

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659668

研究課題名(和文)骨形成低下を生じない抗RANKL抗体の開発

研究課題名(英文)Development of anti-RANKL antibody without the suppression of bone formation

研究代表者

本間 雅 (HONMA, Masashi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60401072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：RANKLは成熟破骨細胞形成を刺激する分子であり、RANKL中和抗体が成熟破骨細胞の形成を抑制できることは既に知られている。一方我々は、骨芽細胞に発現するRANKLは、シグナル受容分子としても機能し、骨形成上昇に寄与することを見出している。従って、RANKL細胞外ドメインを標的とし、骨形成を上昇させると共に骨吸収を抑制する分子の創製が可能であると考えた。標的に対する高い選択性、将来的な医薬品への応用性を考慮し、完全ヒト型抗体フラグメントを用いて分子の創製を試みた。その結果、三量体化した単鎖ヒト型抗体可変領域として、上述の条件を満たす組み換えタンパク質の取得に成功した。

研究成果の概要(英文)：RANKL is known as a signal input molecule which stimulates mature osteoclast formation, and anti-RANKL neutralizing antibody can suppress osteoclast formation in vivo. By contrast, we have shown that osteoblastic RANKL acts as a signal accepting molecule for osteoclast-derived RANK and up-regulates bone formation. Based on these results, we hypothesized that a properly designed macromolecule, which binds RANKL extracellular domain, can stimulate bone formation and inhibit bone resorption simultaneously. We screened human single chain Fv library and finally obtained a clone which stimulates bone formation and suppress bone resorption simultaneously as a trimer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨代謝 骨形成 骨吸収 シグナル伝達 薬理活性

## 1. 研究開始当初の背景

生体内の骨量は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が協調的に行われることにより、一定に維持されている。両者のバランスが破綻することで骨密度が過度に低下した病態が骨粗鬆症であり、これが起因となって生じる椎体・大腿骨などの骨折は、患者の生命予後にも影響を与えうる重要な臨床上の課題となっている。

現在、骨粗鬆症治療薬として臨床で広汎に使用されているビスフォスフォネート系薬物は、亢進した骨吸収を強く抑制することで骨量を回復させるが、これは同時に、骨吸収にカップルして生じる骨形成の抑制にも繋がり、骨新陳代謝の全体的な低下を引き起こすことが知られており、これが顎骨壊死や大腿骨非定型骨折の頻度増加など、ビスフォスフォネート系薬物の使用に伴う特徴的な副作用の発現に繋がる可能性が指摘されている。この点は、成熟破骨細胞形成シグナルを遮断することで骨吸収を強力に抑制する抗体薬剤であるデノスマブに関しても同様に成立するものと考えられている。一方、骨形成を促進する薬剤として臨床使用可能なものは、現状では組み換えパラチロイドホルモン製剤であるテリパラチドのみであるが、これは同時に骨吸収を促進する作用も有しており、長期の使用に伴って骨吸収促進作用が優位となってくることから、使用期間に制限がある。これら既存の骨粗鬆症治療薬に伴う臨床上の問題点を克服できる、新規治療標的の同定は喫緊の課題である。

Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B (RANK) Ligand (RANKL)は、成熟破骨細胞の形成を刺激するシグナル入力分子として知られており、骨代謝回転を制御する中心的な分子の一つである。申請者がこれまで、骨芽細胞における RANKL 分子挙動制御に着目した分子論的研究を進めてきた結果、骨芽細胞表面に局在する RANKL 分子は、RANK 結合刺激を受容する機能を有し、骨芽細胞内に逆シグナルを発生することを見出した。また研究開始段階では、RANK と結合した RANKL が骨芽細胞膜表面においてクラスターを形成することがトリガーとなって、RANKL 細胞内ドメインに存在するプロリンリッチ・モチーフに SH3 ドメインを有する細胞内シグナル関連分子群が結合することが明らかとなっていた。申請者らは、この RANKL 逆シグナル伝達経路が、成熟破骨細胞から骨芽細胞に向けたカップリングシグナルを媒介する可能性を想定し、本研究と並行して検討を進めている。

