

## 博士論文（要約）

論文題目 骨代謝回転におけるRANKL逆シグナルの機能解析

氏 名 林 円香

## 【序論】

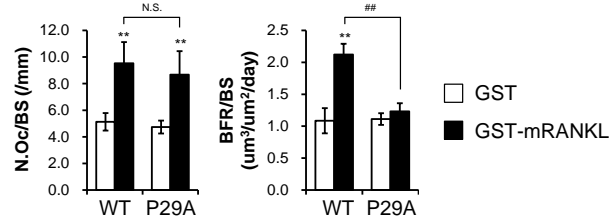
生体内の骨組織では老朽化した部位が破骨細胞によって吸収除去され、引き続いて骨芽細胞による新生骨形成が生じて埋め戻される、という一連のサイクルが繰り返されており、これによって骨量・骨質が一定に維持されている。骨吸収過程から骨形成過程への移行が円滑に進行するためには、両者を繋ぐ何らかのカップリング機構が必要であると想定されており、従来は骨基質中に含まれる IGF-1、TGF- $\beta$  等のサイトカインが骨吸収に応じて溶出し、骨芽細胞活性化を引き起こすとする仮説が提唱されてきた。しかしながら近年の研究の進展に伴い、Cthrc1、S1P、Wnt10b など様々な分子が破骨細胞より分泌され、骨芽細胞の分化・活性化を制御していることが示唆されており、カップリングは従来想定されていたよりも遥かに複雑で、時空間的に精密に制御された分子機構によって媒介されていることが明らかになりつつある。また、骨粗鬆症治療の第一選択として用いられる骨吸収抑制剤は、破骨細胞由来のカップリング因子の枯渇によって骨形成にも強い抑制が生じ、これが非定型大腿骨骨折頻度の上昇や顎骨壊死など、臨床上的問題に繋がることが指摘されている。従って、カップリングを媒介する分子機構の解析は、生理的な骨代謝回転維持機構の理解という点に加え、新規骨粗鬆症治療標的の探索の点でも重要である。破骨細胞の成熟・活性化を中心的に制御するシグナル入力分子である RANKL は、骨組織では骨芽細胞系譜の細胞群に発現が認められるが、近年の研究から、生体内の破骨細胞成熟過程において主要な RANKL 供給源となっているのは、骨細胞であることが明らかになってきた。その結果、骨芽細胞に発現する RANKL の生理的な役割が不明確となっていたが、当研究室の過去の検討より、骨芽細胞表面上の RANKL はシグナル入力分子としてではなく、むしろシグナル受容分子として機能する可能性が示されたとともに、破骨細胞はその成熟過程において RANK を含む膜小胞 (膜小胞型 RANK) を分泌し、骨芽細胞上の RANKL にシグナルを入力することにより骨芽細胞の分化を促進することが見出された。さらに、骨芽細胞内においては、PI3K-Akt-mTORC1 経路の活性化を介して骨芽細胞分化制御因子である Runx2 の核内移行を促進されること (RANKL 逆シグナル) が示された。一連の解析結果は、膜小胞型 RANK が媒介する RANKL 逆シグナルが生体レベルで骨吸収と骨形成のカップリングに寄与している可能性を示唆すると考えられ、この仮説を *in vivo* レベルで解析した。

## 【結果】

### 1. RANKL 逆シグナルは生体レベルで骨吸収と骨形成のカップリングに寄与している

過去の検討から、RANKL 分子の細胞内領域に含まれるプロリンリッチモチーフ (PRM) に対して Src family kinases (SFKs) が相互作用することが、RANKL 逆シグナルの入力起点となる可能性が示唆されており、PRM に Pro29Ala 点変異を導入したノックインマウス (P29A 変異マウス) 由来の骨芽細胞においては、野生型同腹仔由来の骨芽細胞と比較して、RANKL 逆シグナルの受容能が減弱していることも確認されている。そこで、P29A ホモ変異マウスに対して外部から RANKL 組換えタンパク質を投与することで成熟破骨細胞の形成を誘導し、これにカップリングして生じる骨形成への影響を評価する手法を用いて、RANKL 逆シグナルのカップリングへの寄与を

