

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26713045

研究課題名(和文) RANKL逆シグナルの発見に基づいた関節リウマチ発症機構の解析

研究課題名(英文) Analysis on the influence of RANKL reverse signaling in the development of rheumatoid arthritis

研究代表者

池淵 祐樹 (Ikebuchi, Yuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20645725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：RANKL分子の架橋により生じるRANKL逆シグナルが、骨芽細胞・骨細胞に加えて、RANKLを発現する軟骨細胞、活性化T細胞、滑膜線維芽細胞においても機能する可能性を検証するため、各組織のバランス崩壊による疾患モデルとして関節リウマチを考え、各細胞でのRANKL逆シグナルの影響を評価した。RANKL逆シグナルの強い入力活性を示す抗RANKL抗体様分子を創出し、各細胞を刺激した結果、軟骨細胞の分化に対しては負に作用したのに対し、T細胞活性化、滑膜線維芽細胞の増殖を促進する傾向が認められた。また、逆シグナルの減弱する点変異KIマウスにおいては、僅かに関節炎の誘導強度が減弱する様子が観察された。

研究成果の概要(英文)：We revealed that RANKL reverse signaling plays the significant roles in the cycle of bone resorption and formation. RANKL is expressed in chondrocytes, activated T cells, and synovial fibroblasts as well as osteoblasts/osteocytes. In the development of rheumatoid arthritis, the imbalance of these cells differentiation and activities is observed, therefore, we analyzed on the pathological influence of RANKL reverse signaling in each cell line. At first, multimeric anti-RANKL antibody were designed for cross-linking RANKL molecules. In fact, scDb-Fc protein, which was composed of four scFv domains connected with Fc, showed strong potential of RANKL reverse signaling. Using this agonistic moiety, we confirmed the effect of RANKL reverse signaling in each cell line. Furthermore, collagen-induced arthritis model mice were used for evaluating the effects of RANKL reverse signaling in vivo.

研究分野：骨・軟骨代謝

キーワード：RANKL 関節リウマチ 細胞分化制御

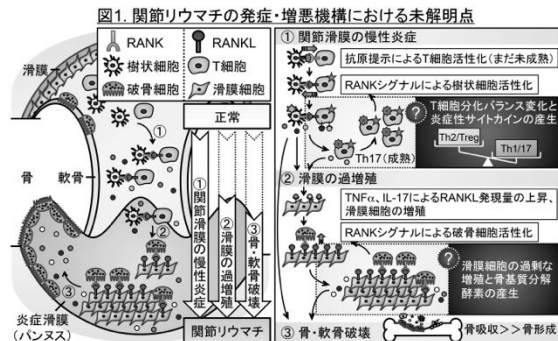
1. 研究開始当初の背景

骨代謝バランスの制御において中心的な役割を担う Receptor activator of NF- κ B (RANK)および RANK ligand (RANKL)は、破骨前駆細胞に発現する RANK に対して骨細胞から RANKL が直接提示されることでシグナルが入力され、下流の遺伝子調節とともに破骨細胞の分化・成熟が促進される。リガンド分子である RANKL が属する TNF super family に関しては、近年、受容体へとシグナルを入力するだけでなく、受容体との結合を引き金としてリガンド側の細胞内ドメインの構造が変化し、細胞内へとシグナルが発生することが報告されている。研究代表者らは、RANKL においてもこの双方向性のシグナル制御機構が存在していることを骨芽細胞、骨細胞においても見出し、「RANKL 逆シグナル」としての機能解析を進めている。

骨代謝制御において、骨細胞の RANKL が破骨前駆細胞の RANK と接触し、破骨細胞の形成を促進する際に、同時に骨細胞内へと RANKL 逆シグナルが入力される。すると、通常は大部分が分泌性リソソームに局在する RANKL 分子は、細胞間接触が認められる刺激局所の細胞表面へと効率的に輸送される (Honma M, *J Bone Miner Res*, 2013)。さらに、成熟した破骨細胞から RANK を搭載した膜小胞が分泌され、骨芽細胞の RANKL に対して逆シグナルを入力し、骨形成を促進することを認めている (Nature 誌に投稿中)。骨吸収・骨形成の一連のカップリング現象において、同一の分子が両経路の活性調節を行なっている例は他に報告がなく、骨代謝機構の全体像の理解を深める、非常に重要な発見と考えている。

