

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 本間 雅

成熟破骨細胞は、破骨前駆細胞が receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) ligand (RANKL) の刺激を受容することで活性化し、細胞融合することで形成される。近年になって、生理的な成熟破骨細胞形成を制御するのは骨細胞であることが示された。一方、骨細胞は、骨芽細胞が自身の分泌した骨基質内へ浸潤して分化することで形成される細胞であり、骨基質内に包埋される形で存在する骨細胞が、どのようにして破骨前駆細胞へ RANKL シグナルを供給しているのか、に関しては明らかとなっていなかった。

申請者はまず、マウスより単離した初代骨細胞の機能を評価する *in vitro* 実験系の構築を行った。初代骨細胞は骨基質内から単離して平面培養を行うと、骨芽細胞様に脱分化していくことが知られているため、骨細胞の形質を維持した培養手法の構築が必要である。骨基質の主要構成成分である I 型コラーゲンのゲル内に初代骨細胞を包埋して培養(3D)した場合と平面培養(2D)した場合で骨細胞マーカーの発現変動を比較したところ、3D 培養条件では骨細胞の脱分化が抑制されることが示された。また 3D 培養条件下では、骨細胞に特徴的な樹状突起の形成も確認された。さらに申請者は、3D 培養した骨細胞と破骨前駆細胞を、多孔質フィルターを間に挟んで共培養する系を考案した。この共培養系では、共培養開始 5~9 日目にかけて多数の成熟破骨細胞形成が認められ、骨細胞による成熟破骨細胞の形成制御機構を解析できる系の構築に成功している。次いで申請者は、上記で構築した実験系を用いて、骨芽細胞から破骨前駆細胞への RANKL シグナルの伝達様式を明らかにする検討も行った。RANKL は II 型膜貫通タンパク質であり、細胞外ドメインが切断されて可溶性の分子 (sRANKL) を生成するが、共培養系において培地中に放出されている sRANKL のレベルは 0.1 ng/mL 程度である一方、sRANKL による直接刺激では、10 ng/mL まで濃度を上げた際にも、骨細胞との共培養系と同程度の成熟破骨細胞形成は認められなかった。また、sRANKL の生成を阻害した際にも成熟破骨細胞形成に有意な影響は生じなかった。一方共焦点顕微鏡を用いた観察では、骨細胞が多孔質フィルターのポアを介して樹状突起をフィルター逆側まで進展し、複数の破骨前駆細胞と接触している様子が観察されており、多孔質フィルターを二重にする、あるいはフィルターのポアサイズをより小さいものに変更し、樹状突起の進展を妨げた場合には、成熟破骨細胞形成が顕著に低下することも示された。一連の検討は、骨細胞から破骨前駆細胞への RANKL シグナル供給は、直接接触を介して生じていることを示唆している。さらに申請者は、osteoprotegerin (OPG) が骨細胞による成熟破骨細胞形成支持を負に制御する機構に関しても検討を行った。共焦点顕微鏡を用いた解析からは、骨細胞においても骨芽細胞同様、RANKL は主としてリソソームに局在し、細胞表面への局在は制限されており、RANKL のリソソームへの選別輸送には OPG の共発現が必要であることが示された。OPG 欠損マウス由来骨細胞では、細胞表面に局在する RANKL 分子の量が顕著に増大しており、破骨前駆細胞と共培養を行った場合、成熟破骨細胞の形成も顕著に増大した。さらに、デコイ受容体としての機能を維持しつつ、RANKL の細胞内選別輸送を制御する機能は喪失している OPG 変異体を、OPG 欠損マウス由来骨細胞に導入した検討では、OPG 変異体と野生型でタンパク質レベルでの発現量に差が認められないにも関わらず、成熟破骨細胞形成に対する抑制効果は大幅に減弱していることが示されており、RANKL の細胞内局在を制御する機能が、OPG による RANKL シグナル調節機構の一部として機能していることを明らかとすることに成功している。

以上の研究を通して申請者は、骨細胞による成熟破骨細胞の形成制御過程には、骨細胞の樹状突起と破骨前駆細胞の直接的な接触が必要であり、sRANKL の寄与が小さいことを示した。また骨細胞においても、RANKL は、その生合成過程において OPG と複合体を形成してリソソームへと選別輸送されていると考えられ、OPG の RANKL 選別輸送制御機能は、デコイ受容体としての機能に加えて RANKL シグナル入力強度の調節機構として寄与していることを示した。これらは、成熟破骨細胞の形成制御に関わる分子機構の詳細を解明した重要な成果であり、申請者の業績は博士(薬学)の授与にふさわしいものと判断する。