## 2. 研究の目的

従来、破骨前駆細胞への RANKL シグナル入力を生理的に担っている細胞は骨芽細胞

であると考えられてきた。しかしながら、本研究を開始する直前の 2011 年末に、遺伝学的アプローチを用いた複数の研究から、破骨前駆細胞へのシグナル入力を生理的に担っているのは主として骨細胞であることが報告された。このため、破骨前駆細胞へのシグナル入力が必要な生理機能と考えられてきた、骨芽細胞に発現する RANKL 分子の生理的役割が不明瞭となった。当研究室では、先述したように、骨芽細胞に発現する RANKL がシグナル受容分子として機能する可能性を見出し、検討が進められていた。その結果、破骨細胞はその成熟過程において、RANK を含む膜小胞エクソソーム(OC エクソソーム)を分泌し、これが骨芽細胞表面に発現する RANKL に結合することにより、骨芽細胞内にシグナルが入力され、PI3K-Akt-mTORC1 経路の活性化と、その下流における Runx2 核内移行の促進が生じる結果、骨芽細胞の骨形成能が上昇することが明らかとなった。RANK 細胞外ドメインを表面に固相化したポリスチレンビーズを用いて骨芽細胞を刺激した場合も、OC エクソソームによる刺激と同様のシグナル経路活性化が認められ、骨芽細胞表面に発現する RANKL 分子を架橋することが、骨芽細胞内シグナルを発生させるトリガーとなっている可能性が示唆された。また、RANKL 骨芽細胞内シグナルが新規骨形成促進薬の標的として有用な可能性が想定された。

このような研究経過に基づくと、RANKL 細胞外ドメインに結合する抗体フラグメントをスクリーニングすることで、骨細胞表面の RANKL に結合して破骨前駆細胞へのシグナル入力を阻害し、骨吸収抑制効果を示すと同時に、骨芽細胞表面の RANKL 分子に結合して架橋することで骨芽細胞内へシグナルを入力し、骨形成促進効果を示す、バイファンクショナルな分子を創製することが可能であると考えられた。

## 3. 研究の方法

RANKL 細胞外ドメインに結合するヒト抗体可変領域フラグメントの取得

従来頻用されているモノクローナル抗体の取得手法としては、マウスなどの動物を標的抗原で免疫し、ハイブリドーマ細胞株を樹立する手法が挙げられるが、将来的な医薬品への応用を念頭に置いた場合、取得された抗体分子から CDR グラフティングなどの手法を用いてヒト抗体化する必要が生じると考えられ、この点に技術的な問題が生じる可能性が想定された。また一般的に、内因性タンパク質の細胞外ドメインに対する抗体の取得を効率的に行うには、ヒト抗原を免疫に用いる場合であっても、当該タンパク質を欠損したマウスなどを免疫動物として用いる必

要があることも報告されている。このため本研究においては、RANKL 細胞外ドメインに結合する抗体の取得に、CDR2 および CDR3 領域がランダム化された単鎖化ヒト抗体可変領域フラグメント (single chain Fv, scFv) を提示するファージライブラリーを採用することとした。スクリーニングに用いる抗原 (ペイト) としては、取得する候補クローン数を最大化するため、ヒトおよびマウス双方の RANKL 細胞外ドメインを用いることとし、細胞外ドメインの N 末端に glutathione S-transferase (GST) を融合した組み換えタンパク質を、それぞれ大腸菌発現系を用いて調製して使用した。スクリーニング実施においては、GST に対して反応性を示すファージを予め除いた後、マウスあるいはヒト GST-RANKL に対して結合性を有するファージを回収する、という一連のアフィニティパンニングのサイクルを合計 3 回繰り返した後、ファージクローンを単離した。次いで、単離された各ファージクローンを大腸菌に感染させて増幅し、培地を回収して未精製のファージ溶液として用い、RANKL 細胞外ドメイン組み換えタンパク質を固相化した ELISA プレートに添加し、シグナル強度の評価を行った。次いで、結合性の確認された各独立ファージクローンを大腸菌に感染させて増幅し、PEG 沈殿手法を用いてファージ粒子を精製し、PBS に再懸濁して精製ファージ溶液を調製し、結合性の再確認を行った。

