

# 博士論文

可溶型 RANKL の生理的意義およびがん骨転移における役割

浅野 達雄

題目: 可溶性 RANKL の生理的意義およびがん骨転移における役割

所属: 東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻

指導教員名: 高柳 広

申請者: 浅野 達雄

要旨: Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) は多彩な機能をもつサイトカイン

であり破骨細胞分化や免疫組織形成などに必須である。RANKL は膜結合型と可溶性

の二つの形態をとることが知られている。私は可溶性 RANKL を選択的に欠損させた

マウス (*Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>) を解析し可溶性 RANKL の生理的及び病理的意義を検証した。

*Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの骨量や免疫組織の形成は正常であったため生理的状況下では膜結

合型 RANKL が主要な機能を果たすことが示された。一方でメラノーマおよび乳がん

の骨転移モデルでは野生型マウスに比べ *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスでは骨転移が抑制されてい

た。これらの知見から可溶性 RANKL を抑制することで、生理的機能の障害を最小限

にしつつ骨転移を抑制できる可能性が示された。

## 目次

### 第一章 序文

- 1-1. 全身の器官から見た骨の特殊性 . . . 9
- 1-2. 骨を構成する細胞 . . . 9
- 1-3. 骨免疫学の概念 . . . 10
- 1-4. 破骨細胞分化因子 RANKL 同定の経緯 . . . 11
- 1-5. RANKL による破骨細胞分化誘導 . . . 12
- 1-6. RANKL の多彩な生理的機能 . . . 13
  - 1-6-1. RANKL による胸腺の形成 . . . 15
  - 1-6-2. RANKL によるリンパ節形成 . . . 16
  - 1-6-3. RANKL と B 細胞分化 . . . 17
  - 1-6-4. RANKL による M 細胞分化 . . . 17
  - 1-6-5. RANKL による妊娠期の乳腺の発達 . . . 18
- 1-7. RANKL の病理的意義 . . . 18
  - 1-7-1. RANKL と閉経後骨粗鬆症 . . . 18
  - 1-7-2. RANKL とがん転移 . . . 19
    - 1-7-2-1. RANKL とがん骨転移 . . . 19

1-7-2-2. RANKL と乳がんの肺転移	・・・21
1-8. RANKL は膜結合型と可溶型の二つの機能的な形態をとる	・・・21
1-9. 可溶型 RANKL と病態との関連性	・・・26
1-10. 抗 RANKL 療法	・・・27
1-10-1. デノスマブと免疫チェックポイント阻害剤の併用療法	・・・27
1-10-2. 低分子 RANKL 阻害剤	・・・28
1-11. 研究目的	・・・29

## 第二章 方法

2-1. 実験試薬/器具	・・・30
2-2. 実験動物	・・・30
2-3. マウス卵巣摘出骨粗鬆症モデル	・・・32
2-4. 細胞調製法	・・・32
2-4-1. リンパ節と胸腺からのリンパ球調製法	・・・32
2-4-2. 胸腺からのストローマ細胞調製法	・・・32
2-4-3. 骨髄からの細胞調製法	・・・33
2-4-4. 新生仔頭蓋冠からの細胞調製法	・・・33

**2-5. 細胞培養法 . . . 33**

**2-5-1. B16F10 Red-Fluc 細胞の培養法 . . . 33**

**2-5-2. E0771-Luc 細胞の培養法 . . . 33**

**2-5-3. 共存培養による破骨細胞分化誘導 . . . 34**

**2-5-4. 抗 CD3 抗体による胸腺細胞刺激 . . . 34**

**2-6. がん転移モデル . . . 34**

**2-6-1. がん細胞左心室注入方法 . . . 34**

**2-6-2. *in vivo* bioluminescence imaging によるがん細胞転移の観察 . . . 35**

**2-6-3. *ex vivo* bioluminescence imaging によるがん細胞転移の観察 . . . 35**

**2-7. がん皮下移植モデル . . . 36**

**2-8. マイクロ CT 解析法 . . . 36**

**2-9. 組織学的解析法 . . . 36**

**2-9-1. パラフィン切片作製法 . . . 36**

**2-9-2. パラフィン切片染色法 . . . 37**

**2-9-2-1. HE 染色 . . . 37**

**2-9-2-2. TRAP 染色 . . . 37**

**2-9-3. 凍結切片作製法 . . . 38**

2-9-4. 蛍光抗体染色法	・・・38
2-10. フローサイトメトリー法	・・・39
2-11. ELISA 法	・・・40
2-11-1. 可溶性 RANKL の ELISA 法	・・・40
2-11-1-1. 血清の調製方法	・・・40
2-11-1-2. 骨髄液の調製方法	・・・40
2-11-1-3. 培養上清の調製方法	・・・40
2-11-1-4. 胸腺組織液の調製方法	・・・40
2-11-2. OPG の ELISA 法	・・・40
2-12. 図中の画像データの表示	・・・41
2-13. 統計解析法	・・・41
第三章 結果	
3-1. <i>Tnfsf11</i> <sup>AS/AS</sup> マウスでは可溶性 RANKL は完全に欠失している	・・・42
3-2. <i>Tnfsf11</i> <sup>AS/AS</sup> マウスは大理石骨病を呈さない	・・・44
3-3. 可溶性 RANKL はリンパ節形成には必須ではない	・・・48
3-4. 可溶性 RANKL は胸腺髄質上皮細胞の分化には必須ではない	・・・50

- 3-5. 可溶型 RANKL の欠損は骨髄中の B 細胞分化には影響しない . . . 52
- 3-6. 可溶型 RANKL は妊娠時の乳腺発達には影響しない . . . 54
- 3-7. 可溶型 RANKL は卵巣摘出モデルによる骨量の減少には影響しない . . . 54
- 3-8. 可溶型 RANKL はがん細胞に対する走化性因子として機能し骨転移を誘導する . . . 56
  - 3-8-1. B16F10 Red-Fluc メラノーマ細胞を使用した検証 . . . 56
  - 3-8-2. E0771-Luc 乳がん細胞を使用した検証 . . . 64

#### 第四章 考察

- 4-1. 可溶型 RANKL の生理的意義 . . . 69
- 4-2. がん骨転移における可溶型 RANKL の役割 . . . 71
- 4-3. 今後の展望 . . . 72

#### 第五章 結論 . . . 76

引用文献 . . . 77

謝辞 . . . 91



## 第一章 序文

### 1-1. 全身の器官から見た骨の特殊性

骨は硬組織としての強度を生かして身体を支持・保護し、運動器として機能する。骨の構造に一見変化が無い様に見えても、実際は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の盛んな代謝の平衡状態にあり、骨の本質は極めて動的なものである<sup>1</sup>。また骨基質はカルシウムの巨大な貯蔵庫でもあるため、この骨代謝の増減は生体内でのカルシウム濃度の恒常性維持に大きく寄与している<sup>1</sup>。さらに骨の内腔を占める骨髄は生後の主な造血器官であり、胸腺とともに一次リンパ組織として知られる免疫系の中枢である<sup>1</sup>。このように骨は他の器官と比して多様な機能の場となる特殊な臓器であると言える。

### 1-2. 骨を構成する細胞

成体になった後も骨組織は生涯を通じて新しく生まれ変わり、この過程は骨のリモデリングと呼ばれる。骨のリモデリングは骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞とのバランスによって維持されており、このバランスが崩れると骨量が減少し骨の強度が低下する骨粗鬆症や、逆に骨量が増加し骨髄腔が消失する大理石骨病を呈するようになる<sup>1</sup>。骨吸収は、単球/マクロファージ前駆細胞由来である破骨細胞が主に担う。骨表面に接着

した破骨細胞はカテプシン K やマトリックスメタロプロテアーゼなどの基質分解酵素と酸を放出して骨基質を分解する<sup>1</sup>。骨形成を担う骨芽細胞は間葉系幹細胞由来である。骨芽細胞はI型コラーゲンなどの骨基質タンパク質からなる類骨を形成する。さらにアルカリフォスファターゼと基質小胞を分泌することで類骨を石灰化させ骨を形成する<sup>1</sup>。骨芽細胞の最終分化形態が骨基質中に埋もれた骨細胞である。細胞突起を介したギャップ結合によって骨細胞同士は連結している。骨基質内に張りめぐらされた細胞突起のネットワークにより、骨細胞はメカニカルストレスを感知する細胞として骨代謝調節に関与していると考えられている<sup>1</sup>。また妊娠・授乳期では骨細胞性骨溶解が促進することで、カルシウム恒常性の維持に貢献することが報告されている<sup>2</sup>。

### 1-3. 骨免疫学の概念

骨の多彩な機能は古くより研究対象となっていたが、骨代謝制御や造血などの一機能に注目した別個の分野として進展してきた経緯がある。しかし近年では免疫学的な見地で骨代謝を理解することや、逆に骨代謝の視点から造血における骨髄微小環境を理解することなど、骨と免疫系の関係性を軸に生命現象を解明することが重視されるようになった<sup>1</sup>。古くから免疫系と骨の密接な関係については関心が持たれており、ヒトの末梢血白血球培養上清や骨髄腫細胞培養上清によって破骨細胞が活性化すること

が 1970 年代に報告されている<sup>34</sup>。また関節リウマチ患者の炎症滑膜組織において免疫反応を制御する様々な炎症性サイトカインの発現上昇を認めることが臨床分野でも注目されていた<sup>5</sup>。2000 年に Takayanagi らは破骨細胞分化とインターフェロンの作用の関係を国際誌に報告し、その論文に対する論説記事にて免疫系による骨代謝制御に焦点を当てた骨免疫学という概念が初めて提唱された<sup>6</sup>。この概念は速やかに受け入れられ、免疫系に関わるサイトカインの多くが骨代謝細胞にも作用すること、骨代謝に重要な制御因子が免疫組織の制御にも関わることが判明し、骨と免疫系の相互作用が理解されるようになった。

#### 1-4. 破骨細胞分化因子 RANKL 同定の経緯

1988 年に Takahashi らが確立した破骨細胞前駆細胞と骨芽細胞様細胞の共存培養による破骨細胞分化誘導には細胞間の接触が必要であった<sup>7</sup>。そのため破骨細胞分化因子 osteoclast differentiation factor (ODF) が膜結合型タンパク質として存在するという仮説が立てられ、多くの研究者が同定を試みた。1997 年に雪印乳業からは osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) として、アムジェン社からは osteoprotegerin (OPG) として破骨細胞形成抑制因子が同時期に同定され、その後、両者が同一タンパク質であることが示された<sup>8-10</sup>。雪印乳業のグループは、この OPG が ODF から ODF 受容体へのシグナルを抑制する

と仮説を立てて検証をしていった。共存培養系における破骨細胞分化を OPG が抑制すること、OPG は骨吸収因子で刺激した骨芽細胞に結合するが、無刺激の骨芽細胞には結合しないことを確認した上で発現クローニングを行った。その結果、OPG 結合タンパク質は、分子量 4 万の TNF ファミリーに属する新規膜結合型タンパク質であり、破骨細胞分化誘導能を持つことが判明した<sup>11</sup>。これらの結果から、この OPG 結合タンパク質は長年探求されていた ODF であることが証明された。この OPG 結合タンパク質は TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE) または Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) として T 細胞に発現する樹状細胞調節因子として報告されていた<sup>12,13</sup>。その後アムジェン社もわずかに遅れて OPG ligand (OPGL) として報告した<sup>14</sup>。一時期名称の混乱があったが、現在では ODF の名称は RANKL に統一されている。RANKL の同定後、破骨細胞分化シグナルが精力的に研究され、その全容が次第に明らかにされていった。

#### **1-5. RANKL による破骨細胞分化誘導**

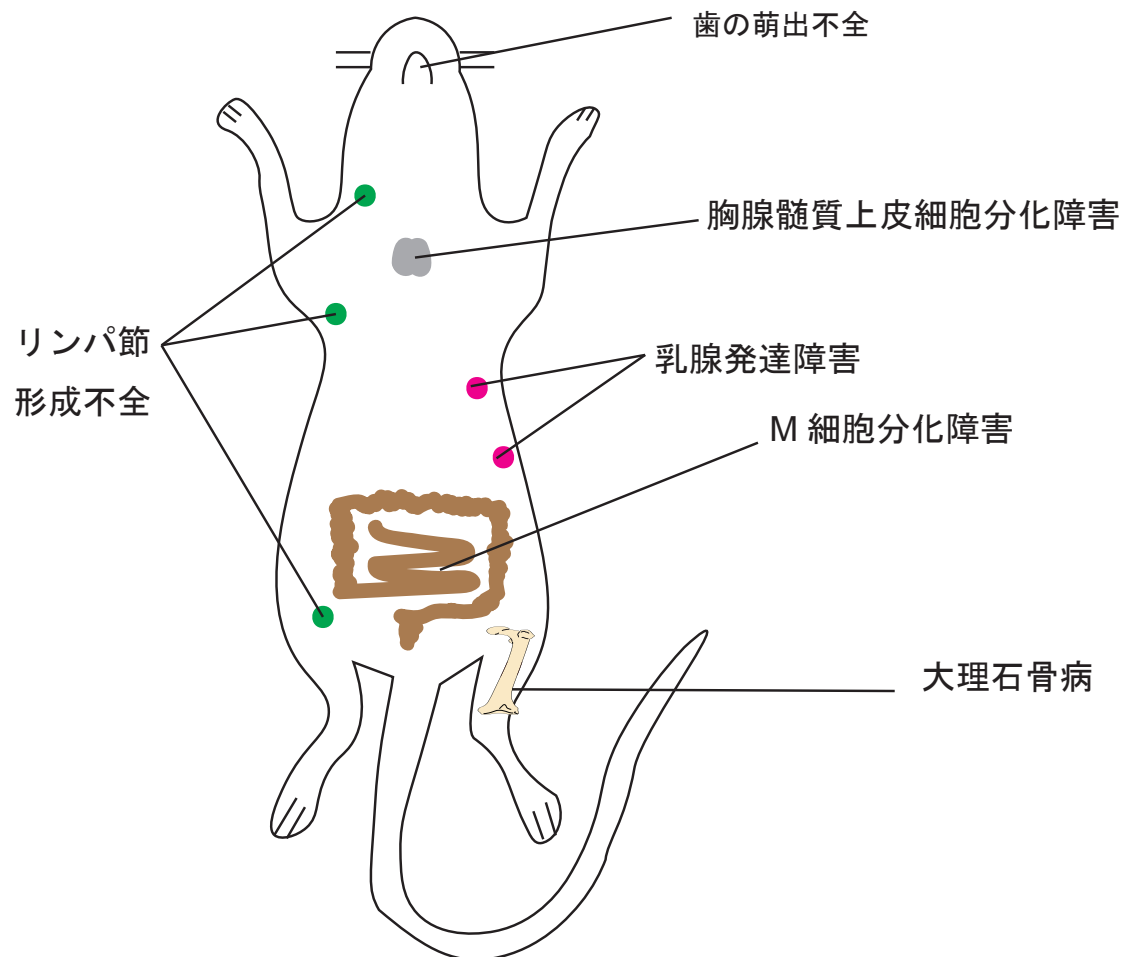
破骨細胞前駆細胞は RANKL の受容体である Receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) を発現しており、骨芽細胞や骨細胞などの間葉系細胞が供給する RANKL の刺激を受けることで、分化が誘導される。一方、osteoprotegerin (OPG) は RANKL のデコイ受容体として働き、破骨細胞分化を強力に抑制する。RANKL が RANK に結合すると、破骨細胞前駆細胞内

で MAPK 経路、NF- $\kappa$ B 経路やカルシウムシグナルが活性化し、転写因子 nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1 が発現誘導され活性化する。NFATc1 は破骨細胞分化や細胞融合、骨吸収能に必須の遺伝子群の発現を誘導する破骨細胞分化のマスター転写因子として機能する。RANKL だけでなく転写因子 NFATc1 や RANKL シグナル下流の一連の制御因子も免疫細胞の重要な制御因子であり、破骨細胞分化に関わる多くの制御因子が免疫系と共有されていることが知られている。

RANKL 欠損マウスは破骨細胞が完全に消失するため重篤な大理石骨病と歯牙萌出不全を呈する<sup>15</sup> (図 1)。OPG を欠損したマウスは破骨細胞数が増加し骨吸収が増大するため重篤な骨粗鬆症を呈する<sup>16</sup>。ヒトにおいては RANK (*TNFRSF11A*) と RANKL (*TNFSF11*) の機能喪失型変異は常染色体劣性大理石骨病を、OPG (*TNFRSF11B*) の機能喪失型変異は若年性パジェット病を呈することが知られている<sup>1</sup>。一方で家族性広汎性骨溶解症患者には RANK (*TNFRSF11A*) の機能獲得型変異が見出されることが報告されている<sup>17</sup>。

#### **1-6. RANKL の多彩な生理的機能**

RANKL 欠損マウスでは骨以外にも免疫組織や乳腺に異常を認める<sup>15,18</sup> (図 1)。このことから推測されるように、RANKL は多彩な生理的機能を発揮することが判明している。



**図1 RANKL 欠損マウスにおける 骨・免疫組織・乳腺の異常**

RANKL 欠損マウスは成長障害を伴う重度の大理石骨病と歯の萌出不全を呈する。大理石骨病は骨髓が形成されないため造血障害を伴う。加えて全身のリンパ節の形成不全、胸腺髓質上皮細胞分化障害と腸管免疫組織の M 細胞の分化障害をきたす。また妊娠期の乳腺発達が障害されることも特徴である。

### 1-6-1. RANKL による胸腺の形成

RANKL は胸腺における T 細胞の自己寛容の確立にも必須である。胸腺は T 細胞分化に特化した一次リンパ組織であるが、その微小環境は胸腺髄質上皮細胞と胸腺皮質上皮細胞の 2 種類の胸腺ストローマ細胞によって構成される<sup>1</sup>。胸腺では適切な抗原受容体を発現する T 細胞のみが末梢で機能するように、正の選択と負の選択が行われる<sup>1</sup>。胸腺皮質上皮細胞で発現する自己抗原/主要組織適合遺伝子 (Major Histocompatibility complex: MHC) 分子複合体に対して、適度に反応する抗原受容体を持った CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞 (double positive) のみが生存する過程が正の選択である<sup>1</sup>。生存した CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞は CD4<sup>+</sup>または CD8<sup>+</sup>の single positive (SP) 細胞に分化する。この SP 細胞は胸腺髄質で負の選択を受け、自己抗原/MHC 分子複合体と強く反応する場合はアポトーシスにより死滅する<sup>1</sup>。胸腺髄質上皮細胞で全身の末梢組織の抗原を発現するために必要な調節因子が転写因子 Aire と Fezf2 である<sup>19,20</sup>。胸腺髄質上皮細胞には RANK が高発現しており、RANKL 及び RANK 欠損マウスでは Aire 陽性の胸腺髄質上皮細胞が著しく減少することから胸腺髄質上皮細胞の成熟には RANKL の刺激が必要と考えられている<sup>21</sup>。胎児期では LTi 細胞や  $\gamma\delta$ T 細胞が、生後は CD4SP 細胞及び CD8SP 細胞や NKT 細胞が主な RANKL の供給源であると報告されている<sup>21-25</sup>。

## 1-6-2. RANKL によるリンパ節形成

RANKL または RANK 欠損マウスでは全身のリンパ節が形成されない。リンパ節の形成には自然リンパ球に分類される LTi 細胞 (Lymphoid tissue inducer cells) と、リンパ節原基に存在する LTo 細胞 (Lymphoid tissue organizer cells) の相互作用が重要とされてきた。LTi 細胞は Lymphotoxin  $\alpha 1\beta 2$  を発現しており、LTo 細胞に発現している Lymphotoxin  $\beta$  受容体と結合することで、ケモカイン CXCL13 や接着分子の発現を誘導する。この LTo 細胞の活性化によってさらに LTi 細胞が LTo 細胞に誘引されて、リンパ節形成が促進する<sup>1</sup>。胎生期の LTi 細胞と LTo 細胞はいずれも RANKL 及び RANK を発現している<sup>26,27</sup>。RANKL 刺激が LTi 細胞の Lymphotoxin  $\alpha 1\beta 2$  の発現を誘導することが判明している。しかし RANKL 欠損マウスに Lymphotoxin  $\beta$  受容体 agonist を投与してもリンパ節形成は回復しないことが報告されているため、Lymphotoxin  $\alpha 1\beta 2$  発現以外にも RANKL の必要性があることが示唆される。<sup>28</sup>。近年の報告ではリンパ管上皮細胞に発現している RANK の重要性も指摘されており、リンパ節形成の複雑なメカニズムが解明されつつある<sup>29</sup>。



