

生体内における骨恒常性は、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（骨リモデリング）を介して一定に維持されている。破骨細胞の成熟・活性化過程においては、破骨前駆細胞に発現する受容体である RANK の下流シグナル伝達経路が中心的な役割を果たすことが知られている。RANK のリガンド分子である RANKL は、骨芽細胞系細胞群に発現することが知られており、従来は骨芽細胞表面に発現する RANKL 分子が細胞間接触を介して破骨前駆細胞表面に発現する RANK に結合し、シグナルを入力することで破骨細胞への成熟・活性化を誘導していると考えられてきた。しかし近年になって、生理的な破骨細胞形成過程において RANKL の主要な供給を担っている細胞は、骨芽細胞が自身の形成した新生骨内に侵入して最終分化することで形成される骨細胞であることが示され、骨芽細胞に発現する RANKL は破骨細胞の成熟・活性化に大きな寄与を示さない可能性が示唆された。そのため、骨芽細胞に発現する RANKL の生理的な役割が不明瞭となっており、当研究室ではこの点に着目した分子論的研究が進められてきた。その結果、*in vitro* においては、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）を分泌することが明らかにされた。また、膜小胞型 RANK で骨芽細胞を刺激した場合、骨芽細胞表面上の RANKL を介して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も見出されており、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唆された。さらに骨芽細胞内においては、PI3K-Akt-mTORC1 経路の活性化を通じて、骨芽細胞分化制御因子である Runx2 の核内移行を刺激することも見出している。一連の骨芽細胞内シグナルイベントを RANKL 逆シグナル経路として提唱してきたが、その生理的な役割は明らかになっておらず、重要な課題と考えられた。

一方、生理的な骨リモデリング過程において、骨吸収フェーズから骨形成フェーズへの円滑な進行が行われるためには、破骨細胞に由来する何らかのカップリング因子が必要であると考えられており、従来は骨基質中に含まれる IGF-1、TGF- β 等のサイトカインが骨吸収に応じて溶出し、骨芽細胞の分化を促進する可能性が唱えられてきた。加えて、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直接分泌され、骨芽細胞の分化活性化を制御していることが相次いで報告され、骨吸収と骨形成のカップリングは、多様な分子ネットワークを介して時空間的に精密に制御されている可能性が示唆されつつある。このような知見に基づき、申請者は、「RANKL 逆シグナルは、生理的には骨吸収と骨形成のカップリングを構成する因子の一つとして機能するのではないか」という仮説を立てて検証を進めている。さらに、もし RANKL 逆シグナル経路がカップリングを構成するシグナル経路であれば、破骨細胞活性の抑制に伴う骨形成の低下を回避するための新規創薬標的となる可能性に関しても検証を行っている。

第一章では、膜小胞型 RANK が媒介する RANKL 逆シグナルが *in vivo* において骨吸収と骨形成のカップリングを担う因子の一つとして寄与する可能性を検証している。RANKL 細胞内ドメインに含まれるプロリンリッチモチーフ（PRM）が RANKL 逆シグナル入力において重要であることに着目し、PRM 内のプロリン Pro29 をアラニンに置換したノックインマウス（P29A ホモ変異マウス）が当研究室において作出されており、当該マウスから単離した初代培養骨芽細胞は、*in vitro* において RANKL 逆シグナル受容能が低下していることが確認されている。そのため、申請者は当該マウスを用いて生体レベルで RANKL 逆シグナル経路の役割を解析することを試みている。生体に対して、外部から RANKL 組換えタンパク質を投与して破骨細胞形成を一過性に誘導する実験系では、通常は骨吸収の亢進に引き続いて骨形成の亢進が生じることが知られており、骨吸収と骨形成のカップリングを選択的に評価できる実験系として汎用されている。P29A ホモ変異マウスにこの処置を行ったところ、骨吸収の活性化に引き続く骨形成速度の上昇が、野生型と比較して有意に抑制されることが示され、RANKL 逆シグナルが骨吸収と骨形成のカップリングに関与している可能性が示唆された。また、膜小胞型 RANK が、生体内においても RANKL 逆シグナルを入力するリガンドの役割を果たしている可能性を検証するため、膜小胞の分泌を抑制する阻害剤を投与した検討、および RANK 以外の分子を標的として、立体障害によって膜小胞型 RANK の機能を中和する抗体フラグメントを投与した検討を行って、慎重に解析を進めている。いずれの実験においても、生体内で膜小胞の作用を抑制した場合には、骨吸収と骨形成のカップリングが抑制されることが示されており、膜小胞型 RANK がカップリング因子として機能している可能性が示唆された。また、多様な *in vitro* 実験系を駆使することで、膜小胞型 RANK による骨芽細胞への RANKL 逆シグナル入力は、RANK-RANKL 相互作用を通じて生じることが示されており、膜小胞型