また、大腸菌発現系を用いて調製した RANKL 細胞外ドメイン組み換えタンパク質は、糖鎖修飾を受けていないと考えられるが、実際にマウスあるいはヒトなどの哺乳類細胞に発現している RANKL 分子に関しては、細胞外ドメインに複数の糖鎖修飾を受けていることが報告されている。そのため、大腸菌発現系から得られた未修飾の組み換えタンパク質に対する結合性と、糖鎖修飾を受けたタンパク質への結合性には差異が生じる可能性が想定される。そこで、N 末端に 3×FLAG タグを付加した全長マウス RANKL (FLAG-RANKL) をコードする遺伝子を、ヒト由来 293FT 細胞に導入して強制発現させ、糖鎖修飾を受けた全長 RANKL 分子に対する結合性を評価することとした。抗 FLAG 抗体を用いて ELISA プレートに FLAG-RANKL 分子を固相化し、精製ファージ溶液を用いて結合性を評価した。

#### scFv 三量体組み換えタンパク質の RANKL 細胞外ドメインへの結合性評価

本研究においては、RANKL から RANK 方向へのシグナル入力を遮断すると同時に RANKL 骨芽細胞内シグナルを入力できる分子を創製すれば、生体に投与した際に骨代謝のバランスを大きく骨形成側に傾けることが可能であるか? という点を検証することを目標としている。そこでまず、大腸菌発現

系を用いて比較的容易に大量の組み換えタンパク質を取得できる可能性のある scFv フラグメントを用いて検討を進めることとした。またこの際、RANKL 分子間を架橋するためには一分子内に複数の抗原結合部位を有する必要があること、および単量体 scFv の分子量が約 25kDa と小さいため、生体に投与した際に糸球体濾過を受けることが予想され、血中半減期が非常に短くなると推定されること、などを踏まえて三量体 scFv への組み換えを試みることにした。前項で得られた、マウス RANKL 細胞外ドメインに対して結合性を示したファージクローン 9 種類に関して、scFv の C 末端側にイソロイシンジッパー (ILZ) 配列を導入することで三量体を形成できるように組み替えたタンパク質を、大腸菌発現系を用いて取得し、三量体化した scFv 組み換えタンパク質としての RANKL 細胞外ドメイン結合性を評価した。

#### in vitro で骨形成促進能・骨吸収抑制能を有する scFv の選択

次いで、骨細胞が破骨前駆細胞に RANKL シグナルを入力することで成熟破骨細胞が形成される過程に対する、各 scFv の阻害効果を評価した。成熟破骨細胞形成を in vitro で評価するためのアッセイ系としては、破骨前駆細胞のソースとしてマウス脛骨より単離した骨髄マクロファージを用い、可溶性の RANKL 組み換えタンパク質を用いて刺激することで成熟破骨細胞の形成を誘導する系が良く知られている。また、最近当研究室で確立された手法として、幼若マウス頭蓋骨由来の初代骨細胞をコラーゲンゲル内に包埋培養し、多孔質フィルターを挟んで骨髄マクロファージと共培養することで、成熟破骨細胞の形成を誘導することも可能である。そこで本研究においては、両者の系を用いて scFv 三量体組み換えタンパク質の成熟破骨細胞形成に対する阻害能の評価を行った。成熟破骨細胞形成の指標としては、特異的マーカー酵素である酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (TRAP) 活性を用いた。

成熟破骨細胞形成に対する阻害能の評価と併せ、骨芽細胞内シグナル入力能に関しても評価を行った。当研究室の過去の検討から、マウス由来骨芽細胞様培養細胞である ST2 細胞に対して、破骨細胞由来 RANK 含有エクソソーム (OC エクソソーム) による刺激を行った場合、RANKL 細胞内ドメインのプロリンリッチ・モチーフを介して SFKs の活性化が生じ、その下流で PI3K、Akt、mTORC1 の活性化が生じ、骨形成活性の上昇に繋がること示されている。そこで本研究では、ST2 細胞に対して scFv 三量体による刺激を行い、PI3K の活性化および mTORC1 の活性化をモニターすることで、骨芽細胞内シグナル入力能を評価することとした。PI3K 活性化の指標としては、Akt