### 1-6-3. RANKL と B 細胞分化

RANKL 欠損マウスでは B 細胞の分化異常を認める<sup>15</sup>。ところがその後、RANK を B 細胞特異的に欠損したマウスでは骨髄での B 細胞分化は正常に行われ、末梢における抗体産生やクラススイッチにも異常がないことが分かった<sup>30</sup>。したがって RANKL 欠損マウスでの B 細胞分化異常は大理石骨病による骨髄環境変化の影響が大きいと考えられる。一方で RANKL を B 細胞特異的に欠損したマウスでは pre B 細胞の減少を認めることから、B 細胞上に発現している RANKL が少なくとも部分的には B 細胞分化に寄与することが報告されているが詳しい機序は不明である<sup>31</sup>。

### 1-6-4. RANKL による M 細胞分化

パイエル板などの腸管免疫組織は腸管内腔に存在する無数の抗原を直接的に取り込むことで免疫応答を発動している。腸管免疫組織を被覆する上皮細胞は濾胞上皮細胞と呼ばれ、この中に腸管内腔の抗原を取り込む M 細胞が存在する。RANKL または RANK 欠損マウスにおいては M 細胞が消失する<sup>32</sup>。一方でリコンビナント RANKL を野生型マウスに投与すると小腸全体に M 細胞が分化する。腸管上皮細胞は RANK を発現しており、その一部が RANKL の刺激で M 細胞に分化することが考えられている<sup>32</sup>。近年、濾胞上皮直下の RANKL を発現している間葉系細胞が M 細胞分化を誘導する

特殊な細胞 (M cell inducer cells) であることが報告されている<sup>33</sup>。

#### **1-6-5. RANKL による妊娠期の乳腺の発達**

RANKL 及び RANK 欠損マウスでは成長期における乳腺の発生や成熟には変化が認められないが、妊娠期の乳腺上皮の発達が障害される。その結果、母乳産生器官である乳腺葉構造が形成されないことが報告されている<sup>34</sup>。従って RANKL 及び RANK 欠損マウスでは授乳ができず仔マウスの育成が出来ない。プロゲステロンは妊娠期に分泌が増える。これは乳腺上皮細胞上のプロゲステロン受容体を介して RANKL の発現を増加させる。さらに乳腺上皮細胞に発現した RANKL はオートクラインまたはパラクライン経路を介して RANK に結合し乳腺細胞の増殖を誘導することが知られている<sup>35,36</sup>。

#### **1-7. RANKL の病理的意義**

前述のように RANKL は多様な生理的機能を有するため、その異常な活性化や制御の破綻は様々な疾患の病態に関わることが報告されている。

##### **1-7-1. RANKL と閉経後骨粗鬆症**

閉経後の女性は急激な骨量低下を認め骨折のリスクが増える。このことはエストロゲンは女性の生殖器官の調整だけでなく骨の恒常性維持にも重要であることを示

している。破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞はエストロゲン受容体を発現しておりエストロゲン低下が直接的に骨代謝に影響する機序が報告されている。破骨細胞においてはエストロゲンはアポトーシスを促進することが知られている<sup>37</sup>。骨芽細胞、骨細胞におけるエストロゲンの作用は複雑である。骨芽細胞前駆細胞に発現しているエストロゲン受容体を欠損させるとエストロゲン減少に伴う骨量の減少が抑えられるという報告があるが、否定する報告もある<sup>38-41</sup>。また骨細胞特異的にエストロゲン受容体を欠損させたマウスでは骨量の減少が抑制されるという報告があるが、再現性に疑問がある<sup>42,43</sup>。このように骨芽細胞、骨細胞におけるエストロゲンの直接作用については一致した見解は得られていない。一方でRANKLを介した機序としては、卵巣摘出による閉経後骨粗鬆症マウスモデルにおいてはエストロゲン受容体を発現しているB細胞や骨芽細胞がRANKLの供給源となり、破骨細胞の活性化を促進することが報告されている<sup>44,45</sup>。

## **1-7-2. RANKL とがん転移**

### **1-7-2-1. RANKL とがん骨転移**

骨は高頻度にごんの転移先となる組織であり、骨転移はがん患者の生命予後、生活の質いずれにも悪影響を与える<sup>46</sup>。進行がんの場合、乳がん患者の65-75%、前立腺がんの65-75%、甲状腺がんの60%、肺がんの30-40%、腎細胞がん

の 20-25%、メラノーマの 14-45%が骨転移を伴うと報告されている<sup>46</sup>。骨はインスリン様増殖因子 (IGF-1) やトランスフォーミング増殖因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ ) などの増殖因子を最も豊富に含む組織である。これらの増殖因子はがん細胞の増殖・生存を促進する。したがって骨はがん細胞にとって極めて増殖に有利な環境と言える。

がん細胞は IL-6、IL-8、IL-11 などのサイトカインや副甲状腺ホルモン関連タンパク質を産生し骨芽細胞の RANKL 発現を高める。RANKL は破骨細胞分化を促進し、骨吸収が増進する。骨吸収は増殖因子の放出を促し、さらなるがん細胞の増殖を誘導する。このようにがん細胞の増殖と破骨細胞による骨吸収によって vicious cycle と呼ばれる悪循環を呈することが知られている<sup>47</sup>。

また一方で RANKL による破骨細胞の活性化を伴わない、がん骨転移モデルがメラノーマ細胞 (B16F10) や乳がん細胞 (MDA-MB-231、MCF-7、BT-474) を用いて示されている<sup>48-51</sup>。これらのがん細胞は細胞表面に RANK を発現しており、リコンビナント RANKL に正の走化性を示すことが *in vitro* の腫瘍細胞遊走実験で示されている。B16F10 細胞は左心室内注入することで高頻度に長管骨や脊椎に転移を認めるが、乳がんや前立腺がんとは異なり破骨

細胞の活性化や骨吸収像を示さないという特徴がある。B16F10 細胞を移入したマウスに OPG を投与すると骨転移が抑制されることが示されている。

### 1-7-2-2. RANKL と乳がんの肺転移

肺は骨と並び最も高頻度に乳がんが転移する臓器である<sup>52</sup>。乳がんが肺に転移する機序に RANKL が関わっていることが動物実験モデルで示されている<sup>53</sup>。がん関連線維芽細胞がケモカイン CCL5 を産生すると制御性 T 細胞が乳がん組織に浸潤する。制御性 T 細胞に発現している RANKL が乳がん細胞のリン酸化酵素 IKK $\alpha$ の活性化と細胞接着に関与する Maspin の発現抑制を誘導し、その結果転移を促進することが示されている。

### 1-8. RANKL は膜結合型と可溶型の二つの機能的な形態をとる

RANKL は膜結合型タンパク質として細胞表面上に発現した後、MMP14、ADAM10、TACE などのタンパク分解酵素によって細胞外ドメインが切断されることで、可溶性タンパク質として分泌される<sup>54-56</sup> (図 2a)。膜結合型 RANKL、可溶性 RANKL はいずれも 3 量体を形成し、RANK と結合する。その結果、RANK3 量体の形成を誘導しシグナル伝達因子を動員することが知られている。一方で膜結合型と可溶型が生体でどのような役割の違いがあるかは不明である<sup>11,15,57,58</sup>。破骨細胞前駆細胞と骨芽細胞とを共存培養することで破骨細胞分化を誘導することができる。ところが、前駆細胞と骨芽

細胞を membrane filter で分けして培養すると破骨細胞分化は誘導されない<sup>59</sup>。一部にだけ骨芽細胞を敷いたプレートで破骨細胞前駆細胞を培養すると骨芽細胞層でのみ破骨細胞分化が誘導される<sup>60</sup>。また破骨細胞前駆細胞にリコンビナント RANKL を加えると破骨細胞分化を誘導することができるが、膜結合型 RANKL を模してリコンビナント RANKL をオリゴマー化することでより強く破骨細胞分化を誘導することができる<sup>55,61</sup>。このように *in vitro* の系では膜結合型 RANKL の方が破骨細胞誘導能が高いことが示唆される報告を認める (図 2b,c)。一方で RANKL の細胞外ドメインを切断する MMP14 を欠損したマウスでは破骨細胞数が増加し骨量が低下する。このことは膜結合型から可溶型への転換は破骨細胞分化誘導を低下させることを示しており、間接的ではあるが膜結合型の優位性が示唆される<sup>56</sup>。しかし MMP14 は RANKL を発現している骨芽細胞や骨細胞以外にも、破骨細胞、間葉系幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、ミエロイド系細胞、脂肪細胞、神経細胞などの多くの細胞でも発現しており生体内でのコラゲナーゼとして重要な役割を果たしている<sup>62</sup>。実際に MMP14 欠損マウスでは骨格系の異常だけではなく、軟部組織の線維化、血管新生異常、顎下腺発達や肺形成の異常を引き起こす<sup>62</sup>。したがって、MMP14 欠損マウスの解析では骨代謝以外の要因も影響するため、可溶型 RANKL の機能を完全に把握することはできない。

細胞特異的 RANKL 欠損マウスを使用して解析すると時期によって主な

RANKL の供給源が変化することが判明した。軟骨細胞・骨芽細胞特異的 RANKL 欠損マウスでは生後、大理石骨病を呈する。骨細胞特異的 RANKL 欠損マウスでは5週齢の時点では骨量や破骨細胞数に変化を認めないが、加齢に伴って破骨細胞数の低下と骨量の増加を認めるようになる。このことは成体になってからの骨リモデリングには骨芽細胞や軟骨細胞よりも骨細胞が RANKL の供給源となっていることが示されており、骨基質内に埋没している骨細胞と骨表面付近を漂う破骨細胞前駆細胞の位置関係を考慮すると可溶性 RANKL が骨リモデリングに寄与している可能性が示唆される<sup>63,64</sup> (図 3)。

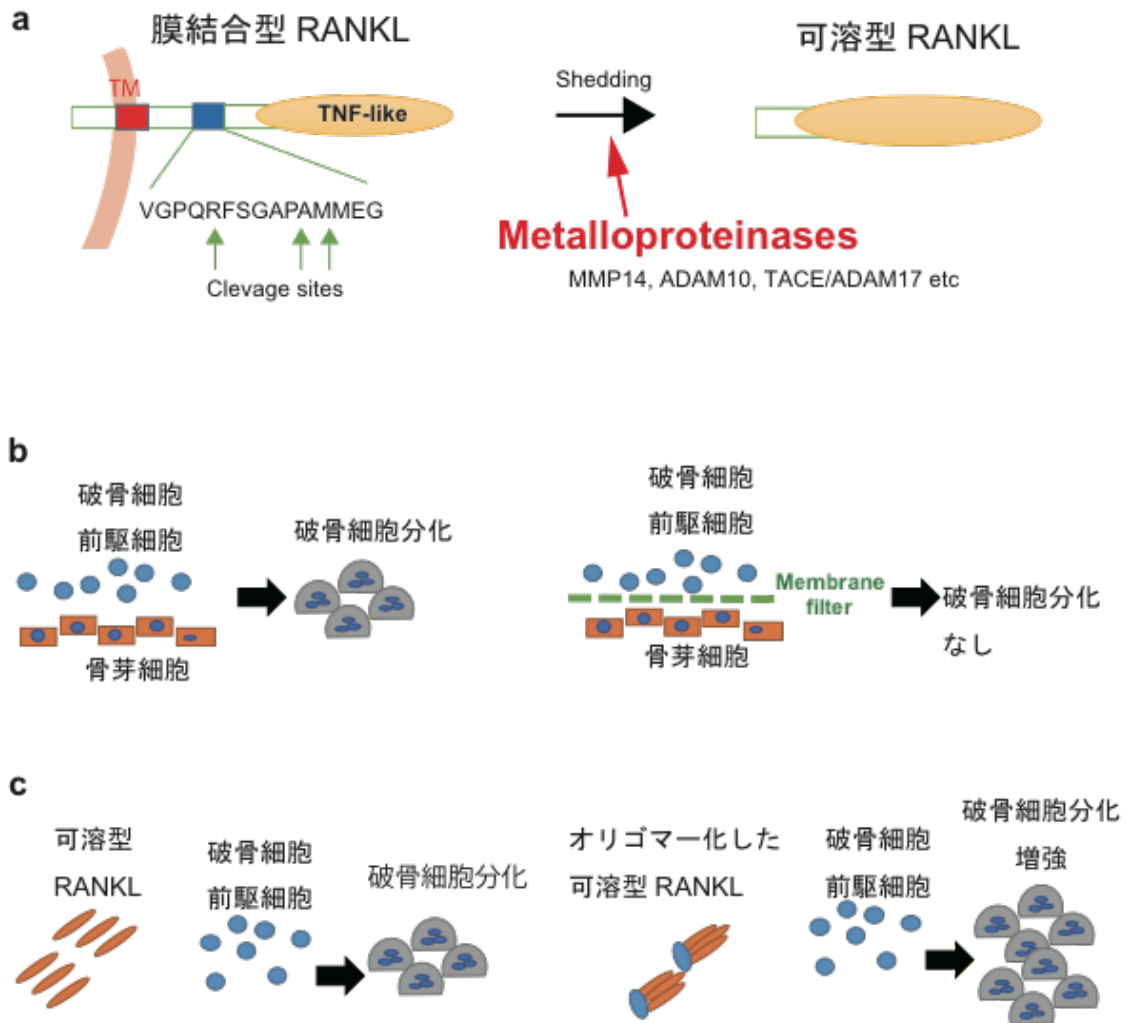


図2 *in vitro* の実験系では膜結合型 RANKL が可溶型 RANKL に比べて優位な働きをするという結果が得られている

(a) RANKL は膜結合型 タンパク質として産生され細胞表面に発現した後に、メタロプロテアーゼによって細胞外ドメインが切断され可溶型タンパク質として分泌される<sup>54-56</sup>。

(b) 破骨細胞前駆細胞と骨芽細胞とを共存培養すると破骨細胞分化が誘導される。ところが前駆細胞と骨芽細胞間を membrane filter で分けると破骨細胞分化は誘導されない。この結果は破骨細胞分化には細胞間接着が必須であることを示すものである<sup>59</sup>。

(c) 可溶型 RANKL を投与すると破骨細胞分化を *in vitro* 系で破骨細胞分化を誘導することができる。膜結合型 RANKL を模して可溶型 RANKL をオリゴマー化すると破骨細胞分化誘導能が増強する<sup>55,61</sup>。



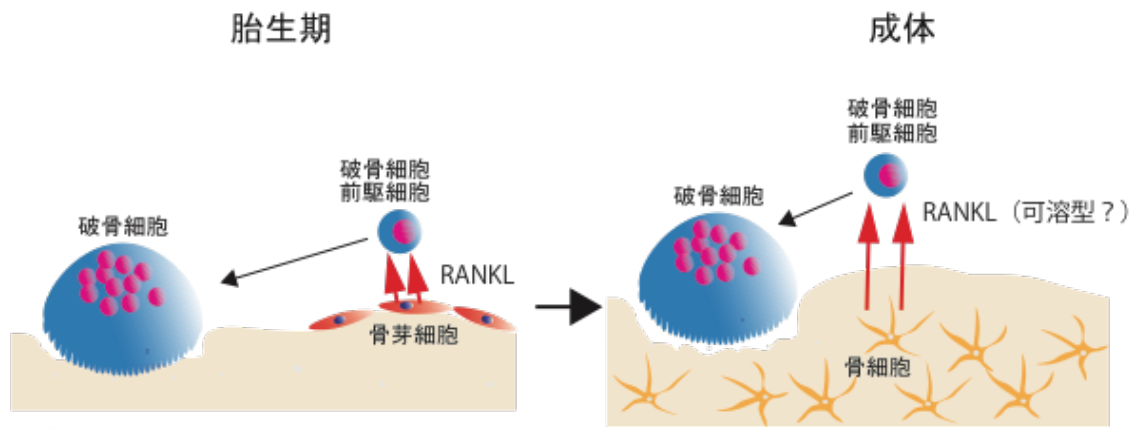


図3 成体での骨リモデリングでは骨基質に埋没している骨細胞が RANKL の主要な供給源であり可溶型 RANKL の関与が示唆される

胎児期には骨芽細胞や軟骨細胞が RANKL の供給源であるのに対して、成体での骨リモデリングでは骨細胞が RANKL の主要な供給源であることを示している。骨細胞は骨基質に埋没しているという構造的な特徴から、可溶型 RANKL が破骨細胞前駆細胞に結合している可能性がある<sup>63,64</sup>。

## 1-9. 可溶性 RANKL と病態との関連性

RANKL と関連する疾患のいくつかでヒトの血清中可溶性 RANKL 濃度との相関が報告されている。女性の閉経後の骨密度の低下と血清中の可溶性 RANKL 濃度の上昇との相関の報告がある<sup>44,65,66</sup>。また卵巣摘出による閉経後骨粗鬆症動物モデルでも同様に血液中の RANKL 濃度の上昇を認めることが知られている<sup>67</sup>。関節リウマチの関節予後と血清中の可溶性 RANKL 濃度の上昇が相関することが報告されている<sup>68,69</sup>。前述のようにがんの骨転移と RANKL の関係性は指摘されているが、乳がん、肺がん、前立腺がん、腎がんといった固形腫瘍の骨転移および多発性骨髄腫と血清中の可溶性 RANKL 濃度とは相関しないと報告されている<sup>70,71</sup>。一方で早期前立腺がん患者の術前の血清可溶性 RANKL 濃度上昇と術後の再発が相関するという報告がある<sup>72</sup>。

RANKL 測定のサンプルとして血清を使用している理由として血液の採取が比較的容易であるためであることが多く、必ずしも血液中の可溶性 RANKL 濃度が局所の病変部における可溶性 RANKL の産生を反映しているとは限らない。また血清中の可溶性 RANKL 濃度と病態とに相関関係が認められたとしても、可溶性 RANKL が病態の原因であるという因果関係の説明には結びつかない。そのため未だに可溶性 RANKL の病理的意義の解明はなされていない。

## 1-10. 抗RANKL療法

現在、臨床では抗RANKL療法としてヒト型抗RANKLモノクローナル抗体製剤であるデノスマブ（商品名 プラリア®、ランマーク®）が使用できる。適応はプラリア®は骨粗鬆症（2013年承認）、関節リウマチに伴う骨びらんの進行抑制（2017年承認）、ランマーク®は多発性骨髄腫による骨病変及び固形癌骨転移による骨病変（2012年承認）、骨巨細胞腫（2014年承認）である。

ビスホスホネート製剤投与中の骨粗鬆症患者に対するデノスマブの効果を検証した STAND 試験によって、ビスホスホネート製剤治療を行った後、デノスマブに変更した群の方がビスホスホネートを終始継続していた群よりも骨吸収抑制と骨密度増強効果が高いことが判明している<sup>73</sup>。乳がんと前立腺がんにおいてはデノスマブはビスホスホネート製剤（ゾレドロン酸）よりも骨関連事象の予防効果が高いことが示されている<sup>74,75</sup>。一方で乳がんと前立腺がんを除く固形がんと多発性骨髄腫においてはデノスマブとビスホスホネート製剤（ゾレドロン酸）の骨関連事象の予防効果は同程度であることが示されている<sup>76</sup>。

### 1-10-1. デノスマブと免疫チェックポイント阻害剤の併用療法

進行した病期のメラノーマ患者に対してデノスマブと免疫チェックポイント阻害剤の併用が奏功したという複数の症例報告がある<sup>77-79</sup>。多数の施設のデータベース

を使用した後ろ向き観察研究では進行期のメラノーマ患者と転移巣を持つ非小細胞肺癌の患者ではデノスマブと免疫チェックポイントの併用療法によって生存期間が延長することが示された<sup>80</sup>。また動物実験では抗 RANKL 抗体と免疫チェックポイント阻害剤を併用することで乳がん、前立腺がん、メラノーマの肺転移や皮下移植腫瘍が抑制されることが示されている<sup>81,82</sup>。抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 CTLA-4 抗体といった免疫チェックポイント阻害剤によるがん治療は効果のある患者が限定的であるという課題がある<sup>83</sup>。治療効果のある患者を増やし、効果を最大化するために免疫チェックポイント阻害剤の効果を上げる併用療法が探求されている。抗 RANKL 療法と免疫チェックポイント阻害剤の併用による抗腫瘍効果が期待される。

#### **1-10-2. 低分子 RANKL 阻害剤**

最近、低分子 RANKL 阻害剤の経口投与によるがん骨転移抑制を検証した報告がある<sup>84</sup>。MDA-MB-231 乳がん細胞の骨転移モデルでは低分子 RANKL 阻害剤の経口投与によって骨転移と骨溶解の抑制を認めた。一方で骨溶解を伴わない B16F10 メラノーマ細胞の骨転移モデルにおいても低分子 RANKL 阻害剤の経口投与によって骨転移の抑制が認められた。骨転移におけるデノスマブに対する代替アプローチとしても、低分子 RANKL 阻害剤の臨床への導入が望まれる。

