき、その活性化を Western ブロットニ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ることが示された。
4. 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 を用いて RT-DNA マイクロアレイおよび *real-time RT PCR* を行ったところ、Stat5 ノックアウト破骨細胞において MAPK 脱リン酸化酵素である *Dual specificity phosphatase (Dusp) 1* および *Dusp2* の発現が低下していた。Stat5 ノックアウト破骨細胞における骨吸収活性亢進は、アデノウイルスベクターによる *Dusp1*、*Dusp2* の導入により回復することが示された。
5. 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ところ、IL-3 のみが Stat5 のリン酸化および核内移行を誘導することが示された。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。さらに、IL-3 は破骨細胞の骨吸収活性を抑制した。したがって破骨細胞において IL-3 が Stat5 の活性化を介して骨吸収活性を抑制していると考えられた。

以上、本論文は破骨細胞特異的 Stat5 ノックアウトマウスの解析から、転写因子 Stat5 が破骨細胞において MAPK 脱リン酸化酵素である Dusp1 および Dusp2 の発現調節を介して破骨細胞の骨吸収活性に対して抑制的に作用すること、および、IL-3 が Stat5 を活性化することを明らかにした。本研究はこれまで不明な部分が多かった破骨細胞の骨吸収活性化メカニズム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。