The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	マクロファージ/破骨細胞系にみられるRab32/38陽性オルガネラの解析
Author(s)	野田, 和也
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61644
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　野田　和也　　）	
論文題名	マクロファージ/破骨細胞系にみられるRab32/38陽性オルガネラの解析

論文内容の要旨

【研究目的】

生体における骨の恒常性は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスにより維持され、そのバランスの破綻は様々な重大な疾患へと繋がることが知られている。例えば、破骨細胞の形成異常や機能障害により骨量が増加する疾患である大理石骨病や、逆に破骨細胞の機能亢進により骨量が減少する骨粗鬆症があげられる。さらに歯科の領域においても、重度歯周病において炎症に惹起された破骨細胞の活動による歯槽骨吸収があげられる。これらの疾患の病因論の理解及びその克服へのアプローチとして破骨細胞の機能について理解を深めることが重要であると考えられる。

破骨細胞は、血球幹細胞由来のマクロファージが分裂、融合を繰り返し分化した多核巨細胞である。マクロファージは、死んだ細胞や細菌、ウィルスなどを取り込み分解する貪食細胞として知られ、免疫系において重要な役割を担っている。成熟した破骨細胞は、骨表面に結合し吸収窩と呼ばれる領域を形成し、酸やプロテアーゼを分泌することにより骨吸収を行う。これら破骨細胞分化及び骨吸収の過程で、オルガネラのダイナミックな移動、及びプロテアーゼを含んだ小胞の輸送、分泌すなわちメンブレントラフィックが関与していることが想定される。さらに、マクロファージにおいて細胞外部からファゴサイトーシスにより取り込まれたものは、エドサイトーシス経路を経てリソソームへ輸送される。以上の点からマクロファージ/破骨細胞系においてメンブレントラフィックが必要不可欠であると想像されるが、その機構に関しての知見は乏しい。

Rabタンパク質は約60種類のファミリーを形成し、活性化型のGTP結合型と不活性化型のGDP結合型をサイクルすることで分子スイッチとして機能している。活性化型の時にエフェクタータンパク質と結合し、メンブレントラフィックやオルガネラの生合成、細胞接着など様々な機能発現をする。破骨細胞におけるRabタンパク質の発現、機能の解明はほとんどなされていないのが現状である。そこで本研究では、Rabタンパク質に注目することで、メンブレントラフィックという観点からマクロファージ及び破骨細胞の特徴を明らかにすることを目的とした。

【材料及び方法】

8週齢野生型雄性C57BL/6マウスの骨髄細胞を採取し、MCSF（Macrophage colony-stimulating factor）及びRANKL（Receptor activator of NF-κB ligand）刺激を行うことにより、マクロファージさらには破骨細胞へ分化誘導を行った。全55種のGFP-Rabをマクロファージと破骨細胞に遺伝子導入し、蛍光顕微鏡を用いて局在性の観察を行った。また、マクロファージ及びRANKL刺激6日目の細胞のmRNAを回収し、DNAマイクロアレイ法にて遺伝子発現の比較を行った。スクリーニングの結果から注目したRabタンパク質に対して、各種抗体を用いた免疫抗体染色法によりその局在性の検討を行った。内在性のRabタンパク質の発現をウェスタンブロット法により確認し、蛍光顕微鏡にて局在を観察した。培地中に蛍光ビーズを加えファゴサイトーシスにより取り込ませ、既知のエンドサイトーシス経路との関連性を解析した。さらに骨吸収の際、吸収窩に放出されるプロテアーゼであるカテプシンKの局在性を観察した。Rabタンパク質が局在するオルガネラの構造をCLEM（光-電子相関顕微鏡法）にて解析した。