## 1-11. 研究目的

RANKL は骨、免疫、乳腺といった生存・繁殖に不可欠な組織や器官に必須のサイトカインである。一方で炎症性骨破壊やがん骨転移を促進するなど病理的な意義も大きいことが分かっている。私は今回、可溶性 RANKL 欠損マウスの解析を行なうことで可溶性 RANKL の生理的機能と病理的意義について検証し、RANKL が関連する疾患へのより有効な治療法開発の糸口となることを目的として研究を行った。

## 第二章 方法

### 2-1. 実験試薬/器具

特に記載の無い場合は、試薬についてはナカライテスク社、和光純薬社の特級試薬を、プレート、チューブ、シャーレ類はBD社の製品を使用した。

### 2-2. 実験動物

実験に用いた全てのマウスはSPF環境下にて飼育し、実験は「東京大学動物実験実施規則」と「東京大学動物実験実施マニュアル」に従って行なった。C57BL6J野生型マウスは日本クレアより購入した。

可溶性RANKL欠損マウスは当研究室で樹立した *Tnfrsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスを使用した<sup>85</sup>。*Tnfrsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスは既報で同定されたすべてのRANKLの酵素切断部位を含む細胞外ドメイン (VGQRFGAPAMMEG) をCRISPR/CAS9法によって欠失させたマウスである<sup>33,54-56</sup> (図4a, b, c)。

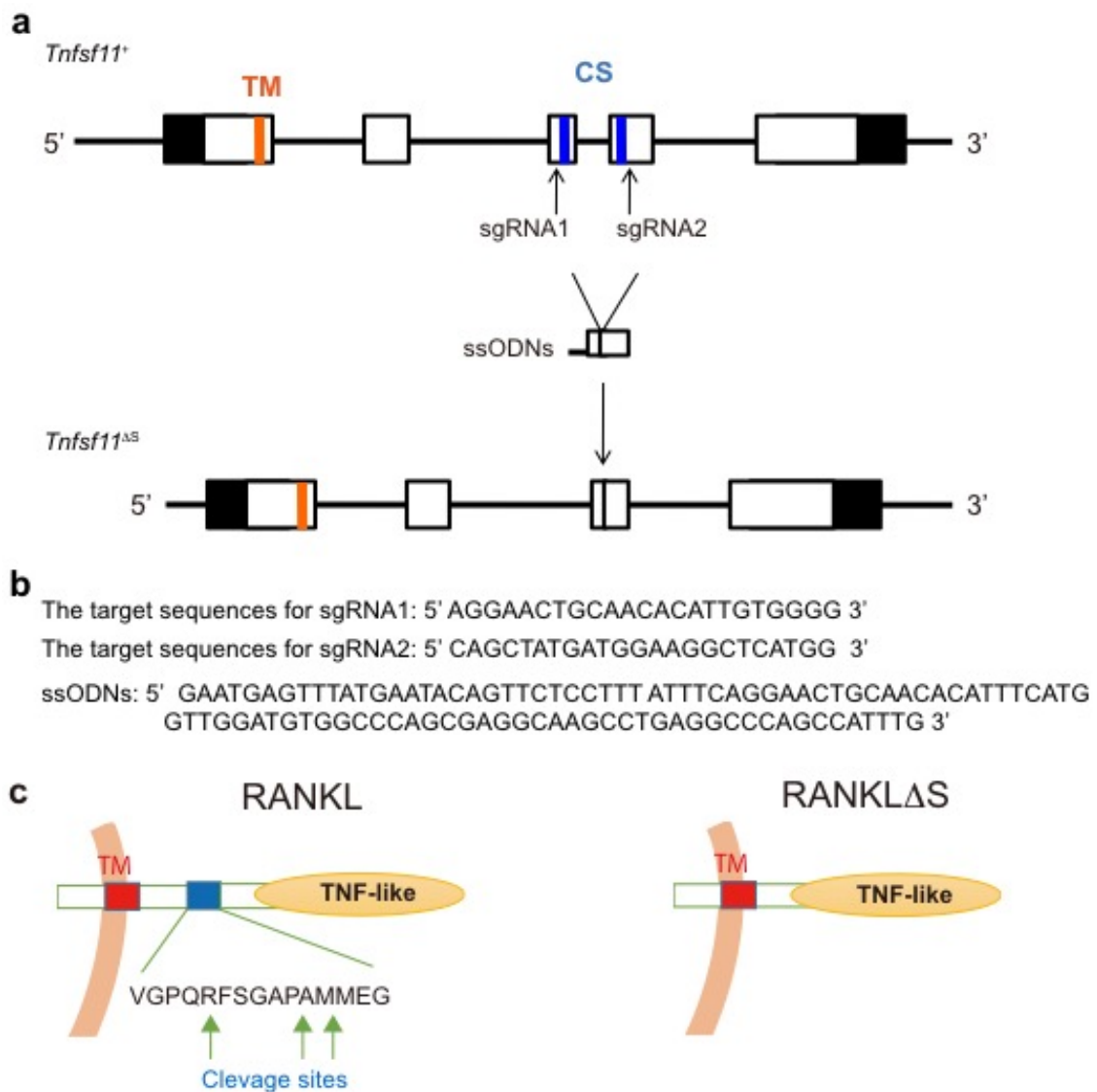


図4 CRISPR/Cas9 法による *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウス作製

(a) *Tnfsf11*<sup>ΔS</sup> アレルの模式図。*Tnfsf11* の酵素切断部位は CRISPR/Cas9 法による相同組み替え修復によって除去される。(b) sgRNA1 と sgRNA2 の target 配列と 1 本鎖オリゴヌクレオチドの配列。(c) 野生型の RANKL (左図) と酵素切断部位が除去された RANKL $\Delta$ S (右図) の模式図。

### 2-3. マウス卵巣摘出骨粗鬆症モデル

9 週齢の雌マウスに対して麻酔下に背部の中央に約 1 cm ほどの縦切開を入れ、切開部より左右の背側筋膜に切開をいれ、卵巣を同定の後に結紮・切除したマウスを卵巣摘出群、筋膜切開のみで卵巣の摘出を行っていないマウスを sham 群とした。手術から 4 週間後に頸椎脱臼を行い屠殺し解析した。卵巣摘出の成否は、解析時の子宮の萎縮を肉眼的に確認することで判別した。

### 2-4. 細胞調製法

#### 2-4-1. リンパ節と胸腺からのリンパ球調製法

鼠径部リンパ節または胸腺を採取し、5 ml 注射シリンジの押し子部分で 100  $\mu$ m メッシュに擦り付け、PBS でフラッシュすることで細胞を回収した。

#### 2-4-2. 胸腺からのストローマ細胞調製法

Liberase TM 0.01%、DNase I 0.01% に調整した RPMI 1640 (Invitrogen) 1 ml に胸腺をいれ、37°C で 15 分間インキュベートした。この際、シリンジを使用し、徐々にバラバラにした。この上清を PBS (2 mM EDTA, 2% FBS) を 3 ml 入れた 15 ml チューブに入れた。酵素処理と回収を計 3 回繰り返す、回収した上清を 3000 rpm で 1 分間遠心し沈殿を回収した。



### **2-4-3. 骨髄からの細胞調製法**

骨髄内腔を PBS でフラッシュし骨髄液を採取した。その後、1500 rpm で5分間遠心し上清を全て除いた後に RBC lysis buffer (Sigma) を用いて溶血処理を行った。

PBS で希釈後、1500 rpm で5分間遠心して細胞を回収した。

### **2-4-4. 新生仔頭蓋冠からの細胞調製法**

生後3日目までのマウス新生仔の頭蓋冠を摘出し細断後、0.1% collagenase (Wako) と0.2% dispase II (Wako) を加えた $\alpha$ -MEM (GIBCO) 5 ml に入れ37°Cで振盪を10分間行い、上清を回収した。振盪と回収を5回繰り返し、回収液を1500 rpm で5分間遠心して細胞を回収した。

## **2-5. 細胞培養法**

### **2-5-1. B16F10 Red-Fluc 細胞の培養法**

B16F10 Red-Fluc 細胞は Perkin Elmer 社より購入した。培地として10% FCS を加えた RPMI 1640 (Invitrogen) を使用した。インキュベーター内、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。

### **2-5-2. E0771-Luc 細胞の培養法**

E0771 細胞は CH3 Biosystems 社より購入した。E0771 細胞に Luciferase 遺伝子と

EGFP 遺伝子をトランスフェクションし継代後、EGFP 陽性細胞を FACS aria (BD) を用いてソーティングし E0771-Luc 細胞とした。培地として 10% FCS と 1% HEPES (GIBCO) を加えた RPMI 1640 (Invitrogen) を使用した。インキュベーター内、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。

### 2-5-3. 共存培養による破骨細胞分化誘導

2-4-3 の方法で採取したマウス骨髄細胞と 2-4-4 の方法で採取したマウス新生仔頭蓋冠細胞を 10 nM 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Wako) と 1 μM PGE<sub>2</sub> (Cayman Chemical) で刺激し 7 日間培養し破骨細胞分化を誘導した。

### 2-5-4. 抗 CD3 抗体による胸腺細胞刺激

2-4-1 の方法で採取したマウス胸腺細胞を 10 μg ml<sup>-1</sup> 抗 CD3 抗体でコーティングされた 48 ウェルプレート (BioLegend, 145-2C11) で刺激し 48 時間培養した。

## 2-6. がん転移モデル

### 2-6-1. がん細胞左心室注入方法

8-10 週齢のマウスに対して麻酔下に腫瘍細胞を左心室に注入した。左心室注入の成否は穿刺時及び注入直後にシリンジ内に動脈性の血液の逆流があることで確認した。B16F10 Red-Fluc 細胞は 5 x 10<sup>5</sup> 個を PBS 200 μl に懸濁して注入し、注入後 4

日目、8日目、12日目に *in vivo* imaging を行い12日目の imaging の後に屠殺し解析した。E0771-Luc 細胞は  $1 \times 10^6$  個を PBS 200  $\mu$ l に懸濁して注入し、注入後14日目に屠殺し解析した。

### **2-6-2. *in vivo* bioluminescence imaging によるがん細胞転移の観察**

B16F10 Red-Fluc 細胞を左心室に注入したマウスを注入後4日目、8日目、12日目に NightOWL LB981 (Berthold Technologies) を用いて全身の発光を測定した。測定前に D-Luciferin potassium salt (Promega) を PBS 200  $\mu$ l に溶解し腹腔内に注入した。検出した発光シグナルは IndiGO software (Berthold Technologies) を用いて解析した。

### **2-6-3. *ex vivo* bioluminescence imaging によるがん細胞転移の観察**

B16F10 Red-Fluc 細胞を注入したマウスは注入後12日目に、E0771-Luc 細胞を注入したマウスは注入後14日目に D-Luciferin potassium salt (Promega) 2.5 mg を PBS 200  $\mu$ l に溶解し腹腔内に注入した後に速やかに頸椎脱臼にて屠殺した。屠殺後速やかに、上下肢と副腎、卵巣を摘出し冷 PBS に浸した。上下肢は肉削ぎを行い、骨が露出するように処理した。上下肢と副腎、卵巣に 12.5 mg/ml に希釈した D-Luciferin potassium salt (Promega) を全体に振りかけ、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) を用いて発光を測定した。上下肢は長管骨を測定範囲とし、副腎、卵巣は臓器全体を測定範囲とした。検出した発光シグナルは MultiGauge (Fuji Film) を用いて解析した。

## 2-7. がん皮下移植モデル

B16F10 Red-Fluc 細胞  $1 \times 10^5$  個を PBS 200  $\mu$ l に懸濁し左側背部に皮下注入した。注入後 4 日目、8 日目、12 日目、16 日目に腫瘍径をノギスを用いて測定した。

腫瘍容積= 長径 x 短径<sup>2</sup> x 1/2

の計算式で腫瘍容積を算出した。

## 2-8. マイクロ CT 解析法

マウスを屠殺後、大腿骨を摘出し 70%エタノールで浸漬固定した。固定した大腿骨を ScanXmate-A100S Scanner (Comscantechno) を用いて CT 撮像し、得られた断面像より TRI/3D-BON software (RATOC) を用いて三次元画像を再構築し、解析パラメーターを算出した。

## 2-9. 組織学的解析法

### 2-9-1. パラフィン切片作製法

マウスを頸椎脱臼法により屠殺後、大腿骨、脛骨を摘出し、4% パラホルムアルデヒド (PFA) で一晩浸漬固定した。固定した組織を脱灰液 (OSTEOSOFT, Merck Millipore) 中で 3 週間脱灰した。脱灰した組織は全自動密閉式ティッシュプロセッ

サー (Leica) を用いて脱水、脱脂、パラフィン浸透し、パラフィン包埋装置 (Leica) により包埋した。作成したブロックをマイクロトーム (Leica) により厚さ 7  $\mu\text{m}$  の切片に薄切し、42°Cの温水上で伸展した後、スライドガラス (松浪硝子工業) 上に回収し、約 40°Cで一晩静置し、乾燥、伸展、接着した

## **2-9-2. パラフィン切片染色法**

キシレン 5 分間 x 3 回、100% エタノール 30 秒間 x 2 回、99.5% エタノール 30 秒間、95% エタノール 30 秒間、90% エタノール 30 秒間、80% エタノール 30 秒間、70% エタノール 30 秒間、の順に染色前の脱パラフィン処理を行った。

### **2-9-2-1. HE 染色**

脱パラフィンした切片をマイヤーヘマトキシリン液 (武藤化学) に 5 分間浸漬した後に 30 分間流水で洗浄し、30 秒間エオジン液 (和光) に浸漬した。その後、脱パラフィンの逆の手順で透徹し、封入剤 (マルチマウント 480、松浪硝子工業) とカバーガラス (松浪硝子工業) により封入した。各サンプル毎に、3 枚ずつ切片の腫瘍面積を測定し平均化して算出した。計測は BZ-II Analyzer (Keyence) を用いた。

### **2-9-2-2. TRAP 染色**

染色には用時調整した TRAP 染色液を用いた。切片を 3 分間洗浄後、TRAP

染色液に 1 時間浸漬、染色した後、純水で洗浄した。その後、ヘマトキシリンに数秒浸漬し対比染色を行った。流水中で 30 分洗浄した後、脱パラフィンの逆の手順で透徹し、封入剤 (マルチマウント 480、松浪硝子工業) とカバーガラス (松浪硝子工業) により封入した。TRAP 陽性で 3 核以上の多核巨細胞を破骨細胞とし腫瘍/骨境界面あたりの破骨細胞数を測定した。計測は BZ-II Analyzer (Keyence) を用いた。

### 2-9-3. 凍結切片作製法

採取した鼠径部リンパ節と胸腺は 4% パラホルムアルデヒド溶液に一晩浸漬させ翌日に PBS に置換した。次に 30% スクロース溶液に一晩浸漬させ翌日に OCT compound (Sakura Finetek) で包埋し、液体窒素で急速凍結し凍結ブロックを作成した。凍結ブロックは 5  $\mu\text{m}$  の厚さに Cryostat (Leica) を用いて薄切した。

### 2-9-4. 蛍光抗体染色法

リンパ節と胸腺は 2-7-3 の手法で凍結ブロックから切片を作製し、それぞれ下記の抗体等を用いて染色し BZ-9000 fluorescent microscope (Keyence) を使用して撮影した。B220 (Biolegend, RA3-6B2), CD3  $\epsilon$  (BD Bioscience, 500A2), Armenian hamster IgG secondary antibody (eBioscience, 12-4112-83), DAPI (Molecular Probes), Aire (eBioscience, 5H12), keratin 14 (Covance)を使用した。

## 2-10. フローサイトメトリー法

調製した細胞に対して、解析終了まで全ての手順を 4°Cにて行った。試薬の希釈や細胞の洗浄には FACS バッファー (4% FBS、PBS) を用い、洗浄は2回ずつ行った。細胞を 96 ウェルプレートに1 ウェルあたり  $1.0 \times 10^6$  個以下の個数分取し、洗浄後、1/100 に希釈した抗 CD16/32 抗体 (93、BioLegend) 40  $\mu$ l を添加し、10 分間ブロッキングした。1/50 に希釈した抗体溶液を 10  $\mu$ l 添加し、遮光状態で 30 分間反応させた。二次抗体や蛍光標識ストレプトアビジンを用いた多段階の染色を行った際には、洗浄後 1/100 に希釈した抗体溶液を 20 分間反応させた。

染色した検体からは、LSR Fortessa (BD Bioscience)を用いてデータを取得し、FlowJo ソフトウェア (TREE STAR) によって解析を行った。

<フローサイトメトリー法で用いた抗体等>

T cell receptor- $\beta$  (BioLegend H57-597), CD4 (BioLegend GK1.5), CD8  $\alpha$  (BioLegend 53-6.7), CD45R/B220 (BioLegend RA3-6B2), CD45 (BioLegend 30-F11), EpCAM (BioLegend G8.8), Ly51 (BioLegend 6C3), Aire (eBioscience 5H12), RANKL-Biotin (eBioscience IK22/5), UEA1 (Vector Laboratories), GST-RANKL-Biotin (オリエンタル酵母), GST-Biotin (オリエンタル酵母), Streptavidin (eBioscience)

## **2-11. ELISA 法**

### **2-11-1. 可溶型 RANKL の ELISA 法**

可溶型 RANKL は全て RANKL ELISA キット (R&D) に添付のプロトコールに則り測定した。

#### **2-11-1-1. 血清の調製方法**

採血後、氷上で 30 分静置し、その後 7000 rpm で 5 分間遠心した上清を 2 倍に希釈して測定した。

#### **2-11-1-2. 骨髓液の調製方法**

大腿骨の内腔を 100  $\mu$ l の PBS でフラッシュし骨髓液を採取した。その後、1500 rpm で 5 分間遠心し上清を希釈せずに測定した。

#### **2-11-1-3. 培養上清の調製方法**

回収した培養上清を 7000 rpm で 5 分間遠心し上清を希釈せずに測定した。

#### **2-11-1-4. 胸腺組織液の調製方法**

採取した胸腺を磨り潰し 1 ml の PBS で懸濁後 3000 rpm で 5 分間遠心した。

この上清をさらに 15000 rpm で 1 分間遠心し上清を希釈せずに測定した。

### **2-11-2. OPG の ELISA 法**

Osteoprotegerin ELISA キット (R&D) に添付のプロトコールに則り血清を測定し



た。採血後、氷上で30分静置し、その後7000 rpmで5分間遠心した上清を5倍に希釈し測定した。

## 2-12. 図中の画像データの表示

図中の顕微鏡写真、マイクロCT像、*in vivo* imaging、*ex vivo* imaging、フローサイトメトリー法のドットプロット、ヒストグラムは複数回の実験のうち、典型的な結果を表示した。

