

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05445

研究課題名(和文) 骨芽細胞における RANKL 逆シグナル経路と Wnt シグナル経路のクロストーク解析

研究課題名(英文) Analyses of crosstalk between RANKL reverse signaling and Wnt signaling pathways in osteoblasts

研究代表者

本間 雅 (Honma, Masashi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60401072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：RANKL逆シグナル経路は、*in vitro*で骨芽細胞分化の促進作用が明らかになっており、Wntシグナル古典経路は、*in vivo*でも骨芽細胞分化の促進作用が明らかになっていた。しかし、Wnt非古典経路の影響や、RANKL 逆シグナル経路との相互作用など、不明な点は多く残されている。本研究では、RANKL逆シグナル経路が*in vivo*でも、骨芽細胞分化を促進し、骨吸収抑制と骨形成維持を両立させる、新規創薬標的になり得ることを示した。また、Wnt下流4経路の活性化パターンを、網羅的に測定する手法が完成した。さらに、Wnt/Ca経路は、細胞表面上Caチャネルとの共役が必須である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RANKL逆シグナル経路が、生体レベルでは骨吸収と骨形成の共役機構の一部として機能している、という仮説をサポートする結果が得られると共に、骨粗鬆症などの骨破壊疾患に対する新たな創薬標的になり得ることを示し、臨床的・医学的に意義の大きい成果が得られた。また、非常に複雑なWntシグナル経路の活性化パターンを定量的に評価する手法を確立し、非古典経路の一部であるCa経路の活性化機構に関して、新規の知見が得られ、生物学的にも意義の大きい成果が得られたと考えている。

研究成果の概要(英文)：RANKL reverse signaling was known to promote osteoblast differentiation *in vitro*, and Wnt canonical pathway was known to promote osteoblast differentiation *in vivo*. However, roles of Wnt non-canonical pathways and signal crosstalk between Wnt and RANKL reverse signaling remained to be elucidated. Here, we showed that RANKL reverse signaling promotes osteoblast differentiation *in vivo*. RANKL has a potential as a novel pharmacological target to enable osteoclast suppression and osteoblast activation simultaneously. We also established a method to evaluate the activation of Wnt signaling pathways quantitatively. Our findings also suggested that the activation of Wnt/Ca pathway needs the coupling of Fzd and Ca channel at the cell surface.

研究分野：骨軟骨代謝学

キーワード：シグナル伝達 骨代謝 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のサイクルが繰り返されることで、その量および質が一定に維持されている。Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) ligand (RANKL)は、破骨細胞の成熟を中心的に制御するシグナル入力分子として知られており、骨組織においては骨芽細胞や、骨芽細胞骨芽細胞が自身の分泌した骨基質中に侵入して最終分化することで形成される骨細胞に発現が認められる。生体内で破骨前駆細胞に対する RANKL の供給源は、従来は骨表面に局在する骨芽細胞であると考えられてきたが、骨細胞選択的な RANKL 遺伝子欠損マウスの表現型解析から、骨リモデリング過程における成熟破骨細胞の誘導に関しては、骨細胞に発現する RANKL が主要な役割を果たすことが示唆された。そのため、骨芽細胞に発現する RANKL の生理的な役割が、逆に不明瞭となった。我々はこの点に着目し、種々の文献情報も踏まえ、「骨芽細胞に発現する 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」を想定して予検討を進めた。その結果、破骨細胞はその成熟過程において RANK を含む膜小胞を分泌すること、またこの膜小胞型 RANK で骨芽細胞を刺激した場合、骨芽細胞の分化が促進されることが見出された。さらに、この刺激によって PI3K-Akt-mTORC1 経路の活性化が生じ、その下流で骨芽細胞分化を制御する転写因子 runt-related transcription factor 2 (Runx2)の核内移行が生じることも確認された。これらの予検討結果は、破骨細胞から放出される膜小胞型 RANK が骨芽細胞に発現する RANKL に結合し、RANKL 逆シグナル経路を活性化することで骨芽細胞の分化を促進することを示唆しており、生理的には骨吸収フェーズから骨形成フェーズへの移行を円滑に進めるための共役機構として機能していると考えられた。

