

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏 名 梶 川 修 平
博士の専攻分野 博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号 乙 第 273 号
学位授与年月日 令和 4 年 4 月 21 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目 Profilin1 Negatively Controls Osteoclast Migration by Suppressin the Protrusive Structures based on Branched Actin Filaments
(Profilin1 は分枝状アクチン線維を抑制することで破骨細胞遊走性を負に制御する)
Journal of Bone and Mineral Metabolism 第 40 巻 第 4 号 561 頁～ 570 頁掲載 2022 年 4 月 15 日発行
論文審査委員 主査 教授 里 村 一 人
副査 教授 山 越 康 雄 副査 教授 二 藤 彰

内 容 の 要 旨

【序 文】

破骨細胞は骨吸収に必須の多核細胞であり、骨形成を担う骨芽細胞と共に骨リモデリングを行うことで骨の成長や量の維持を行っている。そのため、破骨細胞の異常な機能亢進が骨粗鬆症や骨パジェット病といった多くの骨量減少症の原因となっており、未だ不明な部分の多い破骨細胞の分化や運動制御メカニズムの解明が急がれている。

アクチン線維伸長を促進するアクチン結合タンパク質 Profilin1 (Pfn1) は多くの細胞種の遊走性を促進することが報告されているが、破骨細胞におけるその機能は明確にされていなかった。そこで我々は、破骨細胞特異的に Pfn1 を欠損するマウス (Pfn1-cKO マウス) を作出したところ、このマウスでは破骨細胞が通常ほとんど存在しない骨幹部に近い骨内膜部や頭蓋骨縫合部といった領域にまで多く分布し、生後 4 週から 8 週齢で長管骨の短縮、頭蓋骨の変形、大腿骨の三角フラスコ状 (エルレンマイヤー・フラスコ) 変形、頭蓋顔面骨の縫合部の離開傾向を伴う成長障害、頬骨弓の短縮変形といった特徴的な形態異常を伴った骨量減少症を呈することを見出した。更に、これらのマウスから得た骨髄細胞を用いて破骨細胞を分化誘導し、ライブイメージング解析で遊走能を解析したところ、分化途中の破骨細胞の遊走性が亢進していた。これらのことから、Pfn1 は破骨細胞の遊走性を負に制御することで正常な骨成長、骨量維持に重要な役割を果たしていることがわかった (白川, 梶川ら, JBMR Plus (2019))。しかしながら、Pfn1 がどのように破骨細胞の遊走性を制御しているかについては明らかに出来ていなかった。極めて興味深いことに、近年、骨パジェット病の患者で PFN1 変異が複数発見されている。骨パジェット病は破骨細胞の数や大きさの異常な増大により全身のもしくは限局的に骨吸収が亢進する骨疾患で、PFN1 変異を有する患者は通常より発症が早く、骨肉腫を併発するリスクがより高いということが報告され、破骨細胞における Pfn1 の役割が注目を集めている。

多くの細胞種で Pfn1 は細胞遊走性を正に制御する一方で、破骨細胞では負に制御する。この二面性を持つのは、直鎖状または分枝状アクチン線維の伸長が異なる機構で制御されること、そして、多くの細胞種と異なり、破骨細胞の運動が主に分枝状アクチン線維により構成される葉状仮足やポドソームにより行われること、と関係しうると考えられる。実際、Pfn1 は直鎖状アクチン線維形成を促進する一方で、分枝状アクチン線維形成を抑制することが近年示されている。従って、Pfn1 は分枝状アクチン線維形成の抑制を介して破骨細胞の葉状仮足やポドソームの形成を抑制し、その遊走性を抑えていると仮説を立てた。本研究では、この仮説を検証するため、野生型 (WT) および Pfn1-cKO マウスの骨髄細胞より破骨細胞を分化誘導し、その細胞構造の変化をライブイメージングで追跡した。更に、分枝状アクチン線維形成に必須因子 Arp2/3 の阻害剤を用いることで、WT および Pfn1-cKO 破骨細胞の遊走性がどのように変化するか検討した。

【方法および結果】

WT および Pfn1-cKO マウス由来骨髄細胞を培養し、M-CSF および RANKL を処理することで破骨細胞の分化誘導を行い、分化途中の破骨細胞（3-6 核）の細胞形態を静止画で観察した。当該破骨細胞の輪郭を弓状凹構造（カテゴリー I）に注目して、前方突出部（カテゴリー II）、後方突出部（カテゴリー III）に分類し、各カテゴリーの輪郭長を比較した。その結果、Pfn1-cKO 破骨細胞では WT と比較して、破骨細胞周囲長に対するカテゴリー II の長さの割合の増加が認められた。更に、個々の細胞が持つカテゴリー II の長さによって、破骨細胞を分類し、その数を比較したところ、Pfn1-cKO 破骨細胞では長い前方突出部を持つ細胞の割合が有意に増加していた。この違いが一時的ではないことを示す目的で、上記のカテゴリー分類を培養ライブイメージングにて解析を行った。すなわち、対象とした破骨細胞の細胞輪郭に 100 点のマーカーを設置し、経時的にそのマーカーの動きを追跡することで分類した輪郭の変化を解析した。その結果、カテゴリー II の長さの割合が WT 破骨細胞では経時的に低下する一方で、Pfn1-cKO 破骨細胞では高く保たれたままだった。更に、破骨細胞の遊走距離と周囲長に対するカテゴリー II の割合との相関性を検討すると、WT および Pfn1-cKO 破骨細胞のいずれにおいても正の相関性が認められた。これらのことから、Pfn1-cKO 破骨細胞では前方突出部の長さが全体的に増加しており、これに相関して遊走性も増大していると考えられた。測定した分化途上の破骨細胞のアクチン免疫染色を行ったところ、前方突出部にはしばしば分枝状アクチンで構成されるポドソームが存在しており、Pfn1-cKO 破骨細胞では分枝状アクチン形成が亢進し、前方突出部形成が増大したものと考えられたため、分枝状アクチン形成に必須因子である Arp2/3 を阻害することにより破骨細胞の遊走性が変化するかを検討した。培養破骨細胞に Arp2/3 阻害剤を加えると細胞遊走性は有意に抑制された。また、Pfn1 欠損により増加した遊走性も阻害剤により、WT 破骨細胞に阻害剤を加えた場合と同程度まで抑制された。このことから、Pfn1 は分枝状アクチン形成を負に制御することで破骨細胞の細胞構造形成とその遊走を制御していることがわかった。