## 2-13. 統計解析法

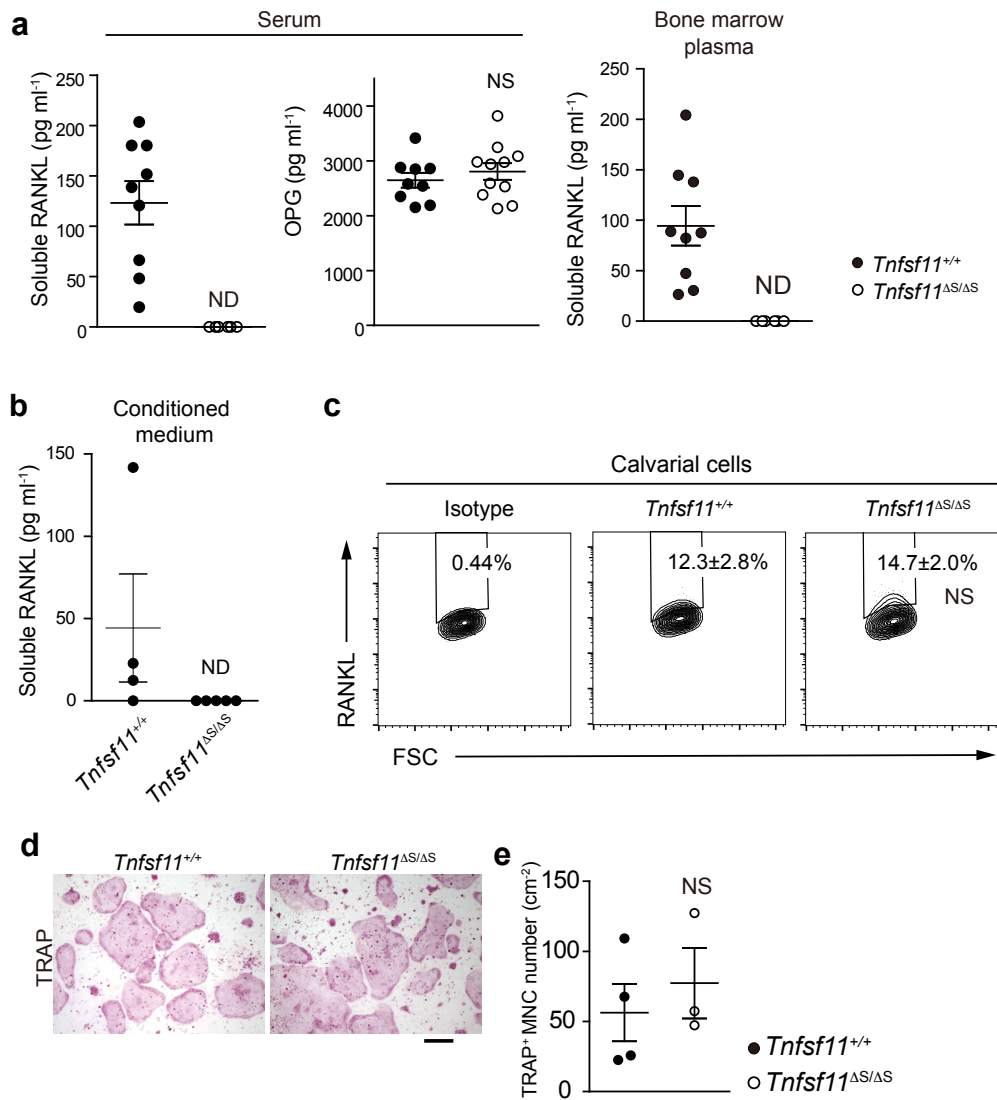
2群間の比較にはStudentのt検定を適用した。多群間の比較に際しては、analysis of variance (ANOVA) 法による多重比較 (Turkey 法)を行なった。解析に適用した検定法はそれぞれの図に示す。P値が0.05未満である場合、統計的に有意な差があると判定した。グラフの\*はP値が0.05未満、\*\*は0.01未満、\*\*\*は0.005未満であることを示し、NSはP値が0.05以上であることを示す。統計解析を行った実験は全て  $n=3$  以上の個体数で行い、データは全て平均値±標準誤差で表した。

## 第三章 結果

### 3-1. *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスでは可溶型 RANKL は完全に欠失している

はじめに *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスでは可溶型 RANKL が完全に欠失しているかを検証した。

*Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの血清中・骨髄液中の可溶型 RANKL を ELISA 法で測定したところ、いずれも検出感度未満であった (図 5a)。同胞コントロールマウス (*Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウス)ではいずれも検出された (図 5a)。また *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの新生仔頭蓋冠由来細胞の培養上清 (VitD<sub>3</sub>+PGE<sub>2</sub>+TNF-α刺激後) でも同様に可溶型 RANKL は検出されなかった (図 5b)。 *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウス新生仔頭蓋冠由来細胞 (VitD<sub>3</sub>+PGE<sub>2</sub>+TNF-α刺激後) の膜結合型 RANKL は *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスと変わらず発現していた (図 5c)。一方で RANKL シグナルを阻害する OPG の血清中の濃度は *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスと *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスとの間に差は認めなかった (図 5a)。また *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスと *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスから採取した新生仔頭蓋冠細胞を、野生型マウスの骨髄から採取した破骨細胞前駆細胞と共培養し破骨細胞の分化を誘導したところ、 *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスと *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの差は認めなかった (図 5d, e)。これらの実験結果から *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスは可溶型 RANKL を完全欠損し、膜結合型 RANKL の発現や OPG の産生は *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスと差がないことが示された。



**図5 可溶性 RANKL、膜結合型 RANKL、破骨細胞分化誘導能の解析**

(a) 6 週齢マウスの可溶性 RANKL と OPG の血清中濃度と骨髄液中の可溶性 RANKL の濃度の測定 (*Tnfsf11*<sup>+/+</sup>, *n* = 9; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>, *n* = 6)。 (b) 刺激後マウス新生仔頭蓋冠細胞培養上清の可溶性 RANKL の測定 (*Tnfsf11*<sup>+/+</sup>, *n* = 4; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>, *n* = 5)。 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、PGE<sub>2</sub>、TNF-αによる刺激を行った後2日目に回収した上清を使用した。 (c) 刺激後マウス新生仔頭蓋冠細胞のフローサイトメトリー法による RANKL 発現の解析(*Tnfsf11*<sup>+/+</sup>, *n* = 5; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>, *n* = 6)。 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、PGE<sub>2</sub>、TNF-αによる刺激を行った後2日目に回収した細胞を使用した。 (d-e) *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスまたは *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウス由来の新生仔頭蓋冠細胞と野生型マウス骨髄由来の破骨細胞前駆細胞を使用した破骨細胞分化誘導実験。 (d) TRAP 染色による成熟破骨細胞の検出。スケールバー 200 μm。 (e) 成熟した破骨細胞数の比較 (*Tnfsf11*<sup>+/+</sup>, *n* = 4; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>, *n* = 3)。 Student の t 検定を適用。 NS は P 値が 0.05 以上であることを示す。 ND は検出感度未満であることを示す。

### 3-2. *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスは大理石骨病を呈さない

*Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスを解析するにあたって、まず骨の表現形を解析した。*Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスは正常な歯牙の萌出と成長を認めた (図 6a, b, c)。6 週齢でのマイクロ CT による大腿骨の解析では *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスは *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスと比較して海綿骨、皮質骨共に骨量の増加を認めず、オスでは骨梁のわずかな減少を認めた (図 7a, b)。脛骨の組織学的な評価では破骨細胞面、破骨細胞数、吸収面には差を認めなかった (図 8a, b)。骨芽細胞面、骨芽細胞数、骨石灰化面といった骨芽細胞パラメーターも *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスと *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスとの間に有意な差は認めなかった (図 8a, b)。これらのことから可溶性 RANKL は骨格の形成や骨のリモデリングには寄与していないことが示された。

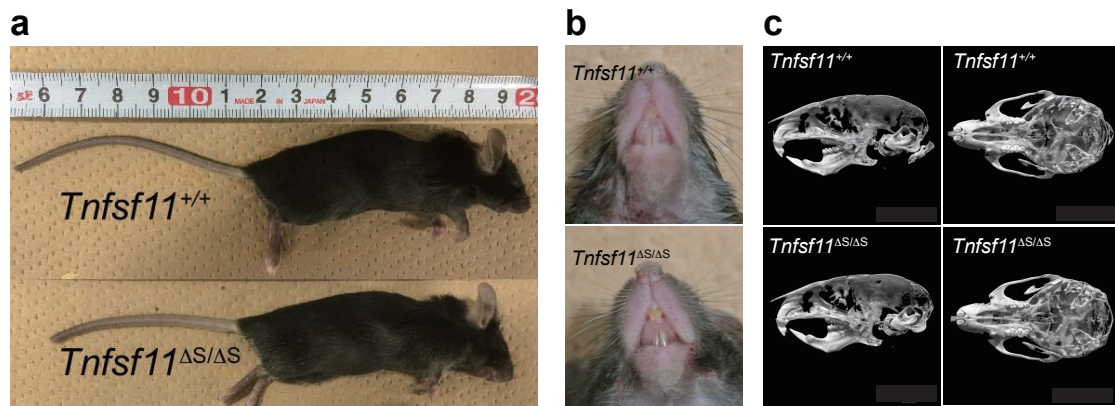


図6 *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスと *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの比較  
 6週齢雌を使用。(a) 体長。(b) 歯牙萌出。(c) 頭部マイクロCT。スケールバー 6mm。

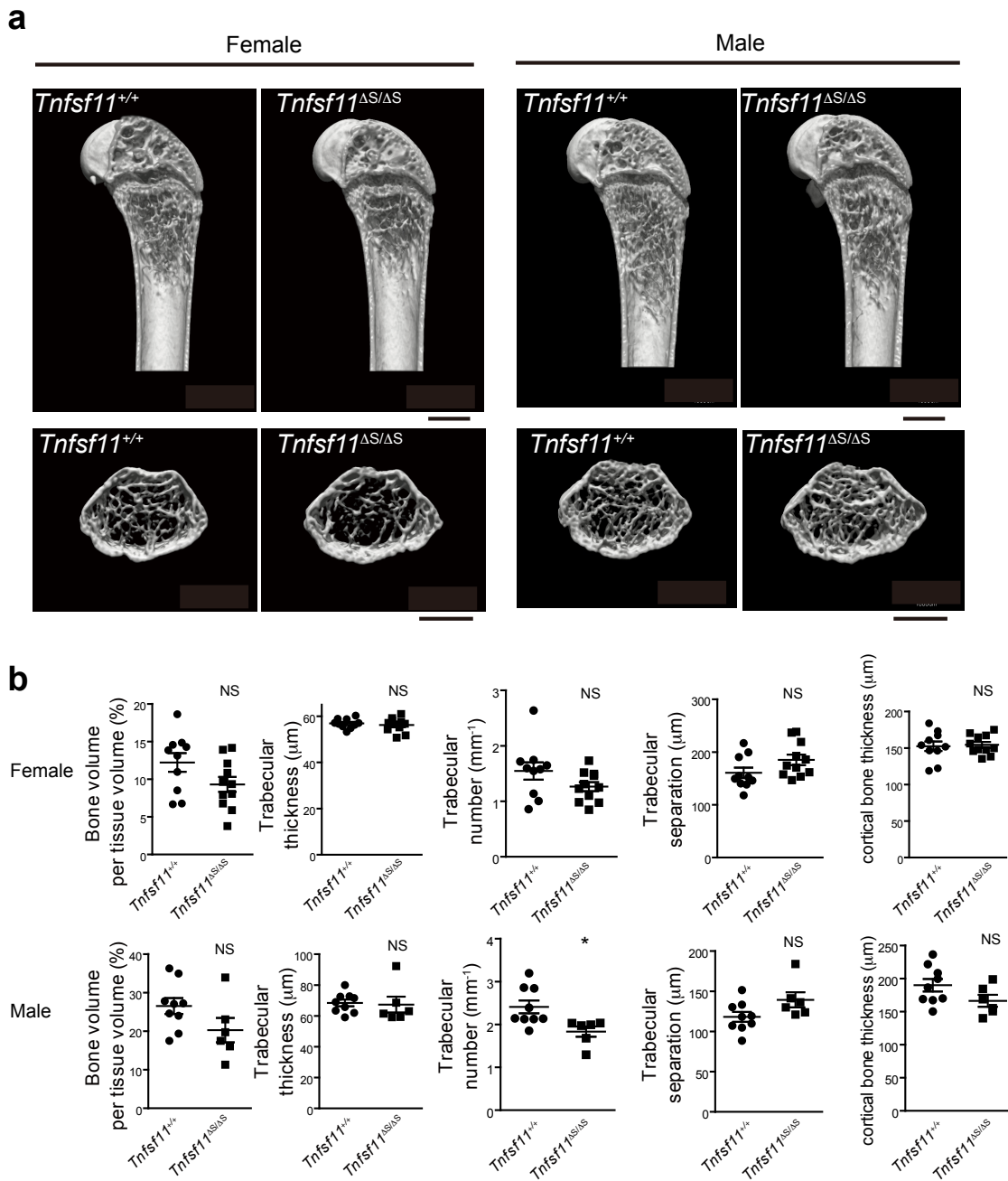


図7 マイクロCTによる  $Tnfsf11^{+/+}$  マウスと  $Tnfsf11^{\Delta S/\Delta S}$  マウスの骨量評価

(a) 左大腿骨のマイクロCT画像。スケールバー 1000  $\mu\text{m}$ 。(b) 大腿骨のマイクロCT計測値の比較。上段：6週齢雌マウス ( $Tnfsf11^{+/+}$ ,  $n=10$ ;  $Tnfsf11^{\Delta S/\Delta S}$ ,  $n=11$ )。下段：6週齢雄マウス ( $Tnfsf11^{+/+}$ ,  $n=9$ ;  $Tnfsf11^{\Delta S/\Delta S}$ ,  $n=6$ )。Studentのt検定を適用。\*はP値が0.05未満であることを示し、NSはP値が0.05以上であることを示す。

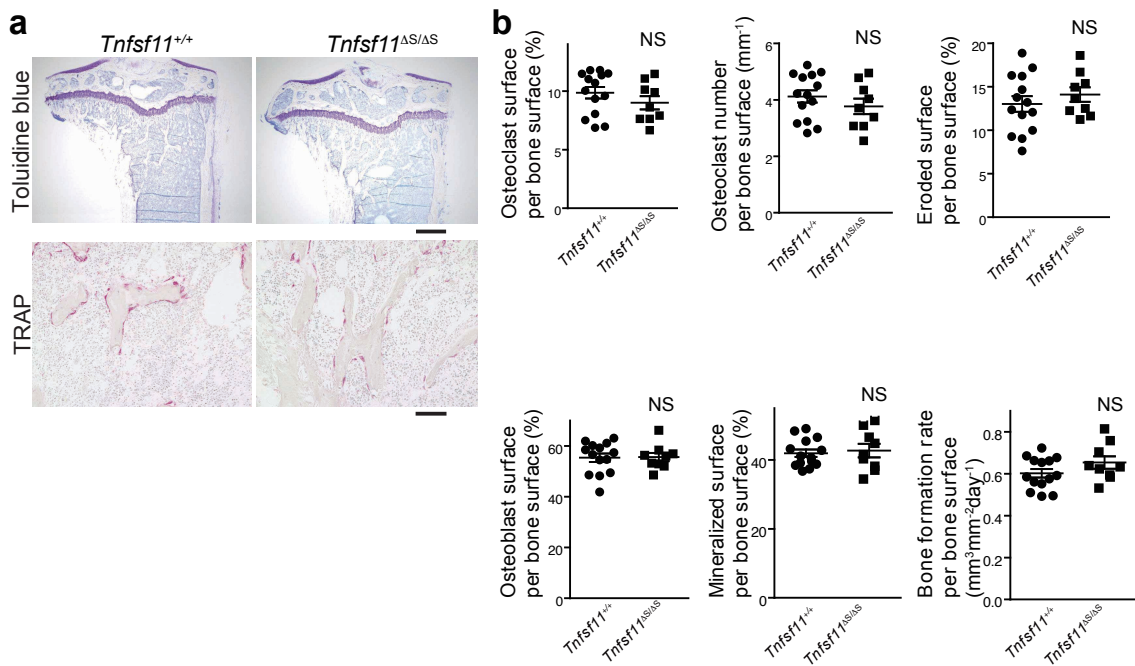


図8 *Tnfsf11<sup>+/+</sup>* マウスと *Tnfsf11<sup>ΔS/ΔS</sup>* マウスの組織学的評価

(a) 6週齢雌マウスの左脛骨近位部の組織学的観察。上段：Toluidine blue染色。スケールバー 500 μm。下段：TRAP染色。スケールバー 100 μm。(b) 左脛骨近位部の組織形態計測値の比較 (*Tnfsf11<sup>+/+</sup>*,  $n = 14$ ; *Tnfsf11<sup>ΔS/ΔS</sup>*,  $n = 9$ )。Student の t 検定を適用。NSはP値が0.05以上であることを示す。

### 3-3. 可溶性 RANKL はリンパ節形成には必須ではない

次に *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスにおけるリンパ節形成を評価した。*Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスでは鼠径部リンパ節 (図 9a) を始め、腋窩リンパ節、頸部リンパ節、腸間膜リンパ節は *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスと変わりなく存在を確認できた。組織学的に *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスのリンパ節を *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスと比較したところ形態の異常は認めず、B 細胞濾胞の構造も正常であった (図 9b)。フローサイトメトリーでは B 細胞、CD4T 細胞、CD8T 細胞の分画の割合も細胞数も *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスと *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスとで有意な差を認めなかった (図 9c, d, e)。これらの結果から可溶性 RANKL はリンパ節形成には必須ではないことが示された。



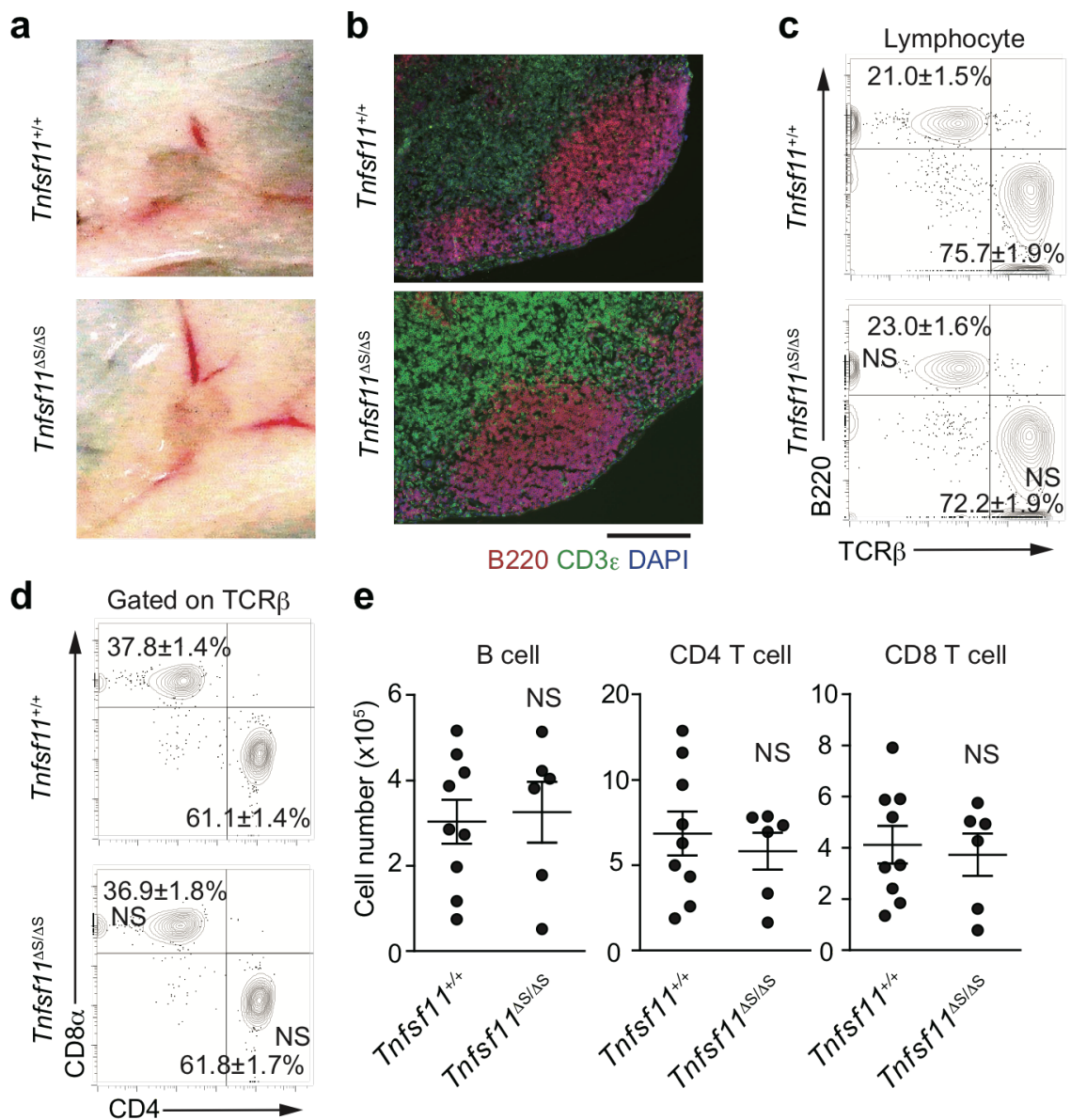


図9 *Tnfsf11<sup>+/+</sup>* マウスと *Tnfsf11<sup>ΔS/ΔS</sup>* マウスのリンパ節形成の解析

(a) 鼠径部リンパ節の肉眼像。(b) 鼠径部リンパ節の蛍光顕微鏡画像。スケールバー 200  $\mu$ m。(c-e) フローサイトメトリー法による鼠径部リンパ節内のリンパ球の解析 (*Tnfsf11<sup>+/+</sup>*,  $n=9$ ; *Tnfsf11<sup>ΔS/ΔS</sup>*,  $n=6$ )。(c) T細胞、B細胞分画の解析。(d) CD4T細胞、CD8T細胞分画の解析。(e) B細胞、CD4T細胞、CD8T細胞数の比較。Studentのt検定を適用。NSはP値が0.05以上であることを示す。