RANKL 分子の組織発現分布は限られており、骨芽細胞、骨細胞に加えて、軟骨細胞、活性化 T 細胞、滑膜線維芽細胞での発現が確認されている。これまで、RANKL を遺伝子的に欠損させたノックアウトマウスを用いた解析からは、骨吸収が起こらないために大理石様の骨組織異常が引き起こされるだけでなく、特に発生段階においてリンパ節の形成異常が確認されているが、免疫系やその他の RANKL 発現組織において、RANKL がどのような機能を発揮しているのか、解明は進んでいない。本研究では、骨代謝制御に加えて、RANKL 逆シグナルが生体内の様々な恒常性維持に関わっている可能性を検証する目的で、リウマチ性関節炎をモデルとして用いることとした。リウマチ性関節炎は、関節滑膜の慢性炎症を首座とする難治性自己免疫疾患であり、免疫系及び骨代謝異常が相互に関連しながら同時に進行する。病態の発症は、免疫系の異常による全身性の慢性炎症が起点となり、関節の駆動に不可欠な滑膜に樹状細胞や T 細胞等の炎症細胞が浸潤する。活性化した未分化な T 細胞に発現する「リガンド」RANKL から、樹状細胞上の「受容体」RANK へと「RANK シグナル」が入力され

ると、樹状細胞は TNF α や IL-6 等のサイトカインを分泌する。これらは破骨細胞に直接作用してその活性を高めるだけでなく、滑膜細胞の増殖とともに RANKL の発現を誘導する。その結果、滑膜細胞 RANKL と破骨細胞 RANK の接触を介して破骨細胞に RANK シグナルが発生し、骨吸収が亢進し関節の破壊に至る。この一連の病態進展・悪化サイクルにおいて、Th0 細胞から Th17 細胞へと分化する際には細胞内での mTORC1 の活性化が重要な役割を担っていること、また滑膜線維芽細胞の増殖制御過程においても mTORC1 の活性が関与していることが示唆されている。骨芽細胞、骨細胞での検討から、RANKL 逆シグナルの下流では PI3K-Akt-mTORC1 の活性化、それに伴う転写因子 Runx2 の調節が起こることが確認されている。リウマチ性関節炎に関わる複数の細胞種においても、RANKL 逆シグナルの存在が細胞内のシグナルバランスを変容させ、病態の発現・進展に関わっている可能性を想定し、本研究を計画・実施した。



2. 研究の目的

以上の背景に基づき、本研究では、リウマチ性関節炎の発症・増悪に関わる活性化 T 細胞、滑膜線維芽細胞、および病態の進展に伴い破壊される軟骨細胞において RANKL 逆シグナルの機能解析を行い、その生理的意義の解明を目的とした。さらに、骨粗鬆症に対する新規治療薬として開発を進める、RANKL 正シグナルの遮断能に加えて逆シグナルの入力活性を有する、bifunctional 型抗体がリウマチ性関節炎に対してどのような薬効を発揮するのかを検証することで、新たな作用機序に基づいた治療法の可能性を検討した。

多領域に渡る生命現象を、一つの分子がどのような選択性を持って制御するのか解き明かすことは、骨免疫学に留まらず、生命現象の多階層性の理解を促進する一例として非常に重要な研究課題である。また、人口の高齢化とともに増加傾向にあるリウマチ性関節炎の罹患率を鑑みると、臨床的にも大きな意義を持つ研究と考えている。