骨吸収と骨形成を共役させる分子機構としては、従来は骨基質中に含まれる Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)、Transforming growth factor- (TGF-)等のサイトカインが骨吸収に応じて溶出し、骨芽細胞活性化を引き起こすとする仮説が提唱されてきた。しかしながら近年の研究の進展に伴い、collagen triple helix repeat containing 1 (Cthrc1)、sphingosine-1-phosphate (S1P)、bone morphogenetic protein 6 (BMP6)、Wnt10b など様々な分子が破骨細胞より分泌され、骨芽細胞の分化・活性化を制御していることが示唆されており、骨吸収と骨形成の共役は従来想定されていたよりも遙かに複雑で、時空間的に精密に制御された分子機構によって媒介されていることが明らかになりつつある。加えて、骨粗鬆症治療の第一選択として用いられる破骨細胞抑制薬は、破骨細胞から供給されるはずの共役因子を枯渇させるため、骨形成にも強い抑制が生じる。これが非定型大腿骨骨折頻度の上昇や顎骨壊死など、临床上の問題に繋がる可能性が指摘されている。

一方、骨芽細胞の分化成熟に関して、Wnt シグナル経路が重要な役割を果たすことが、これまで数多く報告されている。このシグナル経路には、19 種類のリガンド分子群 Wnt と 10 種類の G タンパク質共役受容体群 Frizzled (Fzd) が関与しており、多様な下流シグナルを活性化することが知られている。特に、Wnt-Fzd に加えて共受容体である Lrp5 or Lrp6 を含む三者複合体を形成して -catenin の蓄積と核内移行をトリガーする古典的経路は、骨芽細胞の分化を促進することが指摘されている。この他にも、別の共受容体である Ror2などを介して活性化される PCP 経路では、JNK や Rho の活性化が引き起こされる。さらに、共受容体が介在せずに活性化する Ca^{2+} 経路などが存在し、どのような Wnt-Fzd の組み合わせが生理的に主要な役割を果たしているのか、あるいは下流シグナルの活性化バランスは、骨芽細胞分化にどのように寄与するのかなど、詳細は不明な点が多かった。さらに、RANKL 逆シグナル経路と、Wnt シグナル経路が、どのような分化タイミングで機能し、相互にどのようなクロストークをして骨芽細胞の分化を制御しているのか、その全体像に関しては全く明らかとなっていなかった。

Wnt シグナル経路の全体像に不明な点が多い最大の原因としては、Wnt-Fzd-共受容体の組み合わせが非常に膨大な数となり、遺伝学的手法でこれらを逐一解析することは、極めて困難なことが挙げられる。そこで我々はマウス cDNA より、Wnt19 種類・Fzd10 種類、および共受容体である Lrp5/6、マウス Ror1/2 それぞれに関して遺伝子を単離し、アデノウイルス発現ベクターを構築した。また、下流シグナル伝達経路の活性化を定量的に評価するため、TCF/LEF 応答配列 (古典的経路) AP-1 応答配列 (PCP 経路) NFAT 応答配列 (Ca^{2+} 経路) cAMP 応答配列 (cAMP 経路) を luciferase の上流に配置した、レポーターアッセイ用のアデノウイルス発現ベクターも構築した。予検討として、これらのアデノウイルス発現ベクターを組み合わせる骨芽細胞培養系に感染させ、化学発光手法によって luciferase の発現誘導を評価することで、シグナル伝達経路の活性化を、再現性良く定量評価できることを確認した。

2. 研究の目的

上述した背景に基づいて、Wnt シグナル経路の活性化パターン網羅的に定量評価する解析手法と、RANKL 逆シグナルを活性化する刺激手法を組み合わせることで、骨芽細胞の分化成熟過程における、RANKL 逆シグナル経路の役割と Wnt シグナル経路の役割の位置付けや、これらのシグナル経路間の相互作用を解析し、骨芽細胞分化の制御機構に関する新たな知見を得ることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) Wnt シグナル経路の下流活性化パターン測定-1