#### 3-4. 可溶性 RANKL は胸腺髄質上皮細胞の分化には必須ではない

続いて胸腺髄質上皮細胞の分化における可溶性 RANKL の関与を検討した。可溶性 RANKL は *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスの胸腺組織上清では検出されるが、*Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの胸腺組織上清では検出されなかった (図 10a)。*Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウス由来の CD4 single positive 胸腺細胞の刺激後培養上清からは可溶性 RANKL が検出されるが、*Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウス由来の培養上清からは検出されなかった (図 10a)。この胸腺細胞の膜結合型 RANKL をフローサイトメトリーで解析すると *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの方がわずかに発現が強く、酵素切断が行われないことによる膜結合型 RANKL の蓄積の可能性があると考えられた (図 10b)。胸腺細胞のフローサイトメトリーによる解析では CD4、CD8 発現の分画に *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスと *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスの差は認めなかった (図 10c)。胸腺の組織学的な観察では *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスと *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスとの間に Aire 陽性の胸腺髄質上皮細胞の局在に差は認めなかった (図 10d)。さらにフローサイトメトリーによる胸腺上皮の解析でも、Aire 陽性の胸腺髄質上皮細胞の頻度、細胞数ともに *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスと *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスとの間に有意差は認めなかった (図 10e, f)。これらの実験結果から、Aire 陽性の胸腺上皮髄質上皮細胞の分化には可溶性 RANKL は必須ではないことが示された。

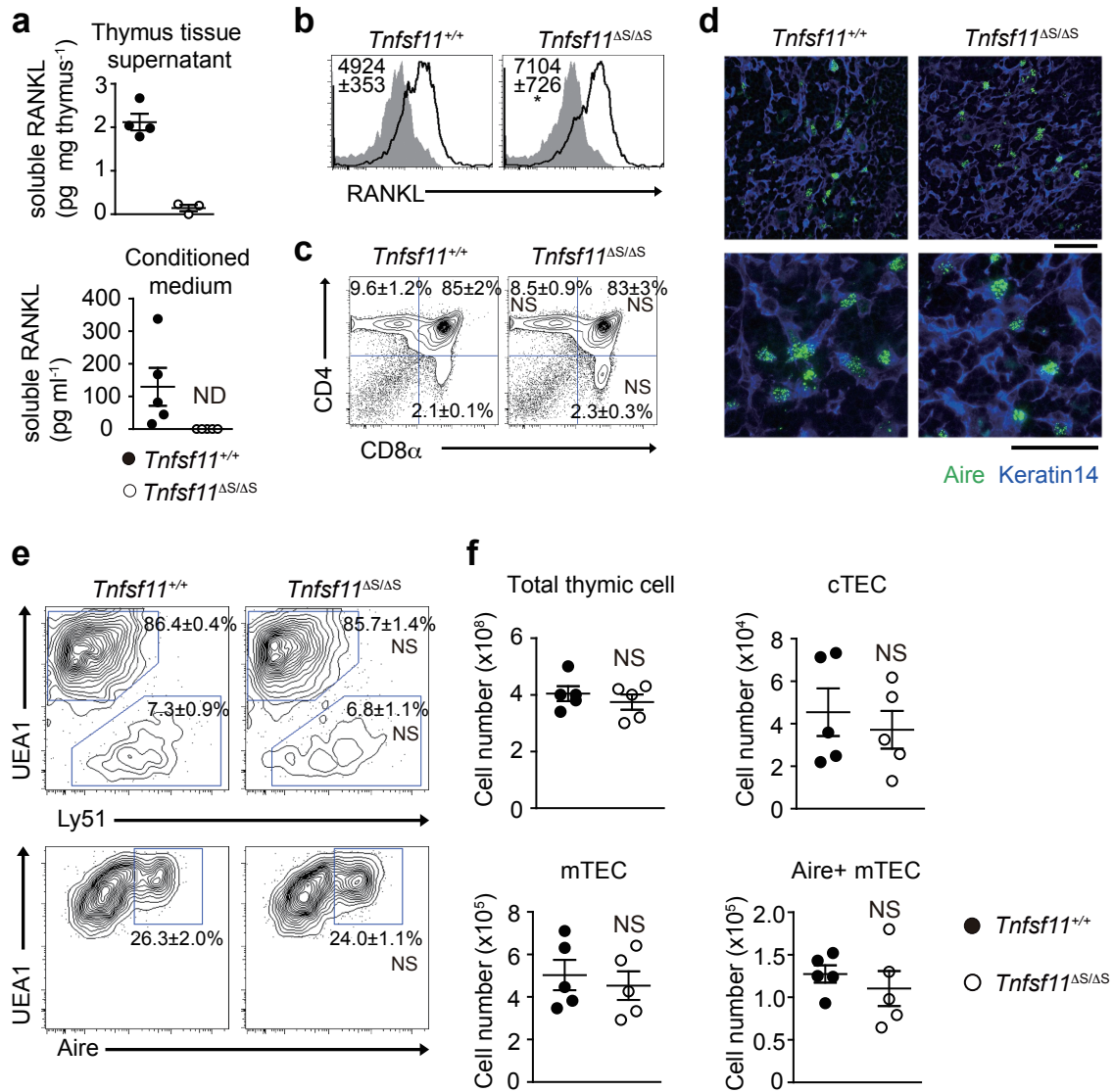


図10 *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスと *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの胸腺の解析

4-6 週齢のマウスを解析した。(a) 上段：胸腺組織細胞破碎液上清の可溶性 RANKL 濃度 (*Tnfsf11*<sup>+/+</sup>, n = 4; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>, n = 3)。下段：抗 CD3 刺激胸腺細胞培養上清の可溶性 RANKL 濃度 (*Tnfsf11*<sup>+/+</sup>, n = 5; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>, n = 5)。 (b) 抗 CD3 刺激後の CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 胸腺細胞のフローサイトメトリー解析 (*Tnfsf11*<sup>+/+</sup>, n = 7; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>, n = 6)。 (c) フローサイトメトリーによる胸腺細胞の CD4、CD8 プロファイルの解析 (*Tnfsf11*<sup>+/+</sup>, n = 5; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>, n = 5) (d) *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスと *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの胸腺の組織学的評価。スケールバー 50 μm。 (e) フローサイトメトリーによる胸腺上皮細胞の解析 (*Tnfsf11*<sup>+/+</sup>, n = 5; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>, n = 5)。 (f) 胸腺中の胸腺髄質上皮細胞、胸腺皮質細胞上皮細胞、Aire 陽性胸腺髄質上皮細胞の細胞数 (*Tnfsf11*<sup>+/+</sup>, n = 5; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>, n = 5)。 Student の t 検定を適用。\*は P 値が 0.05 未満であることを示し、NS は P 値が 0.05 以上であることを示す。 ND は検出感度未満であることを示す。

### 3-5. 可溶性 RANKL の欠損は骨髄中の B 細胞分化には影響しない

可溶性 RANKL 欠損が B 細胞分化に影響するかを確認するため、*Tnfrsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの骨髄中の B 細胞分化を調べた。骨髄中の Pre/Pro B 細胞 (B220<sup>+</sup>, IgM<sup>-</sup>)、未成熟 B 細胞 (B220<sup>lo</sup>, IgM<sup>+</sup>)、成熟 B 細胞 (B220<sup>hi</sup>, IgM<sup>+</sup>) は、*Tnfrsf11*<sup>+/+</sup> マウスと *Tnfrsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの間で有意な差を認めなかった (図 11a, b)。この結果から可溶性 RANKL の欠損は骨髄中の B 細胞分化には影響しないことが示された。

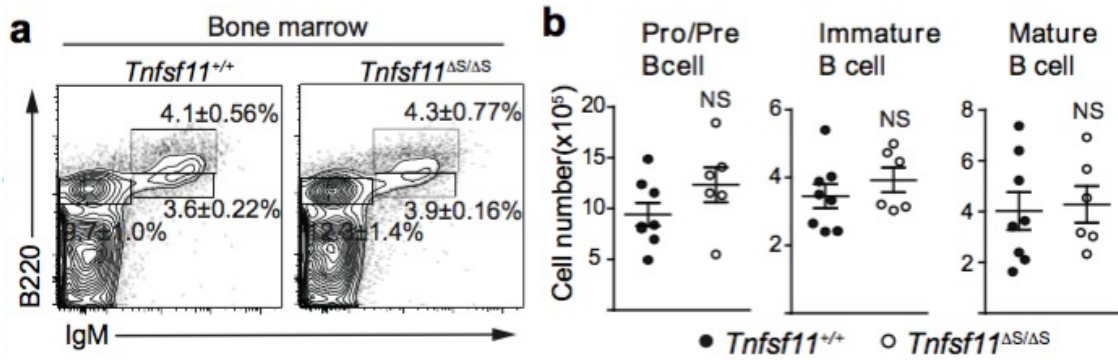


図 11 *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスと *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの骨髄中 B 細胞分化の解析

6 週齢のマウスを解析した。(a) フローサイトメトリーによる骨髄細胞の B 細胞系列の分画 (*Tnfsf11*<sup>+/+</sup>,  $n=9$ ; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>,  $n=6$ )。(b) 骨髄中 Pro/Pre B 細胞、未成熟 B 細胞、成熟 B 細胞の細胞数 (*Tnfsf11*<sup>+/+</sup>,  $n=9$ ; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>,  $n=6$ )。Student の t 検定を適用。NS は P 値が 0.05 以上であることを示す。

### 3-6. 可溶型 RANKL は妊娠時の乳腺発達には影響しない

*Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの妊孕性と妊娠時の乳腺発達を評価するために *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウス同士を交配したところ、妊娠、出産、出産後の授乳は正常であり、仔は問題なく成体まで成長した。従って可溶型 RANKL は妊孕性や妊娠時の乳腺発達には影響しないことが判明した。

### 3-7. 可溶型 RANKL は卵巣摘出モデルによる骨量の減少には影響しない

次に閉経後骨粗鬆症モデルである卵巣摘出マウスを用いて、破骨細胞分化の病的な活性化における可溶型 RANKL の関与を調べた。野生型マウスでは卵巣摘出によって血清中の可溶型 RANKL が上昇していた (図 12a)。 *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスでは卵巣摘出術後でも血清中の可溶型 RANKL が検出されないことを確認した (図 12a)。しかし *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスと *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスでは卵巣摘出後の骨量の減少は同程度であった (図 12b, c)。従って、エストロゲンの低下による骨粗鬆症には可溶型 RANKL の影響は少ないことが分かった。

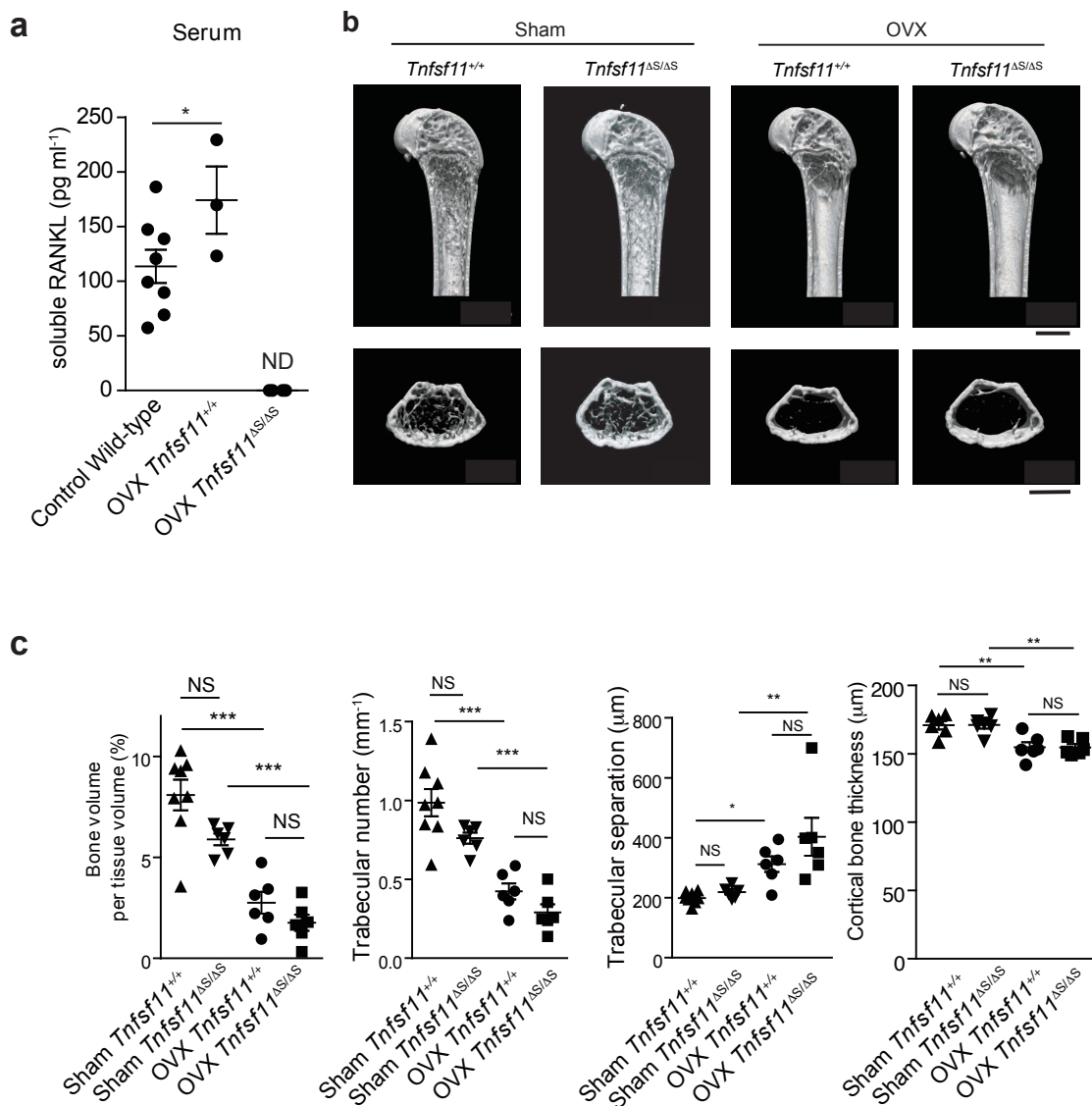


図 12 卵巣摘出骨粗鬆症モデルの骨量評価

(a) 血清中RANKL濃度 (Control wild-type,  $n = 8$ ; OVX *Tnfsf11*<sup>+/+</sup>,  $n = 3$ ; OVX *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>,  $n = 4$ )。Student の t 検定を適用。\*は P 値が 0.05 未満であることを示す。ND は検出感度未満であることを示す。(b) 卵巣摘出マウスと sham 術後マウスの大腿骨マイクロ CT 像。スケールバー 2mm。(c) 卵巣摘出マウス (*Tnfsf11*<sup>+/+</sup>,  $n = 6$ ; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>,  $n = 6$ ) と sham 術後マウス (*Tnfsf11*<sup>+/+</sup>,  $n = 8$ ; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>,  $n = 6$ ) の大腿骨マイクロ CT 解析による骨量、海綿骨計測値、皮質骨計測値の比較。analysis of variance (ANOVA) 法による多重比較 (Turkey 法) を適用。\*は P 値が 0.05 未満、\*\*は 0.01 未満、\*\*\*は 0.005 未満であることを示し、NS は P 値が 0.05 以上であることを示す。

### 3-8. 可溶性 RANKL はがん細胞に対する走化性因子として機能し骨転移を誘導する

乳がん、前立腺がん、肺がん、メラノーマは骨に高頻度に転移をする<sup>47,86-88</sup>。このうち乳がんや肺がんは溶骨性骨転移の頻度が高く、前立腺がんは造骨性骨転移の頻度が高い。溶骨性骨転移は、腫瘍細胞によって誘導された RANKL が破骨細胞による骨吸収を促進し、腫瘍増大のスペースと分解された骨基質由来の増殖因子によってさらに腫瘍の増大を促すことで進展する<sup>47</sup>。この腫瘍増大の悪循環は vicious cycle と称される。vicious cycle の機序とは別に可溶性 RANKL が腫瘍の遊走を直接的に誘導することが報告されている<sup>48</sup>。先行研究では *in vitro* での可溶性 RANKL の濃度勾配による腫瘍細胞の遊走は示されているが、*in vivo* での可溶性 RANKL の関与を示すデータは示されていなかった。そこで *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスを使用して可溶性 RANKL が直接的に骨転移を誘導するかを検証した。

#### 3-8-1. B16F10 Red-Fluc メラノーマ細胞を使用した検証

可溶性 RANKL の骨転移への関与の検証を行うにあたり、B16F10 メラノーマ細胞を使用することにした。B16F10 細胞は既に先行研究で RANK が発現していること、さらにリコンビナント RANKL への走化性を示されている<sup>48</sup>。また B16F10 細胞は骨破壊を伴わない骨梁間型骨転移を生じるため、腫瘍細胞に対する生体での走化性を評価することが可能である。*in vivo imaging* によって腫瘍転移を経時的かつ定



量的に評価するために Luciferase 遺伝子を導入した B16F10 Red-Fluc 細胞を使用した。*in vivo imaging* では腫瘍移入後 8 日目の *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの骨転移部の発光が野生型マウスと比較して明らかに減弱していた (図 13a, b)。腫瘍移入後 12 日目に屠殺し長管骨への転移を *ex vivo imaging* で定量的に評価し、脊椎への転移は肉眼的に計数し定量的に評価した (図 13c, d, e, f)。その結果、長管骨、脊椎に対する骨転移は *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスで有意に抑制されていた。この結果に一致して組織学的な評価でも腫瘍転移は *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスでは抑制されていた (図 13g, h)。マイクロ CT による解析では B16F10 Red-Fluc 細胞の転移部に溶骨性変化は認めなかった<sup>48,89</sup> (図 14)。また野生型マウスと *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの腫瘍転移部の破骨細胞数は同程度であった (図 15a, b)。B16F10 は高頻度に副腎と卵巣に転移することが知られている<sup>48</sup>。*ex vivo imaging* で腫瘍容積を定量化し比較したところ副腎、卵巣ともに野生型マウスと *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスとの間で有意差は認めなかった (図 16a, b)。可溶性 RANKL の腫瘍細胞増殖に対する直接的な影響を検証するために、B16F10 Red-Fluc 細胞を皮下移植し腫瘍容積を経時的に計測し比較した。その結果、皮下移植モデルでは野生型マウスと *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの腫瘍容積には差を認めなかった (図 16c, d)。これらの結果から可溶性 RANKL は骨に特異的に転移を誘導し、一方で原発腫瘍の増大や骨以外の臓器への転移に対する影響は乏しいことが示された。