3. 研究の方法

(1) RANKL 逆シグナルの入力活性を有する抗 RANKL 抗体様分子の創製

RANKL 逆シグナルは、複数の RANKL 分

子が空間的近傍に架橋されることで入力されると考えられ、代表者らはこれまで、骨芽細胞におけるRANKL逆シグナルの機能解析において、RANKの細胞外領域を表面に固相化したポリスチレンビーズ、もしくは、成熟破骨細胞から放出されるRANK搭載膜小胞を用いていた。特に骨吸収-骨形成のカップリング過程においては、RANK搭載膜小胞が生理的なリガンドとして機能していると想定しているが、ビーズの接触による機械的な刺激や膜小胞に搭載されている他の分子による影響を否定できず、RANKL逆シグナルによる影響のみを独立して評価するのはやや困難であった。そのため、選択性の高いRANKL逆シグナル入力担体を得る目的で、RANKLの細胞外ドメインを標的としてファージ・ディスプレイ法による抗体配列のスクリーニングを行い、ヒトRANKL、マウスRANKLに対して共に高い結合親和性を有する複数の候補クローンを得た。骨粗鬆症治療薬として繁用される抗ヒトRANKL抗体デノスマブはシグナル入力能を示さないことが確認されていたため、より多価にRANKL分子と結合することが可能と想定される、抗体のFv部分をタンデムに繋げた構造等の最適化を試みた。

(2) RANKL 点変異ノックインマウスでのコラーゲン誘発性関節炎モデルの表現型解析

RANKL分子が高度に架橋されると、RANKL細胞内に存在する proline-rich-motif (PRM) に対して Src family kinase が結合し、それに伴い下流の PI3K-Akt-mTORC1 の活性化が起こることが確認されている。さらに、PRM に対して 1 塩基の変異を導入することでRANKL逆シグナルの受容能が大きく低下し、点変異ノックインマウスにおいては骨形成速度が減少傾向にあることも認めている。RANKLの遺伝子欠損マウスでは骨代謝システムやリンパ節形成等に影響が著しく、解析が困難であるため、RANKL逆シグナルのみを減弱させた点変異ノックインマウスを用いて、リウマチ性関節炎における影響の評価を計画した。関節炎のマウスモデルとしては、異種コラーゲン溶液を投与することで免疫を獲得させるコラーゲン誘発性関節炎モデルを採用した。このモデルにおいては、初回のコラーゲン投与による免疫後、3週間程度の間を空けて2回目の免疫を実施することで関節炎を発症することが知られており、ヒトにおけるリウマチ性関節炎の病態と多くの特徴が類似している

ため多くの研究で汎用されている。

(3) 軟骨細胞での RANKL 逆シグナルの解析と RANKL 結合ペプチド WP9QY の機能解析

軟骨組織は代謝回転が非常に緩やかであり、リウマチ性関節炎等で一度破壊されると自然経過での回復は難しく、病態の進展に伴い罹患者の QOL を大きく低下させる。軟骨細胞においてRANKLの発現が認められており、またその分化過程において骨芽細胞と一部重複するシグナル経路、転写因子の関与が知られている。さらに、RANKLとの結合性を有し、骨芽細胞においてはRANK搭載膜小胞と同様に分化を促進させることが報告されているペプチド試薬 WP9QY が、軟骨細胞の分化も正に制御することが示唆されていることから、軟骨細胞におけるRANKL逆シグナルの影響を評価することとした。

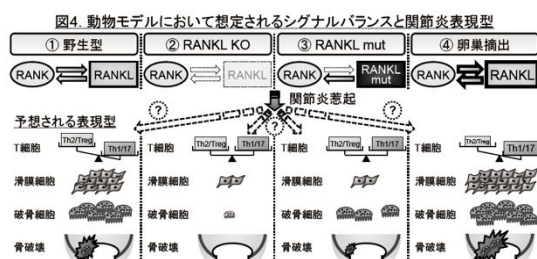
(4) 活性化 T 細胞、滑膜線維芽細胞における RANKL 逆シグナルの影響評価

T細胞のモデル細胞として Jurkat 細胞、滑膜肉腫由来の SW982 細胞、さらにRANKL点変異ノックインマウスおよび同腹の野生型マウスより調製した初代培養 T 細胞、滑膜線維芽細胞を用いて、各細胞における分化・機能制御においてRANKL逆シグナルがどの様に影響しているかを検証した。各分化マーカーの変動を mRNA で、分泌されるサイトカイン、MMPs 等のタンパク質分解酵素を ELISA で評価した。また、細胞内へのシグナル入力の影響を評価するために、より網羅的な評価法としてリン酸化プロテオミクス手法を構築し、定量的に各分子の活性化状態の評価を試みた。