Thr308 残基のリン酸化を、mTORC1 活性化の指標としては、S6K1 Thr389 残基のリン酸化を、それぞれイムノブロット手法を用いて検出することとした。

IM2-35 由来 scFv 三量体の投与が生体レベルで骨代謝回転に与える影響の評価

骨芽細胞の活性化効果および成熟破骨細胞の形成抑制効果が認められた IM2-35 由来 scFv 三量体に関して、生体に投与した際に骨代謝に与える影響を評価することで、RANKL 細胞外ドメインを標的としたバイファンクショナルな分子の創製が可能であるか、という点を検証することができると考えられた。予備的な検討によって scFv 三量体のマウスにおける血中滞留性を見積もったところ、血中半減期は 12 時間以内と推定されたため、1 日 2 回腹腔内投与を行うことで血中濃度を維持することとし、投与開始後 1 週間および 2 週間の時点で採血し、骨代謝回転を反映する血清中バイオマーカーを測定することとした。また、成熟破骨細胞にアポトーシスを誘導することで、骨吸収を強力に抑制するビスフォスフォネート系の薬剤である zoledronate を静脈内投与した群を比較対照として設定した。骨吸収の指標としては TRAP5b 値を、骨形成の指標としては procollagen type 1 n-terminal peptide (P1NP) 値を採用し、それぞれ対応する ELISA キットを用いて測定した。

#### 4. 研究成果

RANKL 細胞外ドメインに結合するヒト抗体可変領域フラグメントの取得

シグナルが検出されたクローンに関し、ファージミドを抽出し scFv をコードする領域の塩基配列を決定した結果、マウス RANKL 細胞外ドメインに対して行ったスクリーニングでは、アミノ酸配列の独立したファージクローンが 13 種類、ヒト RANKL 細胞外ドメインに対して行ったスクリーニングでは、独立ファージクローン 20 種類が得られた。

マウス RANKL 細胞外ドメインに結合する候補クローンとして得られた 13 種類に関して、精製ファージ溶液を用いて RANKL 細胞外ドメインに対する結合性を再評価したところ、強い結合性が確認できたものは 7 種類であった。さらに、哺乳類由来全長 RANKL 分子への結合性の確認を行ったところ、6 種類のクローンにおいて結合性が確認された。

一方、ヒト RANKL 細胞外ドメインに結合する候補クローンとして得られた 20 種類に関しては、本研究では通常のマウスモデルを用いて評価を行う必要があることを考慮し、マウス RANKL に対して交叉結合性を有するクローンを選択することとした。上述と同様の手法を用い、マウス FLAG-RANKL に対す

る交叉結合性を評価した結果、2 種類のクローンのみが、哺乳類細胞由来のマウス RANKL 分子に対して強い結合性を示すことが明らかとなった。

scFv 三量体組み換えタンパク質の RANKL 細胞外ドメインへの結合性評価

で得られた各クローンに関して、それぞれ scFv 三量体へ組み換えを行い、大腸菌由来の GST-RANKL、および哺乳類細胞由来の FLAG-RANKL それぞれに対し、上述と同様の ELISA 手法を用いて評価した結果、IM1-1 クローン由来の scFv 三量体に関しては著しく親和性が弱かったものの、いずれの scFv 三量体に対しても RANKL 細胞外ドメインに対する親和性が維持されていることが確認された。

in vitro で骨形成促進能・骨吸収抑制能を有する scFv の選択

まず、可溶性 RANKL による刺激を用いたアッセイ系で評価を行った結果、RANKL 細胞外ドメインに対するアフィニティが著しく低かった IM1-1 クローン由来の scFv では、TRAP 活性誘導に対する阻害効果が低かったものの、いずれの scFv 三量体に対しても、培地への添加濃度依存的な成熟破骨細胞の形成抑制効果が確認された。また、骨細胞との共培養系に scFv 組み換えタンパク質を添加し、同様の評価を行ったところ、可溶性 RANKL による刺激を用いた系と一致する結果が観察された。