予検討によって設定された条件を用い、各シグナル伝達経路に対応するレポーター (Fluc) アデノウィルスと、Wnt、Fzd および共受容体の網羅的な組み合わせを混合して MC3T3-E1 細胞へ導入し、各シグナル経路活性化度の定量的な評価を試みた。またこの際に、Wnt-Fzd-共受容体の組み合わせの違いによって、細胞増殖速度や細胞生存率に差異が生じた部分を補正するため、細胞数を反映する指標としてウェルあたりの ATP 量を測定し、Fluc 活性値を対応する ATP 量で補正することで、各経路の定量的な活性化プロファイルを取得した。

さらに、Wnt-Fzd-共受容体の組み合わせが、骨芽細胞の分化に与える影響を定量的に評価するため、Wnt、Fzd および共受容体の網羅的な組み合わせを混合して MC3T3-E1 細胞へ導入した上で、ALP 酵素活性の測定を行った。また上記と同様に、細胞増殖速度や細胞生存率の差異をウェルあたりの ATP 含量で補正した。

(2) Wnt-Fzd-共受容体の組み合わせによって影響を受けにくい発現プロモータの探索

上記の網羅的な活性化プロファイルの取得を行った後、次の段階の予検討を進める過程で、共導入した Wnt-Fzd-共受容体の組み合わせに依存して、導入した遺伝子の発現量が非常に大きく変動し、それが下流活性化プロファイルの定量的な評価結果に対しても影響を与えている可能性が見出された。そこで、上記の検討で導入遺伝子の発現に利用している CMV プロモータの下流にウミホタルルシフェラーゼ (Rluc) を配置した、恒常発現型レポーターアデノウィルスを構築し、複数の Wnt-Fzd-共受容体の組み合わせと共に導入することで、CMV プロモータによる遺伝子発現効率に対する影響を評価した。

この検討から CMV プロモータの転写活性が、共導入した Wnt-Fzd-共受容体の組み合わせに依存して大きく変化することが判明したため、共導入する組み合わせに影響を受けにくく、かつ安定して高い発現効率を達成できるプロモータを探索した。TK、EF1、SV40、UbC、CAG の 5 種類の恒常発現型プロモータの下流に Fluc を配置したレポータープラスミドを作成し、様々な Wnt-Fzd-共受容体の組み合わせの影響を評価した。

(3) Wnt シグナル経路の下流活性化パターン測定-2

共導入した Wnt-Fzd-共受容体の組み合わせによる影響が最も少ない UbC プロモータを採用し、Wnt、Fzd および共受容体を導入するためのアデノウィルス発現ベクターを全て再構築し直した。その後、全ての Wnt-Fzd-共受容体の組み合わせに関して、(1)と同様に各シグナル経路活性化度の定量的な評価を実施した。また、細胞増殖速度や細胞生存率の影響に加えて、UbC プロモータによる転写活性の変化も考慮に入れた補正を行うため、UbC プロモータ下流に Fluc を配置した恒常発現型レポーターアデノウィルスを構築し、各 Wnt-Fzd-共受容体の組み合わせと共に導入して測定した値を補正に用いた。

(4) RANKL 逆シグナルの活性化を生体内で誘導できる改変抗体の作出

破骨細胞由来の膜小胞型 RANK や、RANKL 分子間を架橋できる抗 RANKL scFv 三量体は、循環血液中に投与した際の半減期が短く、生体レベルで RANKL 逆シグナルを活性化した際の影響を評価することが難しく、Wnt シグナル経路とのクロストークを評価するためには、ツールとして利用する RANKL 逆シグナル活性化コンストラクトの改善が必要と考えられた。そこで、IgG Fc 領域との融合タンパク質とすることで、循環血液中での半減期を大幅に延長できると考え、コンストラクト構造の探索と評価を行った。