【結果】

GFP-Rabの網羅的局在解析の結果から、GFP-Rab7、GFP-Rab9A、GFP-Rab32、GFP-Rab38等が吸収窩に相当するアクチンリング内に集積する様子が観察された。DNAマイクロアレイ法の結果から、破骨細胞で多くのRabタンパク質が発現していたが中でもRab38が極めて高い発現上昇率を示し、破骨細胞での発現量も大きな値を示した。他には、Rab1、Rab7、Rab14、Rab32等が高い発現量を示した。以上のスクリーニングの結果から、Rab38とその機能的

ホモログとされるRab32（以下Rab32/38と略す）に着目した。

Rab32/38のタンパク質発現及び局在性をそれぞれの特異抗体を用い検討を行った結果、内在性Rab32はRANKL刺激の有無に関わらず発現し、単核細胞、多核細胞ともに点状及びリング状構造を示した。一方、内在性Rab38はRANKL刺激により発現が誘導され、多核細胞で点状、リング状構造が観察された。Rab32/38と様々なオルガネラとの局在性の検討を行った。まず、GFP-Rab32/38は一部ゴルジ体マーカーと共局在を示した。さらにRab32のGTP結合型である恒常的活性化型変異体GFP-Rab32QLは、ややゴルジ体局在が減弱したものの、野生型同様の点状及びリング状構造の局在を示した。一方で、Rab32のGDP結合型である恒常的不活性化型変異体GFP-Rab32TNは点状及びリング状構造が消滅し、核近傍のゴルジ体局在のみ示した。

マクロファージにおいて、Rab32はリソソームマーカーであるLAMP1、LAMP2さらにはRab7と一部共局在を示したものの、多くは共局在を示さなかった。また、蛍光ビーズを培地中に添加し、ファゴサイトーシスで細胞中に取り込ませると、時間経過と共にリソソームのマーカーであるRab7、LAMP1陽性オルガネラに含まれる割合が増加した。一方、Rab32陽性オルガネラに局在するビーズの割合は3時間まで増加するが、その後減少する傾向を示し、最終的に20%以下となった。

破骨細胞において、Rab32/38はRab7と一部のみ共局在を示し、LAMP1とも共局在を示した。RANKL刺激開始時に蛍光ビーズを添加したのちに、破骨細胞へ分化誘導を行うと、一部の蛍光ビーズがGFP−Rab32/38陽性オルガネラ内部への局在を示したものの、大多数のサイズの大きいGFP-Rab32/38陽性オルガネラは蛍光ビーズと共局在しなかった。さらに、吸収の際、吸収窩に放出されるプロテアーゼであるカテプシンKの局在性を検討した結果、RANKL刺激後の単核細胞では、多くがGFP-Rab32/38陽性オルガネラ内部に局在を認めたが、多核の破骨細胞においては大部分のGFP-Rab32/38陽性オルガネラ内部には局在を認めなかった。これは、カテプシンBも同様であった。

マクロファージにおいてRab32陽性オルガネラ構造の内部に、初期エンドソームのマーカーStr-Rab5A、後期エンドソームのマーカーStr-Rab7及びミトコンドリアマーカーのTOM20が内包される様子が観察された。CLEM観察により、実際GFP-Rab32陽性膜構造の内部に、別のオルガネラが取り込まれ、さらに破骨細胞分化後ではその内部が空疎になり構造物の残骸を認めた。V-ATPase阻害剤であるBafilomycin A1を添加しオルガネラの酸性化を阻害すると、GFP-Rab32のリング構造が増加し、その内部には分解されず膜構造を維持したオルガネラや小胞がさらに増加した。

