

氏名	昼間由晴		
学位の種類	博 士 (生物科学)		
学位記番号	博 甲 第 7748 号		
学位授与年月日	平成 28年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Identification and Functional Analysis of a Novel Osteoclastogenesis Regulator, Siglec-15 (新規破骨細胞分化調節因子Siglec-15の発見および機能解析)		
主査	筑波大学准教授	理学博士	坂本 和一
副査	筑波大学教授	理学博士	沼田 治
副査	筑波大学教授	博士 (医学)	千葉 智樹
副査	筑波大学教授	農学博士	宮崎 均

## 論 文 の 要 旨

骨は成長が停止した後も絶えず代謝を繰り返している。すなわち、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成である。この新陳代謝は一定のバランスが保たれる必要があるが、加齢や閉経に伴いこのバランスが崩れ、骨形成に対して骨吸収が優位になると、骨量が減少し骨粗鬆症などの病的状態に陥る。現在、種々の骨吸収抑制剤が臨床応用されているが、有効性、副作用、服薬コンプライアンスの観点から医療ニーズが十分に満たされているとは言えない。骨吸収を担う破骨細胞は機能的・形態的にユニークな細胞であるため、未だに見出されていない破骨細胞特異的なタンパク質が存在し、破骨細胞の分化・機能を調節している可能性がある。本研究は、骨粗鬆症治療薬開発につながる破骨細胞特異的な新規標的分子を探索し、その生理機能を解析するとともに創薬標的としての妥当性を検証することを目的とした。

まず、破骨細胞分化を調節する新規遺伝子を見出すため、破骨細胞様の骨巨細胞腫において特異的に発現量が変動する遺伝子を探索した。GeneLogic 社のヒト疾患遺伝子発現データベース (44,792 プローブ) からバイオインフォマティクス技術を用いて検索した結果、709 プローブが GCT で特異的に発現変動した。この中から一回膜貫通型タンパク質である CD84、Siglec-15、MEGF10、CLEC4A を候補遺伝子として絞り込み、マウス破骨細胞分化に伴う遺伝子発現の変化を qRT-PCR にて検証した。RANKL 刺激によりマウス単球/マクロファージ由来細胞 RAW264.7 から破骨細胞の分化を誘導したところ、破骨細胞の分化特異的に Siglec-15 の発現量が増加した。また、Siglec-15 は、ヒト破骨細胞においても分化に伴い発現量が上昇した。そこで、Siglec-15 細胞外ドメインに対するポリクローナル抗体を作製し、破骨細胞の分化に対する効果を解析した。RANKL 存在下で RAW264.7 を培養すると酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ陽性の多核巨細胞が多数形成されるが、Siglec-15 抗体の添加により多核巨細胞の形成が顕著に抑制された。同様の結果は、マウス初代培養骨髄細胞やヒト破骨前駆細胞を用いた試験でも確認された。以上の結果から、Siglec-15 がマウスおよびヒト破骨細胞の分化、特に細胞融合などの後期分化過程において重要な役割を果たしていることが明らかになった。

次に、Siglec-15 の生理的役割を明らかにするために、Siglec-15 ノックアウト (KO) マウスを作製し、骨

組織の解析を行った。Siglec-15 KO マウスはメンデルの法則に従って出生し、外観、体重、血液パラメータに変化はなく、骨以外の主要臓器では組織学的な変化は認められなかった。一方、骨においては顕著な変化が現れた。まず X 線撮影により KO マウス後肢を解析したところ、大腿骨の遠位部や脛骨近位部において海綿骨量が増加し、軽い大理石骨病を呈することが明らかとなった。大腿骨における骨量変化を解析したところ、KO マウスは野生型マウスに比べ、大腿骨遠位部から骨幹部にかけて骨密度が増加した。また、腰椎を micro CT で観察したところ、骨内部の海綿骨量が顕著に増加していた。一方、組織学的解析により、破骨細胞は Siglec-15 KO マウスにおいても野生型マウスと同様に形成されることが明らかになった。そこで、骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン排泄量を測定したところ、KO マウスでは野生型マウスに比べて有意に低下していることが判明した。従って、Siglec-15 KO マウスでは、破骨細胞は形成されるものの骨吸収機能に障害があり、骨量が増加したものと推察された。なお、KO マウス由来の骨髄細胞を用いた *in vitro* 破骨細胞形成試験では、RANKL 刺激により誘導される TRAP 活性の上昇が野生型マウス由来の細胞に比べて低下していることが確認され、Siglec-15 抗体を用いた *in vitro* 試験と同様の結果となった。以上の結果から、*in vivo* においては Siglec-15 の働きを一部補完するメカニズムが存在する可能性が示唆された。

本研究により、破骨細胞の分化・機能を調節する新規分子 Siglec-15 が新規に発見された。さらに、Siglec-15 に結合する抗体がヒト破骨細胞分化を抑制したこと、また KO マウスの結果から Siglec-15 の機能阻害により骨量が増加し、骨以外の臓器では所見が認められないことから、Siglec-15 は骨に特異的に作用する骨粗鬆症治療薬の新規標的分子となる可能性が明らかになった。本研究により、Siglec-15 という新規標的分子とその作用部位が明らかになり、臨床においても安全でより治療効果の高い治療薬の開発が可能になったもので、その意義は極めて大きい。

## 審 査 の 要 旨

本研究は、骨代謝のバランスに不可欠な破骨細胞の分化制御機構の解明を行った。本研究により、(1) 破骨細胞の分化制御に関わる新たな標的分子 Siglec-15 が見出され、分化後期過程における破骨細胞の分化・機能性に対する Siglec-15 の生理機能と作用機序を明らかにし、さらに、(2) Siglec-15 のノックアウトマウスが破骨細胞の分化・機能障害により大理石骨病様の病態を呈する事実を発見するなど極めて顕著な研究成果を挙げた。破骨細胞の分化制御に関わる新規標的分子の発見とその機能解明は、より効率的で副作用の小さい新規の骨粗鬆症治療薬の開発に直接結びつくもので、基礎分野から臨床応用分野に至る広範な科学の発展に貢献した。また、マウス生体内における新規標的分子の作用部位と作用動態の解明は、Siglec-15 を標的にした新規治療法の開発を可能にしたもので、その功績は極めて大きい。

平成 28 年 1 月 26 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。