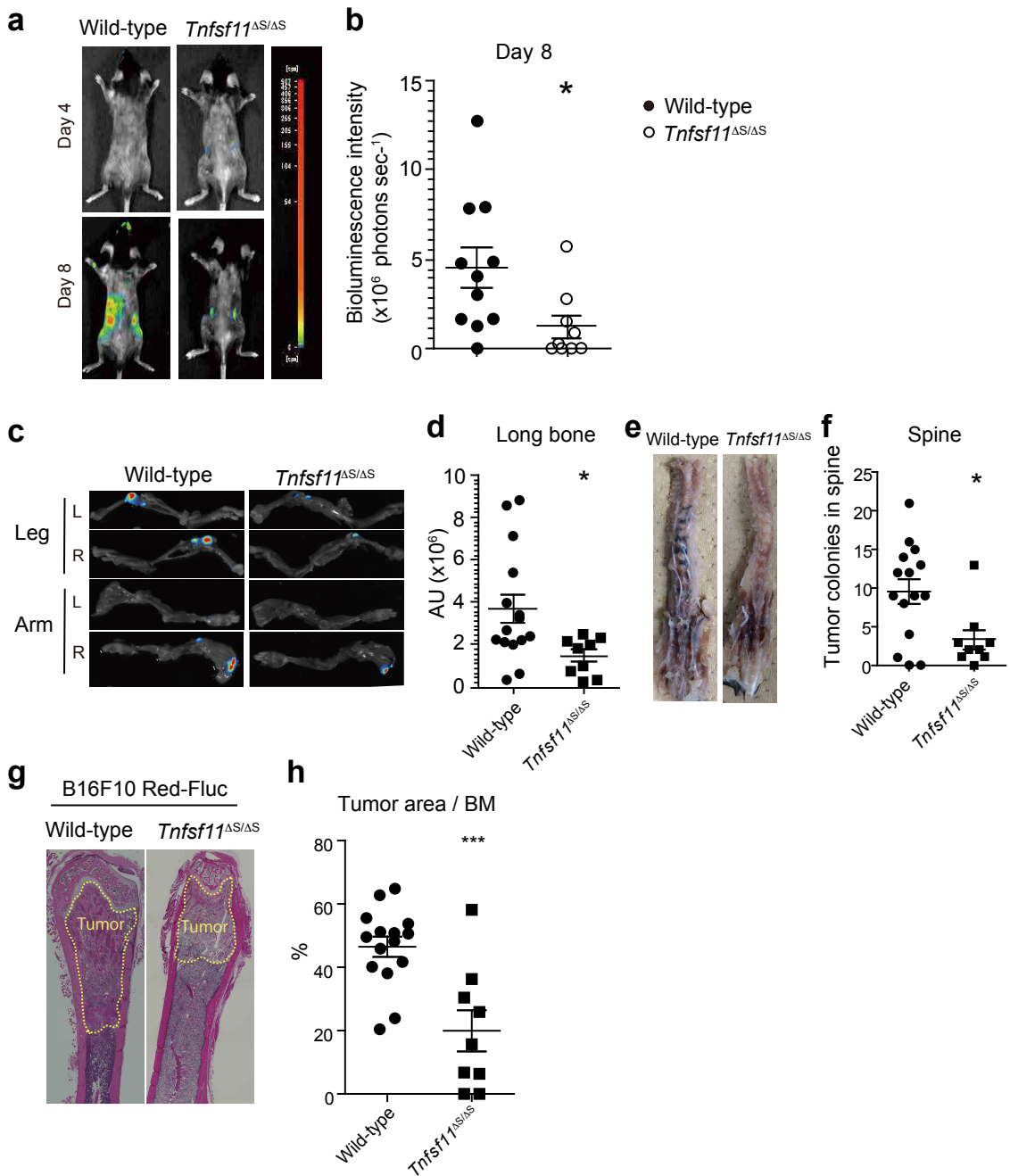


図13 *Tnfsf11*<sup>AS/AS</sup> マウスではB16F10 Red-Flucメラノーマ細胞の骨転移が抑制される。

(a) B16F10 Red-Fluc 細胞左心室投与後4日目、8日目の *in vivo* imaging 像。(b) B16F10 Red-Fluc 細胞左心室投与後8日目の *in vivo* imaging の定量的比較 (wild-type,  $n = 11$ ; *Tnfsf11*<sup>AS/AS</sup>,  $n = 9$ )。 (c) B16F10 Red-Fluc 細胞左心室投与後12日目の四肢長管骨の *ex vivo* imaging 像。(d) B16F10 Red-Fluc 細胞左心室投与後12日目の四肢長管骨の *ex vivo* imaging の定量的比較。1匹ごとに四肢長管骨のシグナルを合計して算出している (wild-type,  $n = 15$ ; *Tnfsf11*<sup>AS/AS</sup>,  $n = 9$ )。 (e) B16F10 Red-Fluc 細胞左心室投与後12日目の

脊椎の肉眼像。B16F10 Red-Fluc 細胞の転移部位は黒色になっており肉眼的に判別できる。(f) B16F10 Red-Fluc 細胞左心室投与後 12 日目の脊椎の B16F10 Red-Fluc 細胞転移を目視で算定して比較した (wild-type,  $n = 15$ ;  $Tnfsf11^{\Delta S/\Delta S}$ ,  $n = 9$ )。 (g) B16F10 Red-Fluc 細胞左心室投与後 12 日目の大腿骨の HE 染色像。黄色破線内は腫瘍存在部位を示す。(h) B16F10 Red-Fluc 細胞左心室投与後 12 日目の大腿骨骨髓内の腫瘍占有率の比較 (wild-type,  $n = 15$ ;  $Tnfsf11^{\Delta S/\Delta S}$ ,  $n = 9$ )。Student の t 検定を適用。\*は P 値が 0.05 未満、\*\*は 0.01 未満、\*\*\*は 0.005 未満であることを示し、NS は P 値が 0.05 以上であることを示す。

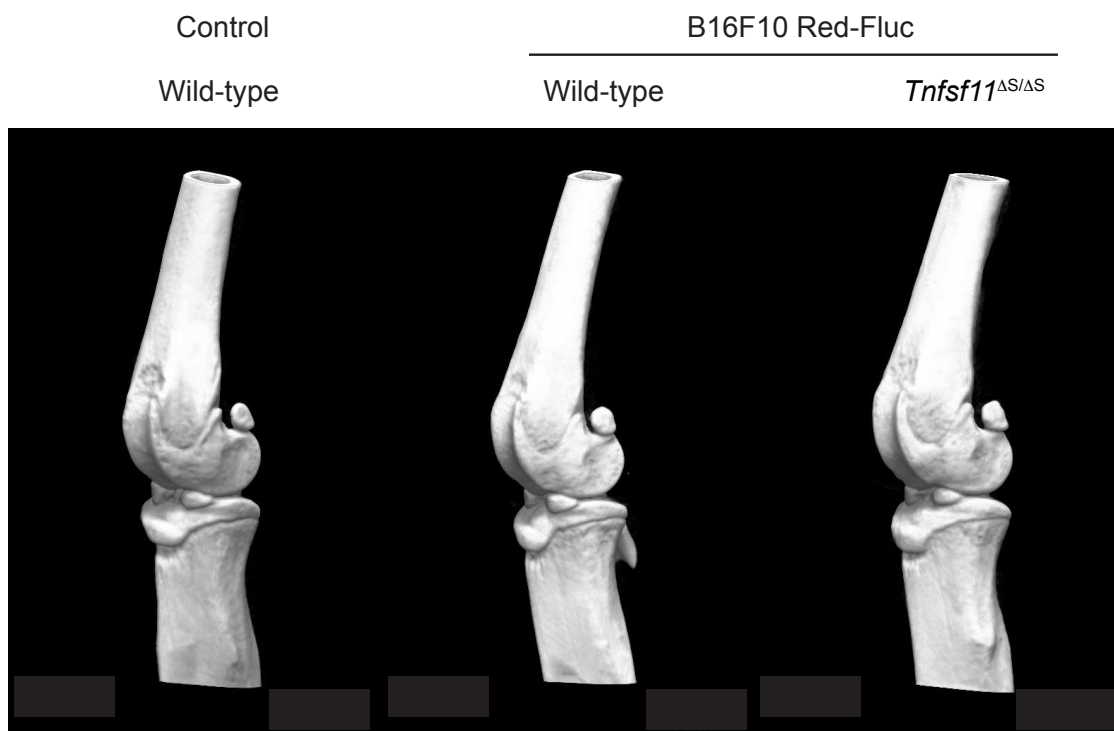
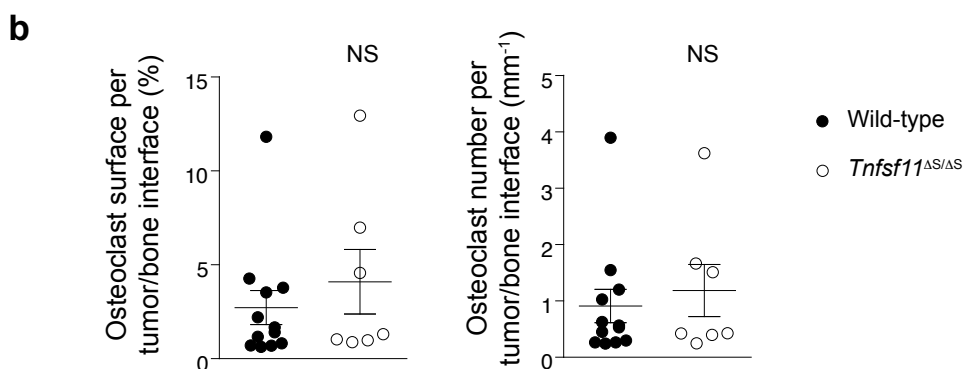
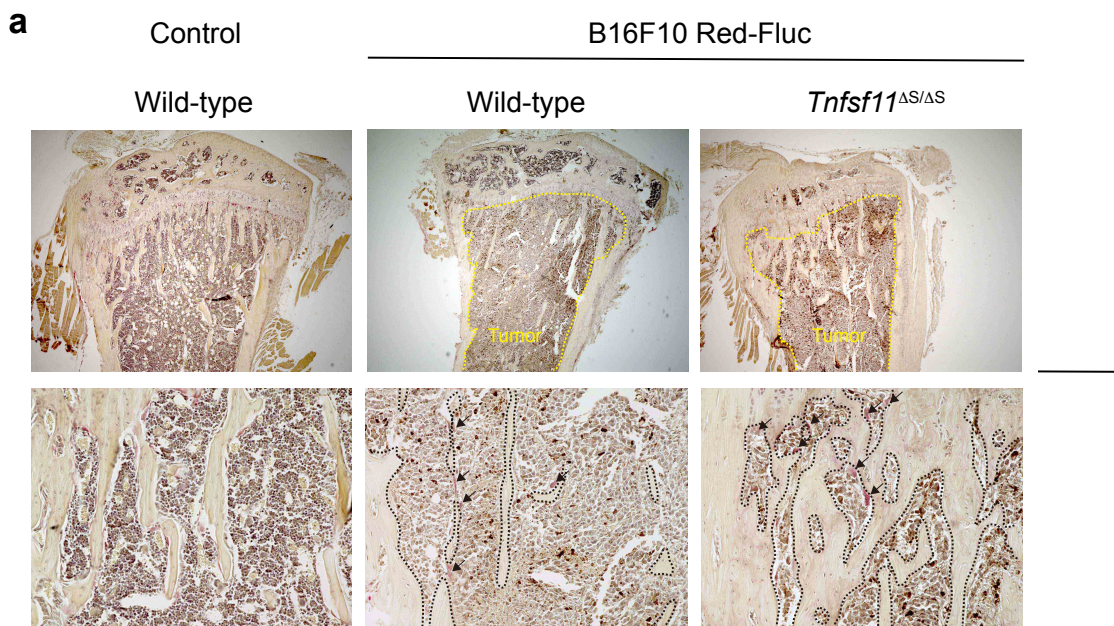


図 14 B16F10 Red-Fluc 細胞骨転移部位のマイクロ CT

B16F10 Red-Fluc 細胞左心室注入後 12 日目の右膝関節周囲のマイクロ CT 像。スケールバー 2mm。



**図 15 B16F10 Red-Fluc 細胞骨転移部の TRAP 染色と破骨細胞数の比較**

(a) B16F10 Red-Fluc 細胞投与後 12 日目の脛骨近位部の TRAP 染色。上段の黄色破線内に腫瘍が存在する。下段の黒色破線は腫瘍/骨の境界部。スケールバー 上段: 1000  $\mu\text{m}$ 、下段: 200  $\mu\text{m}$ 。(b) 腫瘍/骨の境界部に局在する破骨細胞表面積と破骨細胞数の比較 (wild-type,  $n = 12$ ; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>,  $n = 7$ )。Student の t 検定を適用。NS は P 値が 0.05 以上であることを示す。

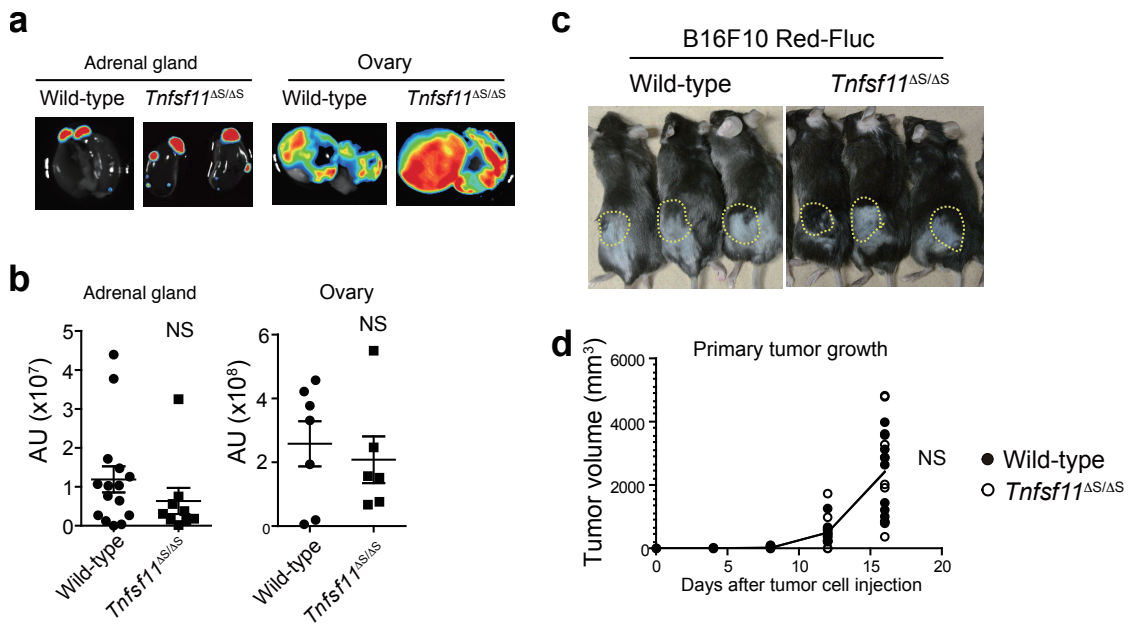


図 16 野生型マウスと *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの B16F10 Red-Fluc 細胞の副腎、卵巣への転移と皮下投与モデル

(a) B16F10 Red-Fluc 細胞左心室投与後 12 日目の副腎と卵巣の *ex vivo* imaging 像。(b) B16F10 Red-Fluc 細胞左心室投与後 12 日目の副腎 (wild-type,  $n = 15$ ; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>,  $n = 9$ ) と卵巣 (wild-type,  $n = 7$ ; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>,  $n = 6$ ) の *ex vivo* imaging の定量的比較。(c) B16F10 Red-Fluc 細胞皮下移植後 16 日目のマウス肉眼像。黄色破線内に腫瘍性隆起あり。(d) B16F10 Red-Fluc 細胞皮下移植後の腫瘍体積の時系列 (wild-type,  $n = 10$ ; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>,  $n = 9$ )。Student の t 検定を適用。NS は P 値が 0.05 以上であることを示す。

### 3-8-2. E0771-Luc 乳がん細胞を使用した検証

B16F10 細胞による骨転移は実験モデルとして広く汎用されている一方で、ヒトにおいては乳がんや前立腺がんに比べるとメラノーマの骨転移の頻度は低い<sup>46</sup>。そこで次に乳がんの骨転移における可溶性 RANKL の関与を検討するために、E0771 乳がん細胞を用いた骨転移モデルを実施した<sup>90</sup>。腫瘍容積の定量化を容易にするために Luciferase 遺伝子を導入した E0770-Luc 細胞を作製し使用した。E0771-Luc 細胞は B16F10 細胞や MDA-MB-231 といった骨転移モデルとして広く用いられている他の Luciferase 遺伝子導入腫瘍細胞と発光が同程度であることを *in vitro* の実験で確認した (図 17)。また B16F10 Red-Fluc 細胞と同様に E0771-Luc 細胞に RANK を発現していることをフローサイトメトリーで確認した (図 18)。

前述の B16F10 Red-Fluc 細胞と同様に E0771-Luc 細胞を左心室内に注入して骨転移を誘導した。腫瘍移入後 14 日目に *ex vivo* imaging によって長管骨と脊椎への転移を定量化したところ、野生型マウスと比較して *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスでは転移が抑制されていた (図 19a, b)。長管骨での *ex vivo* imaging の結果と一致して組織学的な評価でも骨転移した腫瘍は *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの方が抑制されていた (図 19c, d)。一方で副腎と卵巣においては野生型マウスと *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスに有意差を認めなかった (図 19e, f)。骨転移を認めた膝関節のマイクロ CT では野生型マウスと *Tnfsf11*

$\Delta S/\Delta S$  マウスの両者に骨溶解像を認めた (図 20)。TRAP 染色による骨転移部の破骨細胞数の評価では、野生型マウスと *Tnfsf11* <sup>$\Delta S/\Delta S$</sup>  マウスに同程度の破骨細胞数を認めた (図 21a, b)。これらの結果から溶骨性変化を伴う E0771-Luc 細胞転移においても、可溶性 RANKL は破骨細胞の活性化に影響は与えず、骨に特異的に転移を誘導することが示された。

以上より、可溶性 RANKL は RANK を発現しているがん細胞に破骨細胞活性化を介さずに骨転移誘導に関与することが明らかとなった。



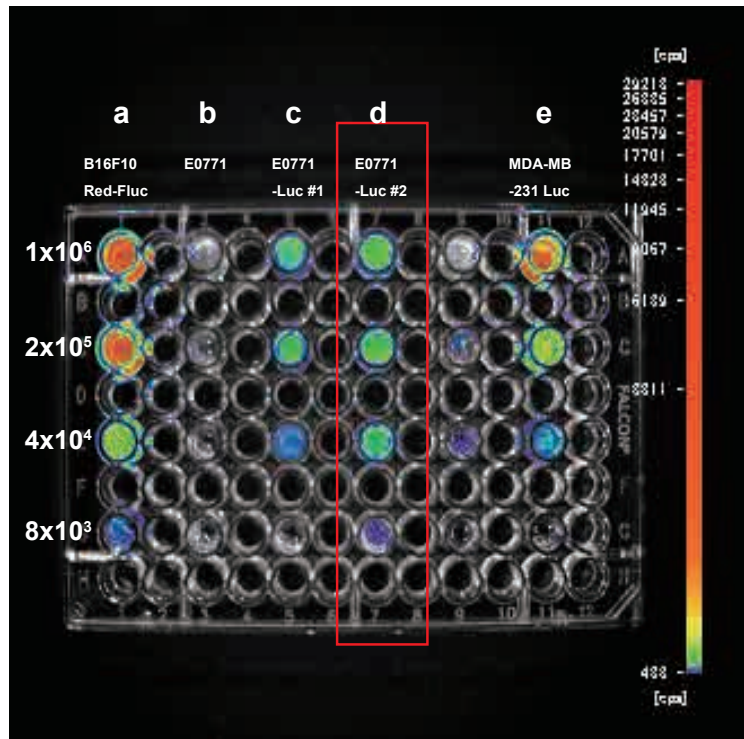


図 17 Luciferase 遺伝子導入がん細胞発光の比較

がん細胞を  $8 \times 10^3$  個から  $1 \times 10^6$  個まで 5 倍ごとに希釈系列を作り発光を比較した。

(a) B16F10 Red-Fluc 。 (b) E0771。 (c) E0771-Luc#1。 (d) E0771-Luc#2。 (e) MDA-MB-231 Luc。 2 系統の E0771-Luc 細胞のうち#2 の方が発光が強かったため、#2 を骨転移実験に使用した (赤枠)。

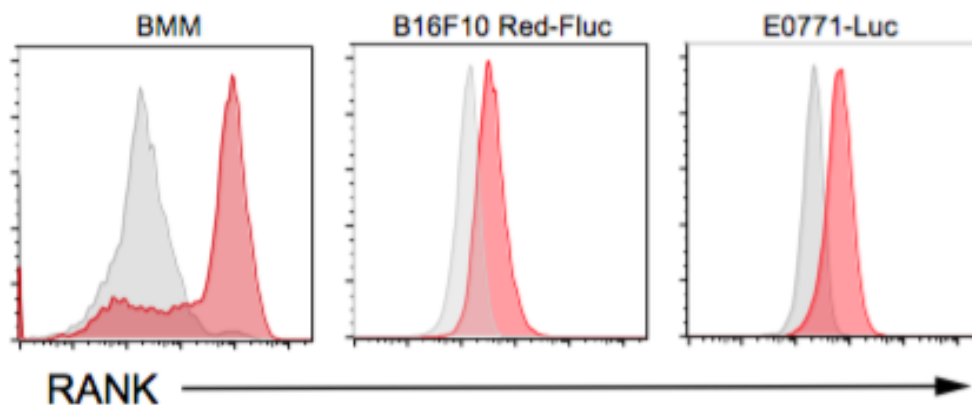


図 18 B16F10 Red-Fluc 細胞と E0771-Luc 細胞の細胞表面 RANK 発現

フローサイトメトリーによる細胞表面 RANK の検出。ポジティブコントロールには野生型マウス骨髄マクロファージ (Bone Marrow Macrophage: BMM)を使用した。