構築したコンストラクトを用いて、RANKL 逆シグナルを生体レベルで活性化した際に、骨代謝に対してどの様な影響が生じるか、閉経後骨粗鬆症モデルマウスを用いて解析した。

(5) Wnt/Ca²⁺経路の活性化に関与する分子機構の探索

Wnt シグナル経路の活性化パターンを(3)の検討で再取得した上で、RANKL 逆シグナルとのクロストーク解析を行うための準備となる予検討を進めたが、その中で MC3T3-E1 細胞における Ca²⁺経路の活性化は百日咳毒素による処理で阻害されることが確認され、Fzd が G_{i/o} 共役型の GPCR であるとする、従来の報告と一致することを確認した。また、これが Ca²⁺経路の活性化度合いが cAMP 経路の活性化度合いと、全体的に逆相関傾向を示す理由と考えられた。ところがさらに予検討を進める過程で、Ca²⁺経路の活性化は細胞種に大きく依存し、同じ間葉系の細胞であっても筋芽細胞株である C2C12 細胞では、MC3T3-E1 細胞で Ca²⁺経路を強く活性化する Wnt-Fzd-共受容体の組み合わせを導入した場合にも、全く活性化が認められないことが明らかとなった。C2C12 細胞では、Wnt 古典経路の活性化は強く認められ、また Fzd 以外の G_{i/o} 共役型の GPCR を介した刺激応答は認められるため、Wnt 刺激による Ca²⁺経路の活性化には、通常の G_{i/o} 共役型 GPCR には関与しない、未知の分子機構が介在する可能性が示唆された。またこの分子機構の発現は細胞種への依存性が高いと考えられた。そのため、MC3T3-E1 細胞において、Fzd と相互作用する分子のスクリーニングを行った。Flag タグを付加した Fzd8 を細胞に導入し、細胞膜透過性のタンパク質架橋剤で処理した後、抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降を行なって、Fzd8 に相互作用する分子を解析した。

活性を付与するため、分子全体として4価のRANKL結合部位を有する分子設計を採用した。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スクリーニングし、最もRANKL逆シグナル入力活性の高いコンストラクトを採用した。得られたコンストラクトを、卵巣摘出マウスに対して単回静脈内投与し、大腿骨を単離して骨形態計測を行った。その結果、RANKL逆シグナルを活性化できる抗RANKL改変抗体を投与した群では、成熟破骨細胞形成を効果的に抑制する一方で、骨形成速度の低下は回避され、*in vivo*でもRANKL逆シグナルの活性化によって骨芽細胞の分化を促進して、脱共役状態を達成できていることが確認された。

(5) Wnt/Ca²⁺経路の活性化に関する分子機構の探索

Wntシグナル経路に関し、下流シグナル経路の活性化パターンを網羅的に取得する方法論が確立でき、またRANKL逆シグナル経路を*in vivo*でも活性化できる抗RANKL改変抗体も取得できたため、引き続きWntシグナル経路とRANKL逆シグナル経路の相互作用に関して検討を進める予定であったが、予検討を進める過程で、全く想定していなかった知見が得られた。すなわち、MC3T3-E1細胞においてCa²⁺経路の活性化が認められたWnt-Fzdの組み合わせを、C2C12細胞に導入した場合、いずれの組み合わせにおいても活性化は認められなかった。このような細胞種に強く依存するWntシグナル経路の活性化パターンが明らかになったため、MC3T3-E1細胞で得られた結果が、生理的な骨芽細胞に対して外挿できるかが必ずしも明らかでない状況となった。この点を明確にするためには、Wnt刺激によってCa²⁺経路の活性化が生じる分子機構を特定することが、より優先度の高い解析であると考え、計画を変更して分子機構の探索を試みた。

