

審査の結果の要旨

氏名 浅野 達雄

本研究は、破骨細胞分化や免疫組織形成に必須のサイトカインである **Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)**が可溶型と膜結合型の二つの形態をとることに着目し、可溶型 RANKL を選択的に欠損したマウス (*Tnfsf11*^{AS/AS} マウス)を解析することで、これまで不明瞭であった可溶型 RANKL の生理的意義・病的意義を検証したものであり、下記の結果を得ている。

1. *Tnfsf11*^{AS/AS} 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*^{AS/AS} 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型 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判明した。
2. *Tnfsf11*^{AS/AS} 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型 RANKL はリンパ節形成には必須ではないことが判明した。
3. *Tnfsf11*^{AS/AS} 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。これらの結果から胸腺髄質上皮細胞の分化には可溶型 RANKL は必須ではないことが示された。
4. 妊孕性と妊娠時の乳腺発達を評価するために *Tnfsf11*^{AS/AS} マウス同士を交配したところ、*Tnfsf11*^{AS/AS} マウスは通常通り妊娠・出産し、その後も問題なく授乳・育仔を行った。これらのことから可溶型 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。
5. 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型 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*^{AS/AS} 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型 RANKL の影響は乏しいことが示された。
6. B16F10 Red-Flucメラノーマ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} マウスでは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 は破骨細胞活性化を介さずに、骨に B16F10 Red-Fluc 細胞の転移を誘導することが示された。一方で腫瘍の増殖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。

7. B16F10 Red-Fluc 細胞と同様に RANK を発現している E0771-Luc 乳がん細胞でも骨転移モデルを検証した。その結果 E0771-Luc 細胞においても、*Tnfsf11*^{ΔS/ΔS} マウスでは骨への転移が抑制されていた。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。これらの結果から、E0771-Luc 細胞においても可溶性 RANKL は破骨細胞活性化を介さずに骨に特異的に転移を誘導することが示された。

以上、本論文は可溶性 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な機能には必須ではないことを明らかにした。さらに病理的意義として、可溶性 RANKL は RANK 発現がん細胞の骨転移を促すことを明らかにした。本研究はこれまで不明瞭であった可溶性 RANKL の機能解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。