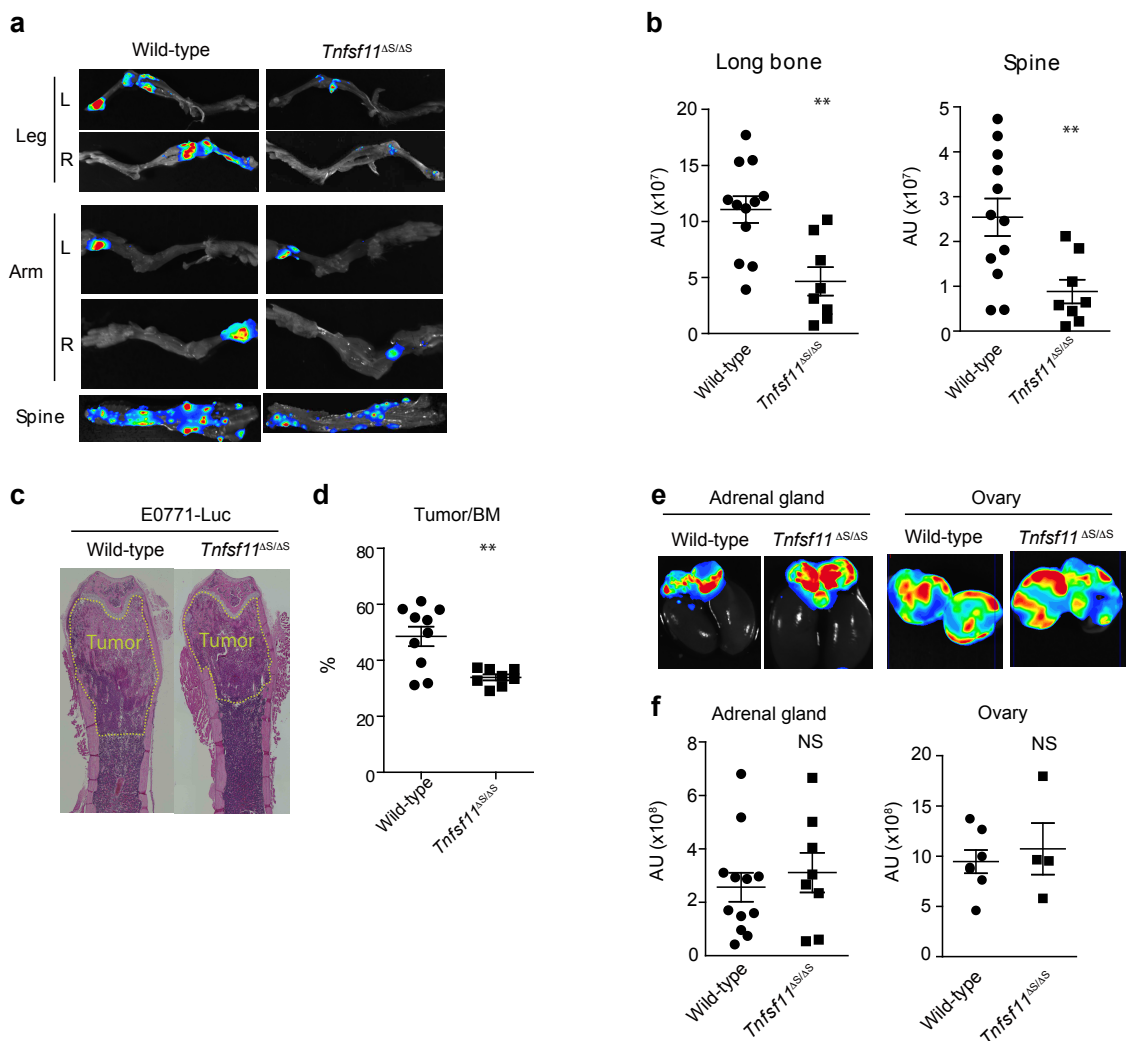


図19 *Tnfsf11<sup>ΔS/ΔS</sup>* マウスではE0771-Luc 乳がん細胞の骨転移が抑制される

(a) E0771-Luc 細胞左心室投与後 14 日目の四肢長管骨と脊椎の *ex vivo* imaging 像。(b) E0771-Luc 細胞左心室投与後 14 日目の四肢長管骨と脊椎の *ex vivo* imaging の定量的比較。1 匹ごとに四肢長管骨の発光量を合計して算出している (wild-type,  $n = 12$ ; *Tnfsf11<sup>ΔS/ΔS</sup>*,  $n = 8$ )。 (c) E0771-Luc 細胞左心室投与後 14 日目の大腿骨の HE 染色像。黄色破線内は腫瘍存在部位を示す。(d) E0771-Luc 細胞左心室投与後 14 日目の大腿骨骨髄内の腫瘍占有率の比較 (wild-type,  $n = 10$ ; *Tnfsf11<sup>ΔS/ΔS</sup>*,  $n = 8$ )。 (e) E0771-Luc 細胞左心室投与後 14 日目の副腎と卵巣の *ex vivo* imaging 像。(f) E0771-Luc 細胞左心室投与後 14 日目の副腎 (wild-type,  $n = 12$ ; *Tnfsf11<sup>ΔS/ΔS</sup>*,  $n = 8$ ) と卵巣 (wild-type,  $n = 7$ ; *Tnfsf11<sup>ΔS/ΔS</sup>*,  $n = 4$ ) の *ex vivo* imaging の定量的比較。Student の t 検定を適用。\*\*は 0.01 未満を示し、NS は P 値が 0.05 以上であることを示す。

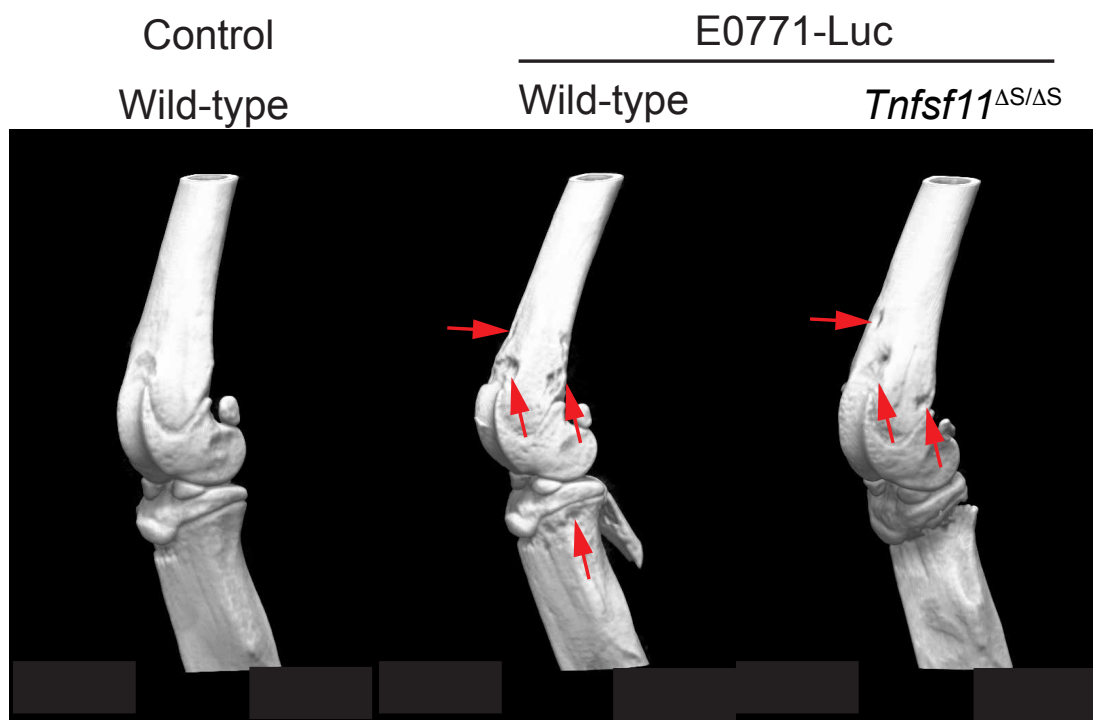


図 20 E0771-Luc 細胞の骨転移部位のマイクロ CT

E0771-Luc 細胞左心室注入後 14 日目の右膝関節のマイクロ CT 像。赤矢印は骨溶解を認める部位。スケールバー 2 mm。

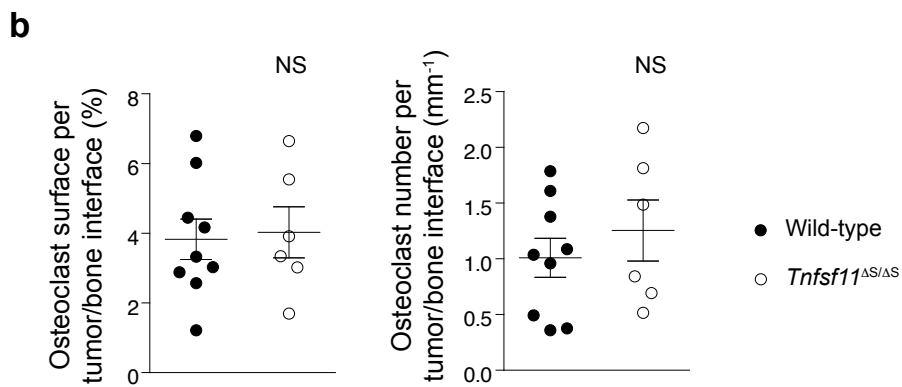
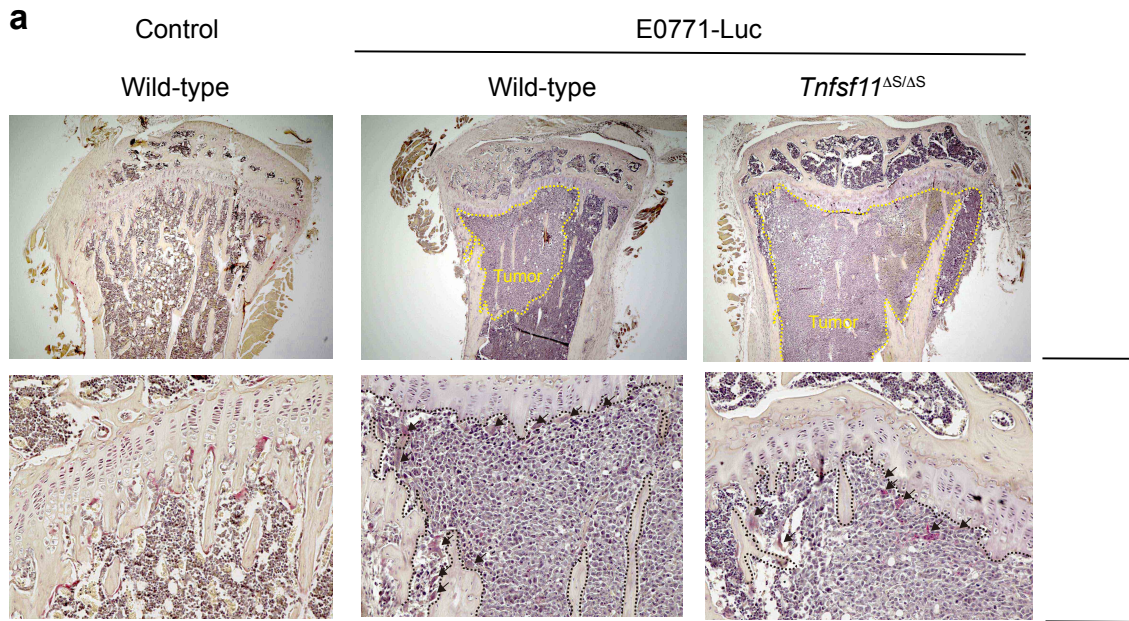


図 21 E0771-Luc 細胞骨転移部の TRAP 染色と破骨細胞数の比較

(a) E0771-Luc 細胞左心室注入後 14 日目の脛骨近位部の TRAP 染色。黄色破線内に腫瘍が存在する。黒色破線は腫瘍/骨の境界部。スケールバー 上段：1000  $\mu\text{m}$ 、下段：200  $\mu\text{m}$ 。(b) 腫瘍/骨の境界部に局在する破骨細胞表面積と破骨細胞数の比較。(wild-type,  $n = 9$ ; *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>,  $n = 6$ )。Student の t 検定を適用。NS は P 値が 0.05 以上であることを示す。

## 第四章 考察

### 4-1. 可溶型 RANKL の生理的意義

可溶型 RANKL の生理的意義を検証するために私は可溶型 RANKL を選択的に欠失している *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスを作製し解析した。*Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスでは RANKL 欠損マウスと異なり骨量増加は呈さず、リンパ節の形成や胸腺髄質上皮細胞の分化、及び妊娠期の乳腺の発達にも影響を与えなかった。また腸管の抗原取り込みを行なう M 細胞の分化にも影響を与えないことは既に報告されている<sup>33</sup>。従って可溶型 RANKL は骨や免疫系の形成や乳腺の発達には生理的な意義は乏しいという結論が得られた。エストロゲン低下による骨粗鬆症を呈するときはヒト、動物モデルともに血中の可溶型 RANKL が上昇することが知られている。そのため病的な骨量減少には可溶型 RANKL が関与すると考えていたが、今回行った卵巣摘出モデルでは *Tnfsf11*<sup>+/+</sup>マウス、*Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスの両者の間で骨量の減少に差は認めなかった。この結果から生体内で認める範囲での可溶型 RANKL 濃度の増減は、破骨細胞の活性化には寄与していない可能性が考えられる。

現在のところ Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) に登録されている *TNFSF11* の一塩基多型の報告には RANKL の結合茎領域の変異を認める報告は認めない。本研究の結果から考慮すると、仮に酵素切断部位に点変異があり、可溶型 RANKL

欠損があったとしても臨床症状を来さないと考えられるため、これまで報告されていない可能性がある。

最近、Xiong らによって可溶性 RANKL 欠損マウスの骨の表現形について報告があった<sup>91</sup>。若年での骨量の増加を認めないこと、卵巣摘出モデルでの骨量減少に野生型と差を認めない点は本研究と一致している。一方で3ヶ月齢や8ヶ月齢といった加齢したマウスでは、若干ではあるが骨量の増加と破骨細胞数の減少を認めたため、可溶性 RANKL が成体での骨リモデリングに寄与していると言及している<sup>91</sup>。骨基質に埋没している骨細胞が破骨細胞前駆細胞に働きかける際に可溶性 RANKL を使用するというのは合理的ではあるが、骨量の変化はわずかであり主要な役割とは言い難い。Xiong らが論文中で言及している通り、体格の大きな別の動物種でも検証する必要があるだろう。少なくともマウスにおいては可溶性 RANKL の骨リモデリングに関する役割は補助的なものと考えられる。

骨細胞に発現している膜結合型 RANKL が破骨細胞分化を誘導する機序として、骨細胞の樹状突起の先端に発現した RANKL が破骨細胞前駆細胞の RANK と直接的に接触して分化を促進するモデルが示されている<sup>92</sup>。また骨芽細胞由来の exosome には RANKL が含まれ、破骨細胞分化誘導能を持つことが報告されており、骨細胞においても同様の機序がある可能性がある<sup>93</sup>。

#### 4.2. がん骨転移における可溶性 RANKL の役割

先行研究では RANK を細胞表面に発現している B16F10 細胞と MDA-MB-231 ヒト乳がん細胞の *in vitro* でのリコンビナント可溶性 RANKL による走化性が示されている<sup>48,84</sup>。しかし生体での可溶性 RANKL による骨転移の誘導の直接的な証明は本研究が初めてである。今回、*in vivo* での経時的な転移の様子や各種臓器への転移の有無の評価を容易にするために Luciferase 遺伝子を導入したがん細胞を使用した。B16F10 Red-Fluc 細胞の *in vivo imaging* で示した様に野生型マウスの方が *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスと比べて早期より骨転移を認める。実際、屠殺時の腫瘍の骨転移はいずれの細胞株でも *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスでは抑制されているという結果であった。一方で副腎や卵巣といった骨以外の臓器に対する転移は野生型と *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスとでは有意差がなく B16F10 Red-Fluc 細胞の皮下移植モデルでも両者に有意差を認めなかったことから、可溶性 RANKL は骨に特異的に転移を誘導するといえる。この機序は先行研究の腫瘍細胞遊走実験で示されているように誘導因子の濃度勾配によるものと考えられる<sup>48,84</sup>。本研究で検証したように大腿骨 1 本から採取した骨髄液を PBS 100 μl に希釈しても血清と同程度の濃度であったことを考えると、骨髄液中の RANKL は血中の RANKL よりもはるかに濃度が高いと予想される。したがって血液と骨髄とでは腫瘍が遊走するた

めに十分な濃度勾配があると思われる。従来より骨転移の悪循環の機序として知られる vicious cycle モデルは破骨細胞の活性化が不可欠である。ところが本研究では B16F10 Red-Fluc 細胞と E0771-Luc 細胞、いずれも野生型マウスと *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスにおける転移腫瘍面積あたりの破骨細胞数には差を認めなかった。このことは可溶型 RANKL の有無は、がん骨転移部位の破骨細胞活性化に関与しないことを意味している。以上より可溶型 RANKL は破骨細胞活性化を介さずに RANK 発現腫瘍細胞に対して走化性因子として働くという結論が得られた。

#### 4-3. 今後の展望

可溶型 RANKL は生理的には骨、免疫系の形成や妊娠時の乳腺の発達には必須ではないことが判明した。さらに血清中の可溶型 RANKL の増加を認める卵巣摘出モデルでも *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスと *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスとの間で差を認めないことから生体での破骨細胞活性化には可溶型 RANKL は重要ではないことが予想される。一方でメラノーマ細胞と乳がん細胞という、RANK を細胞表面に発現し骨転移を示す代表的ながん細胞株 2 種類で *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスは骨特異的に転移が抑制されるという結論が得られた。現在、抗 RANKL 抗体デノスマブはがん骨転移における骨破壊を抑制することで骨折の予防や腫瘍量増大の悪循環を抑制する薬剤として臨床で使用されているが、破骨細



胞の生理的な活性化も抑制するため低 Ca 血症などの重篤な副作用の危険がある<sup>94</sup>。しかし可溶性 RANKL を選択的に阻害することができれば RANKL の生理的な機能を抑制することなく、骨転移を抑制することが期待できる。

近年、免疫チェックポイント阻害剤と抗 RANKL 抗体を併用すると抗腫瘍効果が増すことが報告されている<sup>78</sup>。*Tnfrsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスを用いたがんモデルに抗 RANKL 抗体を使用することで、がん免疫の機序に可溶性 RANKL がどの程度寄与しているかを検証できる。

今回の可溶性 RANKL 欠損マウスの解析は膜結合型と可溶性を分けて機能を解析するには優れた方法であったが、可溶性 RANKL の産生細胞は不明である。骨での RANKL の供給源の候補となる骨芽細胞、骨細胞、あるいは T 細胞等の細胞ごとの除去実験が検索の助けとなると思われる<sup>95</sup>。具体的には骨芽細胞は *Bglap-Cre*、骨細胞は *Dmp1-Cre* といった細胞特異的 Cre マウスと *pu-delta-tk* マウスとを交配し標的細胞を除去することが可能である。

今回、骨転移モデルを検証するにあたって、RANK を発現している B16F10 メラノーマ細胞と E0771 乳がん細胞を使用した。より厳密に RANKL による走化性を評価するならば RANK 陰性のがん細胞による検証が必要である。過去の報告では RANK を発現していないヒト大腸がんの細胞株を使用して、*in vitro* では RANKL に対

する走化性を示さないことを示している<sup>48</sup>。ゲノム編集技術によって、今回使用した B16F10 細胞や E0771 細胞の RANK を欠損させることは可能であり、最も望ましい対照群となる。がん転移の機序として RANKL による、細胞接着分子の増加<sup>96</sup>や、腫瘍細胞のアポトーシス抑制<sup>53</sup>について報告されているが、本研究では十分に検証できておらず今後の課題である。

本研究においては可溶性 RANKL 欠損は乳腺の発達には影響がなかった。一方で可溶性 RANKL の投与によって RANKL 欠損マウスの乳腺上皮が発達し乳汁分泌が可能になることを考えると、乳腺上皮に対する影響は少なからずあると思われる<sup>18</sup>。近年、RANKL シグナルがヒト乳腺上皮細胞の上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) を誘導し、がんの発生及び転移を促すという報告があることから、可溶性 RANKL の乳がん原発に対する影響も検証したい<sup>97</sup>。

乳がんを含むがん細胞が、リンパ節に高頻度に転移することはよく知られている。マウスの mRNA 発現のデータベース (BioGPS)においてはリンパ節では RANKL の発現は顕著に高い。マウスに対してヒト乳がん細胞を用いた研究では、リンパ節中の 3 型自然リンパ球と間葉系細胞が相互作用をすることで可溶性 RANKL の産生を促し、リンパ節への腫瘍転移を促進することが示されている<sup>98</sup>。したがって、