【考 察】

我々は本解析により、Pfn1-cKO 破骨細胞の遊走性増大は分枝状アクチンより構成される細胞構造形成の亢進によるものであることを明らかにした。そのため、Pfn1-cKO マウスで認められる様々な骨変形や骨量減少を呈するという表現型は、Pfn1 による破骨細胞の分枝状アクチン形成抑制が外れることにより、その遊走性が亢進し、通常ほとんど存在しない骨領域にまで破骨細胞が多く分布してしまうことに起因すると考えられる。極めて重要なこととして、本研究では培養ライブイメージングを用いて、破骨細胞の細胞輪郭形態を追跡することで遊走性との関係を解析するという新たなアプローチを行っており、この手法は将来的に、破骨細胞に留まらず、細胞構造変化の意義を理解するための有用な情報を提示することが期待される。また、破骨細胞の遊走には分枝状アクチン形成が重要で、その阻害が遊走を抑制することを明らかにしており、骨粗鬆症や骨パジェット病といった破骨細胞の異常活性化を起因とする骨疾患に対する分枝状アクチン形成阻害薬の治療効果の可能性を提示した。実際、*in vitro* および *in vivo* において、Arp2/3 阻害剤が骨吸収を抑える効果を発揮する予備実験の結果を既に得ている。

本研究成果は、骨リモデリングでの Pfn1 による破骨細胞遊走制御メカニズムを明らかにし、さらに動的な細胞形態解析手法の有用性を示した。これらの知見は顎骨を含む骨の疾患治療薬の開発につながる可能性を示している。

審査の結果の要旨

骨の成長やリモデリングに重要な役割を演じている破骨細胞の分化や遊走制御メカニズムは未だ十分に解明されていない。細胞遊走に関与するアクチン線維伸長を促進するアクチン結合タンパク質 Profilin1 (Pfn1) を破骨細胞特異的に欠損するマウス (Pfn1-cKO マウス) においては、破骨細胞が骨幹部や頭蓋骨縫合部を含む広範囲に分布し、長管骨短縮、頭蓋骨変形、大腿骨変形などの形態異常を伴う骨量減少症を呈すること、さらには破骨細胞の遊走性が亢進していることが確かめられている。これを踏まえ本研究では、「Pfn1 が分枝状アクチン線維形成の抑制を介して破骨細胞の葉状仮足やポドソームの形成を抑制し、その遊走性を抑えている。」との仮説を立て、野生型 (WT) および Pfn1-cKO マウスの骨髄細胞より分化誘導した破骨細胞の輪郭構造変化と遊走性を詳細に検討した。破骨細胞の周囲構造を弓状凹構造、前方突出部、後方突出部に分類し、それぞれの輪郭長を比較した結果、Pfn1-cKO 破骨細胞では破骨細胞周囲長に占める前方突出部の割合と長い前方突出部を持つ細胞の割合が増加していることが確かめられた。また培養ライブイメージングを用いた観察により、破骨細胞の遊走距離と前方突出部の割合との間に正の相関性があること、アクチンに対する免疫染色により前方突出部の細胞質内に多くのポドソームが形成されていることが明らかとなった。さらに分枝状アクチン線維形成に必須の分子である Arp2/3 を阻害

博 士 学 位 論 文

したところ、破骨細胞の遊走性が有意に抑制されることが確かめられた。

これらの研究結果は、Pfn1-cKO マウスで認められる様々な骨変形や骨量減少という表現型が、Pfn1 の機能抑制による分枝状アクチンの形成亢進を背景とした破骨細胞の遊走性増大によるものであることを示しており、Pfn1 が分枝状アクチン形成を負に制御することにより破骨細胞の細胞構造形成とその遊走を制御していることが確かめられた。

本研究により、破骨細胞の遊走には分枝状アクチン形成が重要で、その阻害により遊走を抑制することが可能であることが確かめられ、骨粗鬆症や骨パジェット病などの破骨細胞の異常活性化を原因とする骨疾患に対する分枝状アクチン形成阻害薬の開発の可能性を示すものと考えられた。

よって、本研究は博士（歯学）の学位を請求するにあたり、十分な価値を有するものと判定した。