さらに、ST2 細胞を用いたシグナル入力能の評価を行った結果、複数のクローン由来の scFv 三量体に関してシグナル入力能が確認され、特に IM2-35 クローン由来の scFv 三量体に関しては、強いシグナル入力能を有していると考えられた。成熟破骨細胞形成に対する阻害活性と併せて考えた場合、創薬標的としてのコンセプトを検証する目的では IM2-35 クローン由来の scFv 三量体を用いるのが最適であると考えられた。

そこで、IM2-35 由来 scFv のシグナル入力能に関して詳細な解析を行うこととした。上述と同様に ST2 細胞を用い、scFv の添加濃度に対する依存性と経時的なシグナル経路活性化プロファイルを検証したところ、IM2-35 由来 scFv の培地中への添加濃度依存的にシグナル入力強度も増加する傾向が確認されると共に、刺激開始から徐々にシグナル経路の活性化度が上昇し、刺激後 60 分までシグナル入力強度が上昇することが明らかとなった。これは、過去に OC エクソソームで刺激を加えた際に刺激早期からシグナル経路の強い活性化が生じる点と異なっているが、エクソソームが多数の RANK を含み多点で結合するのに対し、scFv 三量体は結合点が 3 か所であるため、安定に結合して

RANKL 分子間の架橋が形成されるまでに、ある程度の時間を要するためと推測された。一連の検討結果より、IM2-35 由来 scFv 三量体は、in vitro において骨形成促進活性および、成熟破骨細胞形成抑制活性の両者を有していると考えられた。

IM2-35 由来 scFv 三量体の投与が生体レベルで骨代謝回転に与える影響の評価

上記の結果を踏まえ、IM2-35 クローン由来の scFv 三量体タンパク質に関して、in vivo で骨代謝回転に与える影響に関して検討を加えた。その結果、IM2-35 由来 scFv 三量体を投与した群では、TRAP5b の値が持続的に低下し、投与後 2 週間の時点では zoledronate 投与群と同等のレベルに到達することが明らかとなり、IM2-35 由来 scFv 三量体は生体レベルでも骨吸収を抑制する活性を有していると考えられた。これに対し、骨形成を反映する P1NP 値に関しては、zoledronate 投与群においては投与後 2 週間で低下していく傾向が確認され、骨吸収の強力な抑制にカップリングして骨形成の低下が生じ始められていると考えられた一方で、IM2-35 由来 scFv 三量体を投与した群では、投与後 1 週間の段階から顕著な上昇が観察され、IM2-35 由来 scFv 三量体は生体レベルでも骨形成を促進する活性を有していると考えられた。一連の結果から、RANKL 細胞外ドメインに相互作用し、破骨前駆細胞へのシグナル入力を遮断して成熟破骨細胞の形成を抑制すると同時に、骨芽細胞表面において RANKL 分子間を架橋することでシグナルを入力し、骨形成を促進する活性を同時に有する分子の創製が可能であることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Masashi Honma, Yuki Ikebuchi, Yoshiaki Kariya, and Hiroshi Suzuki  
Regulatory mechanisms of RANKL presentation to osteoclast precursors.  
*Current Osteoporosis Report*, Vol. 12, Issue. 1, pp.115-120, 2014  
doi: 10.1007/s11914-014-0189-0.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：抗 RANKL 抗体

発明者：本間 雅、鈴木 洋史、苅谷 嘉顕、

林 円香、池淵 祐樹  
権利者：国立大学法人東京大学  
種類：特許  
番号：特願 2014-030349 号  
出願年月日：平成 26 年 2 月 20 日  
国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

本間 雅 (HONMA, Masashi)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：60401072

##### (2)研究分担者

該当なし

##### (3)連携研究者

該当なし