可溶型 RANKL 欠損マウスを使用することで、骨だけではなくリンパ節転移の抑制も示せる可能性がある。

ヒトでは可溶型の RANKL isoform が報告されている<sup>99</sup>。マウスにおいて可溶型 RANKL isoform が存在するとしても、本研究で使用した可溶型 RANKL 欠損マウスにおいては、血清・骨髄液・培養上清中での検出が全くなされないことを考慮すると、生体での isoform の量は極めて少なく、影響も小さいと考えられる。ただし、ヒトでは活性化した T 細胞において可溶型 RANKL isoform の発現が増すことから、マウスにおいても炎症性モデルを実施する際は再検証が必要であると考えられる<sup>99</sup>。

可溶型 RANKL と疾患の関与が報告されているが、今回検討できなかったものとして関節リウマチモデルがあげられる。コラーゲン誘導自己免疫性関節炎モデルを試みたが C57BL6 バックグラウンドのマウスでは発症率が低く有用なデータを得ることが出来なかった。今後発症率の高い DBA バックグラウンドマウスを作製することで可溶型 RANKL の寄与が評価できると考えられる。本研究の卵巣摘出マウスモデルの結果から推測すると、可溶型 RANKL の産生が 2 倍程度増加しても破骨細胞の活性化には繋がらないと思われる。しかし自己免疫性関節炎は局所の強力な炎症を導くため、炎症滑膜部での可溶型 RANKL が血清中よりもはるかに高い濃度に上昇する可能性もあり、検証する価値があると思われる。

## 第五章 結論

可溶型 RANKL を欠損した遺伝子改変マウスを解析し、可溶型 RANKL の生理的、病理意義を検証した。可溶型 RANKL は生体での破骨細胞分化や免疫組織の形成、妊娠期の乳腺の発達には必須ではないことが判明した。一方で細胞表面に RANK を発現しているメラノーマ細胞や乳がん細胞は可溶性 RANKL による走化性を示し骨転移することが判明した。本研究から可溶型 RANKL を阻害することによって生理的な RANKL の機能を阻害することなく、がん骨転移を抑制する治療法につながる可能性が示された。

## 引用文献

1. Okamoto, K. *et al.* Osteoimmunology: The Conceptual Framework Unifying the Immune and Skeletal Systems. *Physiol. Rev.* **97**, 1295–1349 (2017).
2. Teti, A. & Zallone, A. Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis? Osteocytic osteolysis revisited. *Bone* **44**, 11–16 (2008).
3. Horton, J. E., Raisz, L. G., Simmons, H. A., Oppenheim, J. J. & Mergenhagen, S. E. Bone resorbing activity in supernatants fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. *Science* (80-). **177**, 793–795 (1972).
4. Mundy, G. R., Raisz, L. G., Cooper, R. A., Schechter, G. P. & Salmon, S. E. Evidence for the Secretion of an Osteoclast Stimulating Factor in Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **291**, 1041–1046 (1974).
5. Feldmann, M., Brennan, F. M. & Maini, R. N. *Role of Cytokines in Rheumatoid Arthritis. Annual Review of Immunology* **14**, (1996).
6. Takayanagi, H. *et al.* T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- $\gamma$ . *Nature* **408**, 600–605 (2000).
7. Takahashi, N. *et al.* Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology* **122**, 1373–1382 (1988).

8. Tsuda, E. *et al.* Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **234**, (1997).
9. Simonet, W. S. *et al.* Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, (1997).
10. Yasuda, H. *et al.* Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* **139**, (1998).
11. Yasuda, H. *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3597–602 (1998).
12. Wong, B. R. *et al.* TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates *c-Jun* N-terminal kinase in T cells. *J. Biol. Chem.* **272**, (1997).
13. Anderson, D. M. *et al.* A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* **390**, 175–179 (1997).
14. Lacey, D. L. *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165–76 (1998).
15. Kong, Y. Y. *et al.* OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and

- lymph-node organogenesis. *Nature* **397**, 315–323 (1999).
16. Bucay, N. *et al.* osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* **12**, 1260–8 (1998).
  17. Elahi, E. *et al.* Intragenic SNP haplotypes associated with 84dup18 mutation in TNFRSF11A in four FEO pedigrees suggest three independent origins for this mutation. *J. Bone Miner. Metab.* **25**, 159–164 (2007).
  18. Fata, J. E. *et al.* The Osteoclast Differentiation Factor Osteoprotegerin-Ligand Is Essential for Mammary Gland Development. *Cell* **103**, 41–50 (2000).
  19. Anderson, M. S. *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science (80-.)*. **298**, 1395–1401 (2002).
  20. Takaba, H. *et al.* Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell* **163**, 975–987 (2015).
  21. Hikosaka, Y. *et al.* The Cytokine RANKL Produced by Positively Selected Thymocytes Fosters Medullary Thymic Epithelial Cells that Express Autoimmune Regulator. *Immunity* **29**, 438–450 (2008).
  22. Irla, M. *et al.* Autoantigen-Specific Interactions with CD4<sup>+</sup> Thymocytes Control Mature Medullary Thymic Epithelial Cell Cellularity. *Immunity* **29**, 451–463 (2008).

23. White, A. J. *et al.* Sequential phases in the development of Aire-expressing medullary thymic epithelial cells involve distinct cellular input. *Eur. J. Immunol.* **38**, 942–947 (2008).
24. Roberts, N. A. *et al.* Rank Signaling Links the Development of Invariant  $\gamma\delta$  T Cell Progenitors and Aire + Medullary Epithelium. *Immunity* **36**, 427–437 (2012).
25. White, A. J. *et al.* An Essential Role for Medullary Thymic Epithelial Cells during the Intrathymic Development of Invariant NKT Cells. *J. Immunol.* **192**, 2659–2666 (2014).
26. Yoshida, H. *et al.* Different cytokines induce surface lymphotoxin- $\alpha\beta$  on IL-7 receptor- $\alpha$  cells that differentially engender lymph nodes and Peyer's patches. *Immunity* **17**, 823–833 (2002).
27. Akiyama, T. RANKL-RANK interaction in immune regulatory systems. *World J. Orthop.* **3**, 142 (2012).
28. Kim, D. *et al.* Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *J Exp Med* **192**, 1467–1478 (2000).
29. Onder, L. *et al.* Lymphatic Endothelial Cells Control Initiation of Lymph Node Organogenesis. *Immunity* **47**, 80–92.e4 (2017).
30. Perlot, T. & Penninger, J. M. Development and Function of Murine B Cells Lacking RANK. *J. Immunol.* **188**, 1201–1205 (2012).
31. Onal, M. *et al.* Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) protein expression by B



- lymphocytes contributes to ovariectomy-induced bone loss. *J. Biol. Chem.* **287**, 29851–29860 (2012).
32. Knoop, K. A. *et al.* RANKL Is Necessary and Sufficient to Initiate Development of Antigen-Sampling M Cells in the Intestinal Epithelium. *J. Immunol.* **183**, 5738–5747 (2009).
33. Nagashima, K. *et al.* Identification of subepithelial mesenchymal cells that induce IgA and diversify gut microbiota. *Nat. Immunol.* **18**, 675–682 (2017).
34. Fata, J. E. *et al.* The Osteoclast Differentiation Factor Osteoprotegerin-Ligand Is Essential for Mammary Gland Development mediated by osteoclasts. *The TNF family molecule Osteoprotegerin-ligand (OPGL; also known as ODF, TRANCE, and RANKL) (Anderson et al is a key factor stimulating the differentiation and activation. Cell* **103**, (2000).
35. Fernandez-Valdivia, R. & Lydon, J. P. From the ranks of mammary progesterone mediators, RANKL takes the spotlight. (2011). doi:10.1016/j.mce.2011.09.030
36. Schramek, D., Sigl, V. & Penninger, J. M. RANKL and RANK in sex hormone-induced breast cancer and breast cancer metastasis. *Trends Endocrinol. Metab.* **22**, 188–194 (2011).
37. Nakamura, T. *et al.* Estrogen Prevents Bone Loss via Estrogen Receptor  $\alpha$  and Induction of Fas Ligand in Osteoclasts. *Cell* **130**, 811–823 (2007).
38. Martin-Millan, M. *et al.* The Estrogen Receptor- $\alpha$  in Osteoclasts Mediates the Protective Effects

- of Estrogens on Cancellous But Not Cortical Bone. *Mol. Endocrinol.* **24**, 323–334 (2010).
39. Määttä, J. A. *et al.* Inactivation of estrogen receptor in bone-forming cells induces bone loss in female mice. *FASEB J.* **27**, 478–488 (2013).
40. Melville, K. M. *et al.* Female mice lacking estrogen receptor-alpha in osteoblasts have compromised bone mass and strength. *J. Bone Miner. Res.* **29**, 370–379 (2014).
41. Seitz, S. *et al.* Pharmacological Estrogen Administration Causes a FSH-Independent Osteo-Anabolic Effect Requiring ER Alpha in Osteoblasts. *PLoS One* **7**, 50301 (2012).
42. Windahl, S. H. *et al.* Estrogen receptor- in osteocytes is important for trabecular bone formation in male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 2294–2299 (2013).
43. Kondoh, S. *et al.* Estrogen receptor  $\alpha$  in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice. *Bone* **60**, 68–77 (2014).
44. D'Amelio, P. *et al.* Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: A key mechanism in osteoporosis. *Bone* **43**, 92–100 (2008).
45. Kanematsu, M. *et al.* Prostaglandin E2 induces expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand/osteoprotegerin ligand on pre-B cells: Implications for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency. *J. Bone Miner. Res.* **15**, 1321–1329 (2000).
46. Macedo, F. *et al.* Bone metastases: An overview. *Oncol. Rev.* **11**, (2017).

47. Mundy, G. R. Metastasis to bone: Causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 584–593 (2002).
48. Jones, D. H. *et al.* Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* **440**, 692–696 (2006).
49. Zhang, L. *et al.* C-Src-mediated RANKL-induced breast cancer cell migration by activation of the ERK and Akt pathway. *Oncol. Lett.* **3**, 395–400 (2012).
50. Tang, Z. N., Zhang, F., Tang, P., Qi, X. W. & Jiang, J. RANKL-induced migration of MDA-MB-231 human breast cancer cells via Src and MAPK activation. *Oncol. Rep.* **26**, 1243–1250 (2011).
51. Sakuma, T. *et al.* CIZ/NMP4 is expressed in B16 melanoma and forms a positive feedback loop with RANKL to promote migration of the melanoma cells. *J. Cell. Physiol.* **227**, 2807–2812 (2012).
52. Weigelt, B., Peterse, J. L. & Van't Veer, L. J. Breast cancer metastasis: Markers and models. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 591–602 (2005).
53. Tan, W. *et al.* Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature* **470**, 548–553 (2011).
54. Lum, L. *et al.* Evidence for a role of a tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-converting enzyme-like

- protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J. Biol. Chem.* **274**, 13613–13618 (1999).
55. Nakashima, T. *et al.* Protein Expression and Functional Difference of Membrane-Bound and Soluble Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand: Modulation of the Expression by Osteotropic Factors and Cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 768–775 (2000).
56. Hikita, A. *et al.* Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand. *J. Biol. Chem.* **281**, 36846–36855 (2006).
57. Lacey, D. L., Timms, E. & a, E. Osteoprotegerin ligand is cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165–176 (1998).
58. Nelson, C. A., Warren, J. T., Wang, M. W. H., Teitelbaum, S. L. & Fremont, D. H. RANKL employs distinct binding modes to engage RANK and the osteoprotegerin decoy receptor. *Structure* **20**, 1971–1982 (2012).
59. Takahashi, N. *et al.* Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* **123**, 2600–2602 (1988).
60. Udagawa, N. *et al.* Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* **141**, 3478–3484 (2000).
61. Miyamoto, T. *et al.* An adherent condition is required for formation of multinuclear osteoclasts in

- the presence of macrophage colony-stimulating factor and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand. *Blood* **96**, 4335–4343 (2000).
62. Itoh, Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol.* **44–46**, 207–223 (2015).
63. Nakashima, T. *et al.* Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat. Med.* **17**, 1231–1234 (2011).
64. Xiong, J. *et al.* Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat. Med.* **17**, 1235–1241 (2011).
65. Uemura, H. *et al.* Circulating profiles of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand in post-menopausal women. *J. Endocrinol. Invest.* **31**, 163–168 (2008).
66. Nakamura, T. *et al.* Estrogen Prevents Bone Loss via Estrogen Receptor  $\alpha$  and Induction of Fas Ligand in Osteoclasts. *Cell* **130**, 811–823 (2007).
67. Proell, V. *et al.* Orchiectomy upregulates free soluble RANKL in bone marrow of aged rats. *Bone* **45**, 677–681 (2009).
68. Geusens, P. P. *et al.* The ratio of circulating osteoprotegerin to RANKL in early rheumatoid arthritis predicts later joint destruction. *Arthritis Rheum.* **54**, 1772–1777 (2006).
69. van Tuyl, L. H. D. *et al.* Baseline RANKL:OPG ratio and markers of bone and cartilage

- degradation predict annual radiological progression over 11 years in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 1623–1628 (2010).
70. Jung, K. & Lein, M. Bone turnover markers in serum and urine as diagnostic, prognostic and monitoring biomarkers of bone metastasis. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1846**, 425–438 (2014).
71. Kraj, M. *et al.* Correlation of osteoprotegerin and sRANKL concentrations in serum and bone marrow of multiple myeloma patients. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **53**, 454–64 (2005).
72. Todenhöfer, T. *et al.* Serum receptor activator of nuclear factor kb ligand (RANKL) levels predict biochemical recurrence in patients undergoing radical prostatectomy. *BJU Int.* **113**, 152–159 (2014).
73. Kendler, D. L. *et al.* Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women transitioning from alendronate therapy. *J. Bone Miner. Res.* **25**, 72–81 (2010).
74. Stopeck, A. T. *et al.* Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: A randomized, double-blind study. *J. Clin. Oncol.* **28**, 5132–5139 (2010).
75. Fizazi, K. *et al.* Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with

- castration-resistant prostate cancer: A randomised, double-blind study. *Lancet* **377**, 813–822 (2011).
76. Henry, D. H. *et al.* Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1125–1132 (2011).
77. Smyth, M. J., Yagita, H. & Mearns, G. A. Combination anti-CTLA-4 and Anti-RANKL in metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **32**, e104–e106 (2014).
78. Diarra, D. *et al.* Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat. Med.* **13**, 156–163 (2007).
79. Bostwick, A. D., Salama, A. K. & Hanks, B. A. Rapid complete response of metastatic melanoma in a patient undergoing ipilimumab immunotherapy in the setting of active ulcerative colitis. *J. Immunother. Cancer* **3**, (2015).
80. Liede, A. *et al.* An observational study of concomitant immunotherapies and denosumab in patients with advanced melanoma or lung cancer. *Oncoimmunology* 1–11 (2018).  
doi:10.1080/2162402X.2018.1480301
81. Ahern, E. *et al.* Co-administration of RANKL and CTLA4 antibodies enhances lymphocyte-mediated antitumor immunity in mice. *Clin. Cancer Res.* **23**, 5789–5801 (2017).

82. Ahem, E. *et al.* RANKL blockade improves efficacy of PD1-PD-L1 blockade or dual PD1-PD-L1 and CTLA4 blockade in mouse models of cancer. *Oncoimmunology* **7**, (2018).
83. Afzal, M. Z. & Shirai, K. Immune checkpoint inhibitor (anti-CTLA-4, anti-PD-1) therapy alone versus immune checkpoint inhibitor (anti-CTLA-4, anti-PD-1) therapy in combination with anti-RANKL denosumab in malignant melanoma: A retrospective analysis at a tertiary care center. *Melanoma Res.* **28**, 341–347 (2018).
84. Nakai, Y. *et al.* Efficacy of an orally active small-molecule inhibitor of RANKL in bone metastasis. *Bone Res.* **7**, 1 (2019).
85. Nagashima, K. *et al.* Identification of subepithelial mesenchymal cells that induce IgA and diversify gut microbiota. *Nat. Immunol.* **18**, 675–682 (2017).
86. Roodman, G. D. & Dougall, W. C. RANK ligand as a therapeutic target for bone metastases and multiple myeloma. *Cancer Treat. Rev.* **34**, 92–101 (2008).
87. Esposito, M., Guise, T. & Kang, Y. The biology of bone metastasis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, (2018).
88. Croucher, P. I., McDonald, M. M. & Martin, T. J. Bone metastasis: The importance of the neighbourhood. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 373–386 (2016).
89. Morrison, S. J. & Scadden, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*



- 505, 327–334 (2014).
90. Bottos, A. *et al.* Decreased NK-cell tumour immunosurveillance consequent to JAK inhibition enhances metastasis in breast cancer models. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
  91. Xiong, J. *et al.* Soluble RANKL contributes to osteoclast formation in adult mice but not ovariectomy-induced bone loss. *Nature Communications* **9**, (2018).
  92. Honma, M. *et al.* RANKL subcellular trafficking and regulatory mechanisms in osteocytes. *J. Bone Miner. Res.* **28**, 1936–1949 (2013).
  93. Cappariello, A. *et al.* Osteoblast-Derived Extracellular Vesicles Are Biological Tools for the Delivery of Active Molecules to Bone. *J. Bone Miner. Res.* **33**, 517–533 (2018).
  94. Qi, W.-X. *et al.* Incidence and risk of denosumab-related hypocalcemia in cancer patients: a systematic review and pooled analysis of randomized controlled studies. *Curr. Med. Res. Opin.* **29**, 1067–1073 (2013).
  95. Chen, Y. T., Levasseur, R., Vaishnav, S., Karsenty, G. & Bradley, A. Bigenic Cre/loxP, puDeltatk conditional genetic ablation. *Nucleic Acids Res.* **32**, (2004).
  96. Chen, L. M. *et al.* RANKL increases migration of human lung cancer cells through intercellular adhesion molecule-1 up-regulation. *J. Cell. Biochem.* **112**, 933–941 (2011).
  97. Palafox, M. *et al.* RANK induces epithelial-mesenchymal transition and stemness in human

- mammary epithelial cells and promotes tumorigenesis and metastasis. *Cancer Res.* **72**, 2879–2888 (2012).
98. Irshad, S. *et al.* ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> innate lymphoid cells promote lymph node metastasis of breast cancers. *Cancer Res.* **77**, 1083–1096 (2017).
99. Walsh, N. C. *et al.* Activated human T cells express alternative mRNA transcripts encoding a secreted form of RANKL. *Genes Immun.* **14**, 336–345 (2013).

## 謝辞

本研究を遂行し学位論文を執筆するにあたり、懇切丁寧なご指導を賜りました高柳 広教授に心より感謝申し上げます。骨免疫学寄付講座 特任准教授の岡本 一男 先生には基礎研究の論理の展開、論文の書き方、骨の世界の奥深さといった、今後の私の研究者としての道標となるものを全て教えて頂きました。澤 新一郎 先生には、基礎研究に転向したばかりで手技もおぼつかない私を根気強く指導して頂きました。本研究で使用した *Tnfrsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスは国立国際医療研究センターの岡村 匡史 先生と当研究室の新田 剛 先生に作製して頂きました。がん骨転移の *in vivo imaging* を行うにあたっては、多大な時間を分子病理学教室 特任准教授の江幡 正悟 先生にご協力頂きました。本研究は RANKL の多彩な機能を検証するために多分野にわたるデータ収集が必要でしたが、当研究室の末松 綾子 さんには骨の解析・破骨細胞分化誘導実験を、中井 雄太 さんと橋本 恭子 さんにはがん骨転移実験を、堤 雅紀 さんには胸腺の解析をそれぞれご協力頂き遂行することができました。当研究室のスタッフ・研究員の先生方には研究方針や実験方法について貴重なご助言を頂きました。技術補佐員の皆様、秘書の皆様には、実験技術のご指導、実験環境の維持、様々な事務手続きをとして多大な援助をして頂きました。高柳研究室の皆様に心より感謝申し上げます。

東京女子医科大学病院 腎臓小児科教授 服部 元史 先生には大学院入学以前

の4年間、小児科医・腎臓内科医としてリサーチマインドを持って診療にあたることの大切さを指導して頂きました。人手不足の折であるにも関わらず基礎研究へ転向する私を快く送り出し、応援して下さいましたことを心より感謝申し上げます。

最後に私事で恐縮ですが、出産と育児という人生最大のイベントをこなしつつ私の大学院生活を4年間支えてくれた妻の浅野 友美 と、すくすくと健全に成長してくれている長女の浅野 碧唯 に心から感謝致します。

浅野 達雄