検証することとした。P29A ホモ変異マウスおよび同腹仔の野生型マウスに対し、GST 融合型マウス RANKL 細胞外ドメイン組換タンパク質 (GST-mRANKL) を 3 日間連続腹腔内投与することで、成熟破骨細胞の形成を強力に誘導した。その後、石灰化前線を標識するため 5 日間隔でデメクロサイクリンおよびカルセインの二重投与を行った。カルセイン投与の 2 日後に大腿骨を摘出し、非脱灰凍結薄切標本を作成して骨形態計測による評価を行なった。成熟破骨細胞に特異的な酵素である酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) に対する基質を用いて骨組織切片を染色することで、骨表面あたりの破骨細胞数を計測した。また、骨表面に対する標識面の割合、および二重の蛍光標識間の間隔を計測することにより、骨形成速度 (Bone Formation Rate, BFR) を算出した。その結果、P29A ホモ変異マウスにおいては、野生型同腹仔と同程度に破骨細胞形成の誘導が認められた一方、それに伴って生じる骨形成速度の上昇が抑制されており、RANKL 逆シグナルが骨吸収と骨形成のカップリングに寄与している可能性が示唆された (Fig 1)。



**Fig. 1 P29A ホモ変異マウスでは骨吸収と骨形成のカップリングが抑制されている**

( $n = 5$ , mean  $\pm$  SD, \*\*  $p < 0.01$  vs GST,

N.S. not significant,

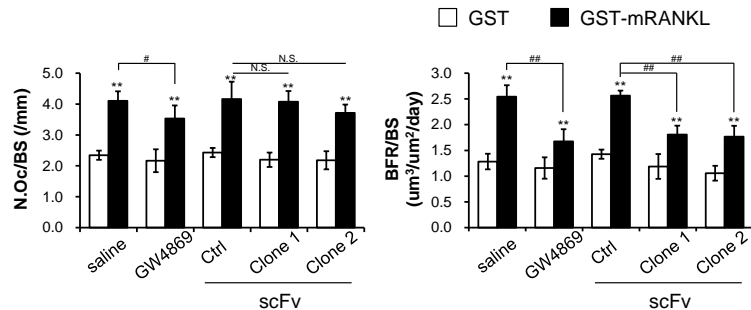
##  $p < 0.01$  vs WT (GST-mRANKL))

成して骨形態計測による評価を行なった。成熟破骨細胞に特異的な酵素である酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) に対する基質を用いて骨組織切片を染色することで、骨表面あたりの破骨細胞数を計測した。また、骨表面に対する標識面の割合、および二重の蛍光標識間の間隔を計測することにより、骨形成速度 (Bone Formation Rate, BFR) を算出した。その結果、P29A ホモ変異マウスにおいては、野生型同腹仔と同程度に破骨細胞形成の誘導が認められた一方、それに伴って生じる骨形成速度の上昇が抑制されており、RANKL 逆シグナルが骨吸収と骨形成のカップリングに寄与している可能性が示唆された (Fig 1)。

## 2. 膜小胞型 RANK は RANKL 逆シグナルの生理的なりガンドとして機能している

次に、膜小胞型 RANK が RANKL 逆シグナルに対する生理的なりガンドとして機能しているのかを検証するため、生体内で破骨細胞からの膜小胞の分泌を阻害、あるいは膜小胞の機能を中和した際の影響を検討した。膜小胞の分泌を阻害するためには、過去の報告に基づき、膜小胞分泌に関与するセラミド産生酵素 nSMase 阻害剤である GW4869 を使用した。また、膜小胞表面に結合し、立体障害によって骨芽細胞 RANKL に対する結合を抑制できる抗体フラグメントを取得するため、膜小胞のショットガン・プロテオミクス解析を行い、成熟破骨細胞の形成・機能に関与せず、かつ膜小胞表面に多く存在する分

子を探した結果、IGSF8 が標的として最適と考えられた。単鎖化抗体 (scFv) ライブラリーのスクリーニングを行って、IGSF8 の細胞外ドメインに高親和性を示す scFv クローンを取得し、scFv の C 末端にイノイシンジッパーを付加して三量体化した scFv 組換タンパク質を取得した。野



**Fig. 2 膜小胞型 RANK の作用を抑制することによりカップリングが抑制される**

( $n = 4$ , mean  $\pm$  SD, \*\*  $p < 0.01$  vs GST, N.S. not significant,

#  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  vs saline/Ctrl (GST-mRANKL))

生型マウスに GST-mRANKL を投与する前後も含めた 5 日間、GW4869 あるいは抗 IGSF8 scFv 三量体を 12 時間ごとに投与し、上述と同様に骨形態計測を行った。その結果、膜小胞の作用を抑制した群では、対照群と比較して、成熟破骨細胞形成の誘導は同程度であった一方、骨形成速度の上昇は有意に抑制されており、生理的にも膜小胞型 RANK が RANKL 逆シグナルのリガンドとして機能していることが示唆された (Fig. 2)。