4. 研究成果

(1) RANKL 逆シグナルの入力活性を有する抗 RANKL 抗体様分子の創製

抗体の短鎖可変領域 (scFv) を発現するファージ・ライブラリーを用いたスクリーニング手法により、RANKL に対して結合性を有する候補配列 20 種類ほどを同定した。想定していた通りに、scFv 単量体では RANKL 逆シグナルの入力能が認められなかったため、C 末端にイソロイシンジッパーを付与することで三量体を形成したところ、いくつかの配列においてはRANKL逆シグナルの入力能が得られた。このことから、RANKL分子を空間的近傍に架橋することがシグナル入力のトリガーとなることが支持されたものの、scFv 三量体は大腸菌で産生・精製していたため、菌体由来のエンドトキシンを完全に除去するのは難しく、今回のような免疫系の異常を生体で評価する際には注意を要するものと考えられた。哺乳類細胞において通常の IgG1 型抗体に組み替えた場合、いくつかのクローンにおいてはやはりRANKL逆シグナル入力能が認められたが、RANK搭載膜小胞等の他の刺激担体と比較してその活性



が不十分であることが懸念され、さらに、scFv をタンデムに結合し Fc 領域で二量体化した構造を考案した。scDb、あるいは taFv と一般的に呼称されるこれらの構造は 4 価の結合能を有し、かつ Fc 領域を介して血中滞留性も改善することから、in vitro、in vivo の双方の評価において有用であると考えられた。実際に、繋ぎ目のリンカー配列の長さや H 領域、L 領域の配向性等を組み替えることで、強い RANKL 逆シグナル入力能を示す scDb 型の RANKL 抗体用分子が得られ、以降の検討で用いることとした。

(2) RANKL 点変異ノックインマウスでのコラーゲン誘発性関節炎モデルの表現型解析

過去の検討から、少なくとも骨芽細胞においては、RANKL の細胞内領域に点変異を導入することで RANKL 逆シグナルの受容能が低下すること、加えて、この変異型 RANKL のノックインマウスにおいては骨カッピング機構が強く抑制を受けることを見出していた。そのため、II 型コラーゲン投与による関節炎誘起モデルを用いて、変異型 RANKL マウスと同腹仔の野生型マウスを比較し、各表現型に与える影響を評価した。コラーゲン誘発性関節炎モデルはヒトの病態をよく反映したモデルとして頻用される一方で、マウスの系統によってその発症率や重症度が左右されることが知られている。過去の文献報告を参考に、投与する II 型コラーゲンの由来や量、免疫賦活剤の CFA 濃度等を調節することで、ノックインマウスと同系統の C57BL/6 マウスにおいても一定の頻度で関節炎を発症する条件が定められた。これに従い関節炎を誘起したところ、RANKL 点変異ノックインマウスにおいて発症率に差は認められなかった一方で、四肢の厚みで評価可能な炎症状態の重症度はやや低下傾向が観察された。さらに詳細な解析を行うため、安楽死後に後肢の膝関節を単離・樹脂包埋し、組織標本作製した。通常、関節などの骨硬組織を含む組織標本作成の際には、EDTA 等での脱灰処理が必要とされる。一方で、本検討においてはタングステンプレート及び粘着シールを利用した川本法を採用することで、迅速な組織標本の作成・評価が可能であった。これにより、HE 染色、サフラン O 染色、トルイジンブルー染色等の各種染色法を用いて観察した結果、両系統のマウスにおいて顕著な差は観察されなかった。複雑な生体システム全体を俯瞰した場合、各細胞における RANKL 逆シグナルの影響を見落とす可能性も考えられたため、さらに個別の細胞を対象に検討を実施した。