RANK が *in vivo* における RANKL 逆シグナルのリガンドであることの裏付けとなっている。

第二章では、従来の骨粗鬆症治療薬の問題点に着目し、RANKL 逆シグナルを標的とする新規バイオロジクスが、問題点を解決できる可能性を検証している。骨粗鬆症に対して広汎に使用されているビスホスホネート製剤や抗 RANKL 抗体製剤は、骨吸収を効率的に抑制すると同時に、破骨細胞由来のカップリング因子を枯渇させるため、骨形成も大きく低下させることが報告されている。その結果骨代謝回転全体が停滞し、顎骨壊死や大腿骨非定型骨折などの副作用に繋がると考えられており、臨床的な問題となっている。前章までの検討を踏まえれば、骨細胞に発現する RANKL が破骨前駆細胞に作用し、骨吸収に促進的に働く一方で、骨芽細胞に発現する RANKL は逆シグナルを受容し、骨形成に促進的に寄与するというバイファンクショナルな性質を有すると言える。そのため、RANKL 細胞外ドメインに結合する抗体フラグメントを利用して、骨細胞から破骨前駆細胞への RANKL シグナル入力を遮断すると同時に、骨芽細胞に対して RANKL 逆シグナルを入力できる新規分子を創製できれば、骨吸収抑制剤として機能するのみならず、破骨細胞形成抑制に伴うカップリング因子の低下を一部補填することが可能であり、骨吸収抑制に伴う骨形成の低下を回避できる可能性があるのではないかと、という仮説に基づいて検証を進めている。申請者はまず、骨芽細胞の *in vitro* 培養系を用いて、骨芽細胞の分化段階に応じて RANKL 逆シグナルの活性化が与える影響を詳細に検証し、RANKL 逆シグナルは Runx2 の機能に関する過去の報告と同様に、骨芽細胞の初期段階の分化を促進する一方、後期段階の分化に対しては抑制的に作用することを確認している。次いで、RANKL 逆シグナルの入力は、細胞表面上で複数の RANKL 分子が架橋されることが起点となって生じるという知見に基づき、RANKL 細胞外ドメインを認識する単鎖化抗体 (scFv) を用いて RANKL 逆シグナル入力活性を示す分子の設計を複数試みている。まず、単純に scFv を二量体化したコンストラクトを用いた検討では、RANKL 逆シグナルを活性化する分子を生体に投与した場合、一定のタイムラグを持って骨形成の促進が認められることが示された。*in vitro* 培養系の検討結果を踏まえると、RANKL 逆シグナルの活性化によって初期分化を促進された骨芽細胞が、投与期間終了後に後期段階へ分化し、骨形成に寄与したことを反映していると考えられた。但し、scFv 二量体は血中滞留性が非常に悪く、骨吸収抑制作用が維持される濃度を達成することが困難であったため、抗体 IgG Fc 領域との融合タンパク質とすることで、血中滞留性を改善したコンストラクトの設計を試みている。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作製した。骨芽細胞の *in vitro* 培養系における RANKL 逆シグナル入力活性を指標にスクリーニングを行った結果、RANKL 逆シグナル入力活性の最も高かったコンストラクト (scDb-Fc) と、比較対照として、シグナル入力活性を示さないコンストラクト (taFv-Fc) を選択し、生体に投与した際の効果に関して検証を行っている。その結果、taFv-Fc を投与した場合には、骨吸収の抑制と共に骨形成速度も大きく低下する様子が観察され、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して、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が認められておらず、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。すなわち、RANKL 逆シグナル経路を標的とすることで、従来の骨吸収抑制剤で認められる、カップリング抑制に伴う骨形成低下を回避できる可能性が確認された。

一連の研究結果は、RANKL 逆シグナル経路が、生理的には骨吸収と骨形成のカップリングを媒介する役割を担っていることを示し、カップリング機構の全体像の理解に大きく寄与すると考えられる。また、RANKL 逆シグナル経路が、従来の骨粗鬆症治療薬の問題点を解決する新規創薬標的になる可能性も示しており、臨床的な観点からも、貢献が大きいと考えられる。

以上の点を鑑み、本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。