### 3. 生体内における RANKL 逆シグナルの活性化は骨形成に促進的に作用する

次に、RANKL 逆シグナル新規創薬標的としての可能性を検証することとした。RANKL 逆シグナルは、RANKL 分子が骨芽細胞上で架橋されることがトリガーとなることが示されていたため、RANKL の細胞外ドメインに結合する scFv を二量体化してシグナル入力担体として用いた。まず、Fig. 3A のように、*in vitro* において、骨芽細胞に対する RANKL 逆シグナル入力活性が認められた IH9 scFv 二量体を 1 日 2 回 12 時間おきに 10 日間皮下投与し、投与開始 10 日目、15 日目、20 日目に蛍光標識剤を投与した後、大腿骨を摘出して骨形成パラメーターを評価した。その結果、15-20 日目において、scFv 二量体投与群において、骨形成速度がコントロール群と比較して有意に上昇し、RANKL 逆シグナルが *in vivo* においても骨形成促進作用を有することが示された (Fig. 3B)。

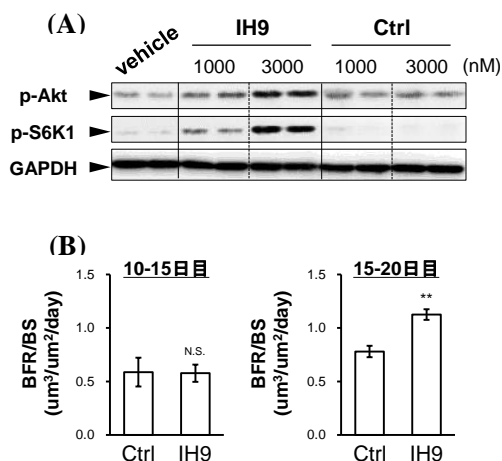


Fig. 3 IH9 scFv 二量体は生体内で骨形成を促進する作用を有する

(A) *In vitro* における RANKL 逆シグナル入力活性 (B) IH9 scFv 二量体投与後 10-15 日目、15-20 日目の骨形成速度 ( $n = 4$ , mean  $\pm$  SD,

\*\*  $p < 0.01$  vs GST, N.S. not significant,

#  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.01$  vs saline/Ctrl (GST-mRANKL))

### 4. RANKL 逆シグナル入力活性を併せ持つ骨吸収抑制剤は、カップリング因子の枯渇に伴う骨形成の低下を軽減できる

scFv 二量体は血中滞留性が低く、有効濃度が短期間しか達成できなかったため、一定レベルの血中滞留性を達成するため、IgG 抗体 Fc 領域との融合タンパク質として新規バイオロジクスの設計を行った。さらに、強い RANKL 逆シグナル入力活性を付与するため、Fig. 4 のように、scFv をタンデムに連結し、分子全体で 4 価の RANKL 結合部位を有する分子設計を採用した。

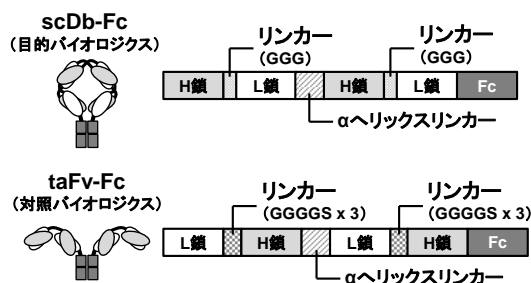
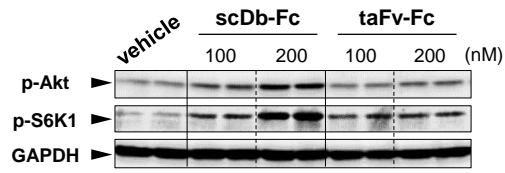


Fig. 4 各バイオロジクスの構造

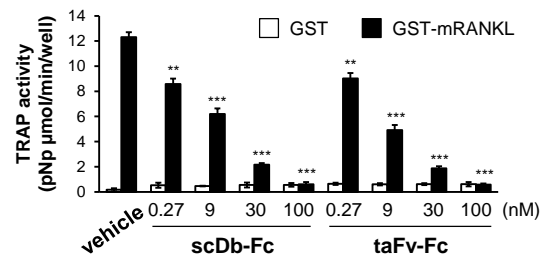
scFv 間を繋ぐリンカー部位のアミノ酸配列、scFv 内で H 鎖と L 鎖を繋ぐリンカー部位のアミノ酸配列、また scFv 内での H 鎖と L 鎖の配置順をそれぞれ変えたコンストラクトを複数作製し、293FT 細