(3) 軟骨細胞での RANKL 逆シグナルの解析と RANKL 結合ペプチド WP9QY の機能解析

マウス軟骨細胞由来 ATDC5 細胞はインスリン存在下で分化し、静止期から肥大型までの各分化ステージの軟骨細胞の評価が可能

である。研究期間内において、骨芽細胞、軟骨細胞の分化促進能を持つことが in vitro、in vivo で確認されているペプチド WP9QY による骨芽細胞分化が、RANKL 下流での PI3K/Akt/mTORC1 の活性化によることを代表者らは明らかにしている (Sugamori Y, *Bioessays*, 2017)。軟骨細胞のとりわけ分化初期の静止期や増殖期において RANKL が強く発現していることが免疫組織染色から示唆されているため、RANKL 逆シグナルの入力は軟骨細胞分化を正に制御していることを当初は想定していた。しかしながら、RANKL 分子に対する架橋抗体分子を用いて ATDC5 細胞を刺激したところ、むしろ、RANKL を介したシグナル入力は軟骨細胞の分化に対して抑制的に作用することを確認している。リウマチ性関節炎の発症時には、炎症性肥大化滑膜 (パンヌス) 内の種々の細胞に RANKL 逆シグナルが入力されやすい環境にあることが想定されるため、破壊された軟骨組織の回復が制限される原因の一つである可能性も考えられた。これに対し、ペプチド WP9QY は軟骨細胞の分化を強く促進し、かつ後期の肥大型軟骨細胞への分化に対しては抑制的に作用したことから、軟骨組織の回復効果を期待できることが明らかとなった。現在、軟骨細胞におけるペプチド WP9QY の標的探索、及びその作用機序解明を目的とした研究を遂行しており、本研究からの新たな発見を期待している。

(4) 活性化 T 細胞、滑膜線維芽細胞における RANKL 逆シグナルの影響評価

RANKL 逆シグナルの影響をより包括的に理解するために、リン酸化プロテオーム解析手法の構築を行った。質量分析計を用いたプロテオーム解析は、マルチプレックス法と比較してより網羅性の高い解析が可能で一方、その定量性にはやや限界がある。この点を克服するため、近年では安定同位体を用いた標識試薬を用いることで、比較対照群間での相対的な発現量を非常に正確に測定することが可能になりつつある。本研究では、Thermo 社から市販されている Tandem Mass Tag システム、及び高分解能精密質量の測定が可能な Orbitrap システムを組み合わせることで、1,000 以上のタンパク質のリン酸化状態を一斉解析が可能で評価系を構築した。現時点ではさらに条件の改善が必要だが、この評価系により、現時点では RANKL 逆シグナルの下流で PI3K-Akt-mTORC1 経路の活性化のみが確認されているが、さらに複雑な制御機構も想定され、今後の解析を行う上で非常に有用と考えている。

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 3 件)

- (1) Sugamori Y, Mise-Omata S, Maeda C, Aoki S, Tabata Y, Murali R, Yasuda H, Udagawa N, Suzuki H, Honma M, Aoki K. Peptide drugs accelerate bmp-2-induced calvarial bone regeneration and stimulate osteoblast differentiation through mtorc1 signaling. *Bioessays*. 2016;38:717-25.
- (2) Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H. Establishment of optimized in vitro assay methods for evaluating osteocyte functions. *J Bone Miner Metab*. 2015;33:73-84.
- (3) Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H. Regulatory mechanisms of rankl presentation to osteoclast precursors. *Curr Osteoporos Rep*. 2014;12:115-20.

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 本間雅. 骨吸収と骨形成のカップリングにおける RANKL の役割. 日本薬学会第 138 年会 (2018 年).
- (2) 本間雅, 池淵祐樹, 林円香, 青木和宏, 苅谷嘉顕, 鈴木洋史. カップリング機構における RANKL の役割. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 (2017 年).
- (3) Hayashi M, Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H. Characterization of rankl reverse signaling associated with osteoblast differentiation. Cambridge Symposium (2015 年).
- (4) Ikebuchi Y, Honma M, Kariya Y, Suzuki H. Analysis on the regulatory mechanisms of osteocytic rankl presentation to osteoclast precursors. 第 8 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (2014 年).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (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

取得年月日: 2014 年 2 月 20 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

東京大学医学部附属病院薬剤部試験研究室/
臨床薬物動態学教室

<http://plaza.umin.ac.jp/~todayak/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

池淵 祐樹 (IKEBUCHI, Yuki)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 20645725

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

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