MC3T3-E1およびC2C12細胞にN末端にHisタグを付加したFzd8およびWnt8a/Lrp5を導入し、タンパク質架橋剤で処理した後、Fzd8分子を含むタンパク質複合体を回収した。得られたタンパク質複合体をプロテオミクス解析したところ、MC3T3-E1細胞選択的に13種類のタンパク質が同定された。これらの分子に対するshRNAを導入し、Wnt8a-Fzd8-Lrp5によって誘導されるレポーターの活性を評価した。その結果、Trpp2の遺伝子発現抑制に伴ってレポーター活性の減弱が認められた。Trpp2はPkd1や、Trpc1あるいはTrpv4と複合体を形成して細胞膜に局在し、Ca²⁺透過性のカチオンチャンネルを形成することが知られている。そこで、EGTAをメディウム中に添加してCa²⁺をトラップすると、Wnt8a-Fzd8-Lrp5によるレポーターの活性誘導は強く抑制され、Wnt刺激に応答したCa²⁺動員は、細胞外からであることが明らかとなった。さらに、Trpcファミリーの阻害剤で処理した場合にも、レポーター誘導の強い抑制が観察された。一連の結果から、MC3T3-E1細胞においては、Wnt刺激に応じて細胞膜上のTrpp2-Trpc複合体が活性化され、細胞外からCa²⁺が動員される、という分子機構によって活性化が生じている可能性が示唆された。C2C12細胞においてはTrpp2の共沈降は認められず、Trpp2-Trpc複合体との共役の有無が、Wnt刺激によるCa²⁺経路の活性化の有無を決定している可能性が考えられた。

一連の解析を通じて、RANKL逆シグナルが生体レベルでも、骨吸収と骨形成の共役に関与している可能性をサポートする結果が得られ、骨吸収と骨形成の脱共役を達成できる新たな創薬標的になり得ることが示唆された。また、Wntシグナル経路の下流活性化パターンの定量的な測定手法が完成し、想定外の知見として、Wnt刺激に応じたCa²⁺経路の活性化は、Trpp2-Trpc複合体の活性化と共役した細胞外からのCa²⁺動員が必須となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikebuchi Y, Aoki S, Honma M, Hayashi M, Sugamori Y, Khan M, Kariya Y, Kato G, Tabata Y, Penninger JM, Udagawa N, Aoki K, Suzuki H	4. 巻 561(7722)
2. 論文標題 Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 195-200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-018-0482-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 本間雅, 池淵祐樹	4. 巻 -
2. 論文標題 RANKL逆シグナルによる骨吸収と骨形成の共役	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ライフサイエンス新着論文レビュー	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7875/first.author.2018.095	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sone E, Noshiro D, Ikebuchi Y, Nakagawa M, Khan M, Tamura Y, Ikeda M, Oki M, Murali R, Fujimori T, Yoda T, Honma M, Suzuki H, Ando T, Aoki K	4. 巻 509(2)
2. 論文標題 The induction of RANKL molecule clustering could stimulate early osteoblast differentiation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 435-440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.12.093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 池淵祐樹、本間雅、苅谷嘉顕、鈴木洋史
2. 発表標題 骨芽細胞に発現するRANKLはカップリング・シグナルを受容する
3. 学会等名 第40回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masashi Honma
2. 発表標題 Osteoblastic RANKL acts as an osteogenic signal acceptor recognizing vesicular RANK secreted from osteoclasts
3. 学会等名 ASEMV2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masashi Honma, Yuki Ikebuchi, Yoshiaki Kariya, Hiroshi Suzuki
2. 発表標題 Osteoblastic RANKL acts as an osteogenic signal acceptor for vesicular RANK derived from maturing osteoclasts
3. 学会等名 AAPS PharSci360 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本間雅, 池淵祐樹, 林円香, 青木和宏, 苅谷嘉顕, 鈴木洋史
2. 発表標題 カップリング機構におけるRANKLの役割
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 本間雅, 池淵祐樹, 林円香, 苅谷嘉顕, 鈴木洋史
2. 発表標題 骨吸収と骨形成のカップリングにおけるRANKLの役割
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

【プレスリリース】骨芽細胞のRANKLが骨形成を促進する創薬標的になることを発見
http://www.h.u-tokyo.ac.jp/press/press_archives/20180906.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 洋史 (Suzuki Hiroshi) (80206523)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	