

# 論文内容要旨

## 論文題目

破骨細胞におけるジアシルグリセロールキナーゼの機能解析

責任講座： 整形外科学 講座

氏 名： 岩崎 聖

## 【内容要旨】 (1,200 字以内)

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はイノシトールリン脂質代謝系の細胞内シグナル伝達機構において、セカンドメッセンジャーであるジアシルグリセロール (DG) をホスファチジン酸 (PA) に変換する酵素である。DGK は主として神経組織に豊富に発現する分子であり、これまで脳内での発現局在や機能解析についての報告はあるが、それ以外の生体臓器での機能は未だ不明な部分が多い。近年、DGK の免疫組織における機能が注目されており、本研究では免疫細胞に属する破骨細胞における DGK の役割を検討することを目的とした。

実験動物として野生型 C57BL/6 マウスと DGK $\zeta$ -KO マウスを、また破骨細胞培養系としてマクロファージ株化細胞である RAW264.7 細胞とマウス骨髄から採取したマクロファージを用いた。破骨細胞分化因子である RANKL (Receptor Activator of NF $\kappa$ B Ligand) は大腸菌発現のリコンビナント蛋白を精製して使用した。DGK アイソザイムの発現は RT-PCR 法およびウェスタンブロット法を用いて検討した。破骨細胞機能の評価として、培養細胞系での Pit formation アッセイ、個体レベルでは大腿骨骨密度測定および頭蓋骨 Osteolysis モデル実験を行った。

骨髄マクロファージと破骨細胞には DGK $\zeta$  と DGK $\delta$  の mRNA 発現が認められた。しかし、分化した破骨細胞において DGK $\zeta$  の発現は蛋白レベルにおいて著明に減少していた。破骨細胞への分化実験では、DGK $\zeta$ -KO マウス由来の骨髄マクロファージは野生型マウス由来のものに比べて分化速度に著明な差を示さなかったが、最終的な破骨細胞量が増加した。Pit formation アッセイでは、DGK $\zeta$ -KO 細胞群において野生型と比較し、より活発な骨吸収が認められた。個体レベルにおいては、DGK $\zeta$ -KO マウスでは骨密度が低く、Osteolysis モデルでも増大した骨吸収が観察された。以上より、DGK $\zeta$  は破骨細胞機能に抑制的に作用すること、そしてその結果 DGK $\zeta$ -KO マウスでは骨形成よりも骨吸収機能が亢進している可能性が示唆された。

平成 23 年 1 月 5 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

## 学位論文審査結果報告書

申請者氏名：岩崎 聖

論文題目：破骨細胞におけるジアシルグリセロールキナーゼの機能解析

審査委員：主審査委員

副審査委員

副審査委員

本郷 誠治 (本郷)  
青柳 俊 (青柳)  
飯野 光喜 (飯野)

審査終了日：平成 23 年 1 月 5 日

### 【 論文審査結果要旨 】

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はイノシトールリン脂質代謝系の細胞内シグナル伝達機構において、セカンドメッセンジャーであるジアシルグリセロール (DG) をホスファチジン酸 (PA) に変換する酵素である。DGK は主として神経組織に豊富に発現する分子であり、これまで脳内での発現局在や機能解析についての報告はあるが、それ以外の生体臓器での機能は未だ不明な部分が多い。近年、DGK の免疫組織における機能が注目されており、本研究では免疫細胞に属する破骨細胞における DGK の役割を検討することを目的とした。

実験動物として野生型 C57BL/6 マウスと DGK $\zeta$ -KO マウスを、また破骨細胞培養系としてマクロファージ株化細胞である RAW264.7 細胞とマウス骨髄から採取したマクロファージを用いた。破骨細胞分化因子である RANKL (Receptor Activator of NF $\kappa$ B Ligand) は大腸菌発現のリコンビナント蛋白を精製して使用した。DGK アイソザイムの発現は RT-PCR 法およびウェスタンブロット法を用いて検討した。破骨細胞機能の評価として、培養細胞系での Pit formation アッセイ、個体レベルでは大腿骨骨密度測定および頭蓋骨 Osteolysis モデル実験を行った。

骨髄マクロファージと破骨細胞には DGK $\zeta$ と DGK $\delta$ の mRNA 発現が認められた。しかし、分化した破骨細胞において発現する DGK $\zeta$ 蛋白のサイズは減少していた。破骨細胞への分化実験では、DGK $\zeta$ -KO マウス由来の骨髄マクロファージは野生型マウス由来のものに比べて分化速度に著明な差を示さなかったが、最終的な破骨細胞の面積が増加した。Pit formation アッセイでは、DGK $\zeta$ -KO 細胞群では野生型よりも活発な骨吸収が認められた。個体レベルにおいては、DGK $\zeta$ -KO マウスでは野生型よりも骨密度が低く、osteolysis モデルでも増大した骨吸収が観察された。したがって DGK $\zeta$ -KO マウスでは骨形成よりも骨吸収機能が亢進していることが示唆され、新たな骨粗鬆症モデルになることが明らかになった。以上の成績から、DGK $\zeta$ は破骨細胞への分化において抑制因子として機能することが示唆された。

上記の研究成果より本審査委員会では、本研究者が博士(医学)を受けるに値すると判断した。