胞を宿主細胞として組換タンパク質の調製を行った。得られた組換タンパク質をマウス骨芽細胞モデルである ST2 細胞の培養系に対して添加し、一定時間後に細胞を回収・可溶化してイムノブロットを行って RANKL 逆シグナルの活性化を評価し、最もシグナル入力活性が高かったコンストラクト (scDb-Fc) を以降の検討に用いた。また、骨吸収抑制条件における RANKL 逆シグナル活性化の影響を定量的に評価するためには、破骨細胞に対するシグナル活性を示す一方、骨芽細胞に対する RANKL 逆シグナル入力活性は示さないバイオリジクスを投与した場合と比較して検証を進める必要があると考えられたため、RANKL 逆シグナルへの影響が最も少ないコンストラクト (taFv-Fc) を対照として選択した (Fig. 5)。次いで、マウス破骨前駆細胞モデルである Raw264.7 細胞を M-CSF および GST-mRANKL 存在下で培養する系に対して、



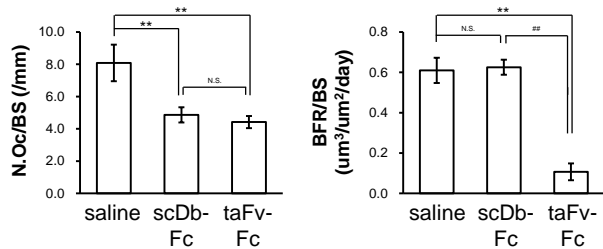
**Fig. 5** scDb-Fc は低濃度から RANKL 逆シグナルを活性化するのに対し、taFv-Fc はシグナル入力活性をほとんど示さない

各バイオリジクスを添加し、特異的なマーカー酵素である TRAP 活性を指標に成熟破骨細胞の形成を評価した結果、いずれに関しても濃度依存的に成熟破骨細胞の形成を阻害し、阻害効率はほぼ同程度であった (Fig. 6)。そこで、これらのバイオリジクスを生体に投与した際に、骨代謝にどのような影響が生じるかを比較検証することとした。野生型の無処置、あるいは閉経後骨粗鬆症モデルである卵巣摘出マウスに対して、2 つのバイオリジクス間で血中濃度が同程度になるよう投与量を調節した上で単回静脈内投与し、先述と同様の手法で骨形態計測を行った。その結果、いずれのバイオリジクスを投与した群においても、成熟破骨細胞数の抑制効果は同程度であった。また、taFv-Fc 投与群においては骨形成速度の大幅な低下が認められ、成熟破骨細胞形成の抑制に伴うカップリング因子の供給低下に起因する骨芽細胞の活性減弱が生じているものと考えられた。一方、scDb-Fc 投与群においては骨形成速度の大きな低下は認められず、成熟破骨細胞形成が抑制されているにもかかわらず骨芽細胞の活性が維持されていることが示唆された (Fig. 7)。



**Fig. 6** scDb-Fc と taFv-Fc は同程度の成熟破骨細胞形成抑制活性を有する  
( $n = 3$ , mean  $\pm$  SD, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs vehicle (GST-mRANKL))

また、taFv-Fc 投与群においては骨形成速度の大幅な低下が認められ、成熟破骨細胞形成の抑制に伴うカップリング因子の供給低下に起因する骨芽細胞の活性減弱が生じているものと考えられた。一方、scDb-Fc 投与群においては骨形成速度の大きな低下は認められず、成熟破骨細胞形成が抑制されているにもかかわらず骨芽細胞の活性が維持されていることが示唆された (Fig. 7)。



**Fig. 7** scDb-Fc 投与群では破骨細胞抑制に伴う骨形成速度の低下が回避される  
( $n = 4$ , mean  $\pm$  SD, \*\*  $p < 0.01$  vs saline, #  $p < 0.01$  vs taFv-Fc, N.S. not significant vs saline/taFv-Fc)

## 【結論・考察】

本研究により、RANKL 逆シグナルは生体レベルにおいて骨吸収と骨形成のカップリング機構の一部として機能することが示唆され、また生体内で RANKL 逆シグナルを活性化した場合骨形成が促進されること、さらに、RANKL 逆シグナル入力活性に加えて、骨細胞上の RANKL から破骨前駆細胞上の RANK に対するシグナル入力を阻害することにより破骨細胞形成抑制活性を併せ持つことができるバイオロジクスは、破骨細胞抑制に伴う骨形成の低下を回避できることが見出された。骨粗鬆症に対して広汎に使用されている骨吸収抑制剤は、強力に骨吸収を抑制する結果、カップリング因子を枯渇させ、骨形成に対しても強い低下を生じさせ、骨代謝回転全体を低下させることが問題である。RANKL 逆シグナルを標的としたバイオロジクスは、骨吸収を抑制しながらも骨形成の抑制は回避できると考えられ、従来の骨吸収抑制薬の問題点を克服した薬剤となる可能性が期待される。