

菅原（嶋田）めぐみ 論文内容の要旨

主 論 文

(Rab27A Regulates Transport of Cell Surface Receptors Modulating Multinucleation and Lysosome-Related Organelles in Osteoclasts)

(Rab27A は破骨細胞での多核化を調節する細胞表面受容体とリソソーム関連オルガネラの輸送を制御する)

(菅原（嶋田）めぐみ、坂井詠子、岡元邦彰、福田光則、泉哲郎、吉田教明、筑波隆幸)

Scientific Reports 2015 年 印刷中
[ページ数]

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻
(主任指導教員：吉田 教明 教授)

緒 言

リソソーム関連オルガネラ (LROs) は、リソソームの性質を保持しながらも、細胞特異的な機能を担うようになった特殊なオルガネラである。LROs を形成する細胞の 1 つである破骨細胞は、LROs を骨表面に形成することで骨の分解に関与する。しかしながら、破骨細胞における LROs 形成の詳細なメカニズムは明らかになっていない。

Rab27A は small GTPases の Rab ファミリーに属しており、小胞体形成・輸送や細胞膜融合を調節する。ヒトにおいて、Rab27A 変異は Griselli 症候群と呼ばれる疾患を呈し、皮膚などの色素脱失、免疫機能不全を惹起する。これらの機能異常は主として皮膚細胞や免疫担当細胞の LROs の輸送異常に起因することから、Rab27A は LROs の形成や輸送に関与していると考えられている。

本研究では、マクロファージから破骨細胞への分化過程において、mRNA レベルが発現上昇する遺伝子の 1 つとして Rab27A を同定し、破骨細胞における LROs 形成とその他の機能に関する解析を行った。

材料と方法

野生型マウスとして C3H/He マウス、Rab27A 遺伝子変異マウスとして *Ashen* マウス (C3H/He 系統) を用いた。培養細胞として、破骨細胞前駆細胞であるマウス由来骨髓細胞、RAW-D 細胞 (マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞のサブクローン) を用い

た。DNA マイクロアレーはアジレント社製を用いた。

解析方法として、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ（TRAP）染色法、定量性 real-time PCR 解析、共焦点レーザー蛍光顕微鏡解析、Western blot 解析、FACS 解析を行った。また遺伝子ノックダウン実験では、低分子干渉 RNA（siRNA）法、骨吸収能活性については Osteo Assay Plate を用いて解析した。

結 果

まず DNA マイクロアレー解析を行い、破骨細胞分化過程で発現レベルが上昇する遺伝子として Rab27A 遺伝子を同定した。マクロファージでは Rab27A はリソソームに局在した。RANKL 刺激して破骨細胞分化を誘導すると、Rab27A をノックダウンした RAW-D 細胞ではコントロールに比べ、細胞の多核化と巨大化を示した。同様に、Rab27A 遺伝子変異を持つ *Ashen* マウス由来のマクロファージを RANKL および M-CSF で刺激を行い培養すると、多核化と巨大化が観察された。破骨細胞のマーカー遺伝子の発現レベルを比較すると、野生型に比べて *Ashen* 破骨細胞では種々の破骨細胞マーカー遺伝子の発現レベルが有意に上昇していた。

Ashen 破骨細胞が多核化と巨大化される分子メカニズムとして、同細胞では受容体の輸送異常とその下流シグナルの増強が観察された。*Ashen* 破骨細胞では、M-CSF と RANKL 刺激に対して、Erk、p38、Akt のリン酸化レベルが上昇した。さらに、FACS 解析により、M-CSF の受容体である c-fms の細胞膜の発現レベルが *Ashen* 破骨細胞では高くなることが分かった。また RANKL の受容体である RANK は受容体のダウンレギュレーションが異常になっており、細胞内に長く留まっていた。これらの結果は、Rab27A 欠損により受容体の輸送異常とその受容体のシグナルが増強している事を示唆している。

一方 *Ashen* 破骨細胞では、細胞内で形成される LR0s の輸送が異常になっていた。野生型と *Ashen* 破骨細胞を比較すると、*Ashen* 破骨細胞では、骨吸収に重要な actin ring の形成が異常になっており、リソソームタンパク質である LAMP 2、あるいはカテプシン K の局在が異常になっていた。また *ashen* 破骨細胞では、種々のリソソームタンパク質の量が異常になっていることや、骨吸収能が有意に低下していることが分かった。

考 察

マクロファージから破骨細胞への分化過程で、発現レベルが上昇する遺伝子の 1 つとして Rab27A を同定した。Rab27A 欠損した破骨細胞は、多核化と巨大化を呈し、細胞表面受容体の輸送異常と LR0s 輸送異常を呈した。

多核化と巨大化の原因として、Rab27A 欠損破骨細胞では、c-fms の細胞表面での異常な発現増加および RANK のダウンレギュレーションの異常により、Erk、p38、Akt のシグナルが増強したことが考えられる。また LR0s への輸送異常により、actin ring の形成異常を引き起こし、同時に顕著な骨吸収低下を起こしていることが示唆された。

以上の結果から、Rab27A は破骨細胞での多核化を調節する細胞表面受容体と LR0s の輸送を制御することが示された。