

論文の内容の要旨

論文題目 可溶性 RANKL の生理的意義およびがん骨転移における役割

氏名 浅野 達雄

骨の機能は身体の支持・保護、運動器、カルシウムの貯蔵庫、造血の場といったように著しく多様である。また成体になり骨の構造に変化がないように見えても破骨細胞による骨吸収と、骨芽細胞による骨形成の絶妙な平衡状態にあり、代謝が盛んな動的な器官と言える。このような骨の特殊性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。現在では多くの免疫系に関わるサイトカインが骨代謝細胞にも作用するだけでなく、骨代謝に重要な制御因子が免疫組織の制御にも関わるということが判明するなど骨と免疫系の相互作用が理解されるようになった。

Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)は破骨細胞分化に必須のサイトカインである。破骨細胞前駆細胞は RANKL の受容体である Receptor activator of NF- κ B ligand (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。RANK が RANKL と結合すると MAPK 経路、NF- κ 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。またこのマウスではリンパ節、腸管の M 細胞、胸腺髄質上皮細胞といった免疫系の形成や妊娠期の乳腺の発達にも障害を認める。このように RANKL は生理的に多彩な機能を発揮することが判明している。一方で RANKL は閉経後骨粗鬆症、関節リウマチの炎症性骨破壊、がんの骨転移など多くの疾患の病態に関わることが報告されている。

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可溶性タンパク質として分泌される。膜結合型、可溶性ともに RANK のアゴニストとして機能することは知られているが、生体でどのような役割の違いがあるかは不明である。in vitro の系では膜結

合型の方が破骨細胞誘導能が高いことが示されている。またリコンビナント RANKL を用いた破骨細胞分化誘導実験では生理的濃度よりもはるかに高い濃度を用いており生体内での機能を反映しているか疑問がある。一方で細胞特異的 RANKL 欠損マウスを使用した解析では成体の骨リモデリングには骨細胞が RANKL の主な供給源となっていることが示されている。骨基質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考えられる。

RANKL は骨、免疫組織、妊娠期の乳腺といった生命活動や繁殖に重要な器官の形成に不可欠なサイトカインである。一方で閉経後骨粗鬆症、炎症性骨破壊、がん骨転移などを促進する病理的な意義も大きいことも分かっている。近年、細胞や臓器レベルでの RANKL の役割がより詳しく判明するようになった。しかし膜結合型タンパク質と可溶性タンパク質の二つの形態を持つという特徴に関しては未だに詳細な機能の解明はされていない。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、病理的意義を解明し、RANKL の関連する疾患の治療の糸口となることを目的として研究を行った。

RANKL の酵素切断部位を含む細胞外ドメインを欠損するように CRISPR/CAS9 法によって作製された可溶性 RANKL 欠損マウス (*Tnfsf11*^{ΔS/ΔS} マウス)を解析した。*Tnfsf11*^{ΔS/ΔS} マウスでは正常の歯牙の萌出と成長を認めた。マイクロ CT による骨の解析では *Tnfsf11*^{ΔS/ΔS} マウスは *Tnfsf11*^{+/+} マウスと同程度の骨量だった。脛骨の組織学的な評価では破骨細胞数には差を認めなかった。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。

Tnfsf11^{ΔS/ΔS} マウスではリンパ節は肉眼的にも組織学的にも正常に形成されていた。またリンパ節内の T、B リンパ球数にも変化はなかった。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判明した。

Tnfsf11^{ΔS/ΔS} マウスにおける胸腺の組織学的な観察とフローサイトメトリーによる解析では Aire 陽性の胸腺髄質上皮細胞の局在や細胞数は正常であった。これらの実験結果から Aire 陽性の胸腺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。

妊孕性と妊娠時の乳腺発達を評価するために *Tnfsf11*^{ΔS/ΔS} マウス同士を交配したところ、*Tnfsf11*^{ΔS/ΔS} マウスは通常通り妊娠、出産し、その後も問題なく授乳を行った。これらのことから可溶性 RANKL は妊孕性と妊娠時の乳腺発達には寄与しないことがわかった。

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エストロゲン減少時の破骨細胞の病的な活性化に可溶性 RANKL が関与しているかを調べた。卵巣摘出を行った *Tnfsf11*^{+/+} マウスと *Tnfsf11*^{ΔS/ΔS} マウスでは骨量の減少は同程度であった。従って、エストロ

ゲンの低下による骨粗鬆症には可溶性 RANKL の影響は乏しいことが示された。

乳がん、前立腺がん、メラノーマは骨に高頻度に転移をする。先行研究では *in vitro* でのリコンビナント可溶性 RANKL によるメラノーマ細胞と乳がん細胞の走化性は示されているが、*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*^{ΔS/ΔS} マウスを使用して可溶性 RANKL が骨転移を誘導するかを検証した。Luciferase 遺伝子を導入した B16F10 Red-Fluc 細胞の骨転移モデルによる *in vivo* imaging では腫瘍移入後 8 日目の *Tnfsf11*^{ΔS/ΔS} マウスの骨転移が野生型マウスと比較して有意に抑制されていた。また腫瘍移入後 12 日目の解析では長管骨と脊椎に対する骨転移は *Tnfsf11*^{ΔS/ΔS} マウスで有意に抑制されていた。一方で野生型マウスと *Tnfsf11*^{ΔS/ΔS} マウスでは腫瘍転移部の破骨細胞数に差は認めなかった。なお副腎、卵巣ともに野生型マウスと *Tnfsf11*^{ΔS/ΔS} マウスとの間で転移に有意差は認めなかった。腫瘍細胞の増殖に対する可溶性 RANKL の直接的な影響を検証するために B16F10 Red-Fluc 細胞を皮下移植したところ野生型マウスと *Tnfsf11*^{ΔS/ΔS} マウスとの間に有意差は認めなかった。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事が示された。さらに B16F10 Red-Fluc 細胞と同様に RANK を発現している E0771-Luc 乳がん細胞でも検証した。その結果 E0771-Luc 細胞の骨転移モデルにおいても、*Tnfsf11*^{ΔS/ΔS} マウスでは破骨細胞の活性化には差がないが骨特異的に転移が抑制されていることが示された。これらの結果から可溶性 RANKL は破骨細胞の活性化を介さずに RANK 発現のがん細胞の骨転移を誘導することが示された。

Tnfsf11^{ΔS/ΔS} 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にも影響を与えなかった。また妊娠期の乳腺の発達異常も認めなかった。従って可溶性 RANKL は骨や免疫系の形成、妊娠期の乳腺の発達といった生理的な意義は乏しいという結論が得られた。閉経後骨粗鬆症モデルでは可溶性 RANKL の有無は骨量の減少に影響がなかったことから、生体内で認める範囲での可溶性 RANKL 濃度の増減は、破骨細胞の活性化には影響しない可能性がある。一方でメラノーマ細胞と乳がん細胞という骨転移を示すがん細胞株 2 種類を検証することで、可溶性 RANKL は破骨細胞の活性化を介さずに、がんの骨転移を誘導することが判明した。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承認されているが、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。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。

可溶性 RANKL は生体での破骨細胞分化や免疫組織の形成、妊娠期の乳腺発達といった生理的機能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。本研究から可溶性 RANKL を選択的に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。