【結論及び考察】

マクロファージにおいては、Rab32が主に発現することで機能し、破骨細胞においては、Rab32とRab38が機能していると考えられる。特にRab38はRANKL刺激後6日目まで発現上昇し、より後期に重要である可能性がある。さらに分化の進行初期と考えられる単核細胞ではRab32/38陽性オルガネラ中にカテプシンKやカテプシンB、TRAPが局在するが、より分化の進んだ多核の破骨細胞ではカテプシンK及びカテプシンBは局在しないことから分化が進むことで既知のリソソームとは相異なる分泌型小胞としてより特徴的な機能発現をすることが考えられた。Rab32/38は、例えば色素細胞ではメラニン色素を蓄積するメラノソームというオルガネラの成熟に機能し、これら特殊なオルガネラはLysosome related organelle（以下LRO）と総称される。今回観察されたRab32/38陽性オルガネラの特にリング状のものは、マクロファージ/破骨細胞系における新規のLROである可能性が示唆された。Rab32/38はゴルジ体から輸送されRab32/38陽性オルガネラを形成し、破骨細胞では波状縁へ輸送されている可能性が示唆された。さらに、Rab32/38陽性オルガネラは、エンドソーム系オルガネラやミトコンドリアをも内包し内部では分解を行っていたことから、特殊なオートファジーであるミクロオートファジーを行っている可能性が示唆された。その役割としては、貪食細胞であるマクロファージは、エンドサイトーシスにより細胞内に膜構造が増大することを防ぐためにミクロオートファジーにより膜構造ごと取り込み分解を行い、膜量の恒常性の維持に働いている可能性が考えられる。また、破骨細胞では細胞中の不良オルガネラの分解に働いている可能性に加え、同時に波状縁の形成に寄与している可能性もある。しかしながら、哺乳類細胞におけるミクロオートファジーの知見はきわめて乏しく、その現象についてはほぼ未解明と言える。今後は、今回見出したマクロファージ/破骨細胞系における全く新規のLROの可能性が考えられるRab32/38陽性オルガネラの機能の更なる解明、さらにはミクロオートファジー現象の関わりについての解明が必要である。それにより、ミクロオートファジー現象そのものの解明、さらには骨代謝が関与する様々な疾患治療の新しいアプローチへとつながることが期待される。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　野田和也　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	野田　健司
	副 査	教授	豊澤　悟
	副 査	准教授	野村　良太
	副 査	講師	村上　智彦

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯周病の進展に中心的な関与をする破骨細胞の機能をメンブレントラフィックの観点から理解することを試みたものである。

メンブレントラフィックの制御因子である Rab ファミリーはヒトではおよそ６０種存在するが、その多くのものの実際の機能は未解明である。今回マウス骨髄由来マクロファージに、GFP を付加した Rab 遺伝子を網羅的に発現させ、破骨細胞へ分化誘導させることで特徴的な局在パターンを示す Rab を探索した。同時に破骨細胞分化前後で発現量が変動する Rab をマイクロアレイ法により探索した。その結果、Rab38 が破骨細胞分化後にその発現量が上昇し、かつ破骨細胞に特徴的な吸収窩に局在したことより、その機能の解析をすすめた。

Rab38 及びそのパラログとされる Rab32 はともに既存のオルガネラとはことなる膜オルガネラに局在した。それら Rab32/38 陽性オルガネラはエンドサイトーシス経由で細胞外の物質を取り込む能力があり、また酸性化していることが示された。破骨細胞形成後の吸収窩に輸送される酵素群 TRAP や Cathepsin K が一時的に Rab32/38 陽性オルガネラ内部に局在することも示された。さらに Rab32/38 陽性オルガネラの内部には、初期エンドソーム、後期エンドソーム、ミトコンドリアが取り込まれていることが明らかとなった。このことは Rab32/38 陽性オルガネラがミクロオートファジー現象によって、これらのオルガネラを取り込んでいることを示唆するものである。以上のことから、Rab32/38 陽性オルガネラは、他のオルガネラを吸収分解することおよび、吸収窩の形成に関わることで、破骨細胞の機能発現に貢献している可能性が提唱された。これらの研究成果は、破骨細胞機能発現における新たな機序を示唆するものであり、歯周病を始めとする骨代謝関連疾患の病因論の理解へ向け重要な知見を与えるものである。よって博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。