

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390349

研究課題名(和文)骨恒常性維持におけるRANKL逆シグナルの役割の解析

研究課題名(英文)Analysis of physiological roles of RANKL reverse signaling in bone homeostasis

研究代表者

本間 雅 (Honma, Masashi)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：60401072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：新規シグナル伝達経路であるRANKL逆シグナルに関して、生理的な機能を明らかにすることを目指した。近年、生理的な成熟破骨細胞形成過程を中心的に制御しているのは骨細胞であることが報告された。そこでまず、骨細胞におけるRANKL逆シグナルを解析した結果、リソソームに蓄積するRANKL分子の骨細胞表面への放出をトリガーする役割を果たすことが明らかとなった。さらに、骨芽細胞におけるRANKL逆シグナルの役割を解析した結果、破骨細胞から膜小胞エクソソームに積み込まれた形で放出されるRANKを受容し、骨芽細胞分化を促進することが明らかとなり、カップリング機構の一部として機能していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to elucidate the physiological roles of a novel signaling pathway called RANKL reverse signaling. Recently, it has been reported that osteocytes are the major provider of RANKL during physiological osteoclastogenesis. Considering this, we firstly analyzed the roles of RANKL reverse signaling in osteocytes, and showed that the secretion of lysosomal RANKL to the osteocytic cell surface is triggered by RANKL reverse signaling. Next, we analyzed the roles of RANKL reverse signaling in osteoblasts, and showed that osteoblastic RANKL acts as a coupling signal acceptor for RANK incorporated into osteoclastic exosomes.

研究分野：整形外科学

キーワード：シグナル伝達 生体分子 生理活性 薬理学 老化

## 1. 研究開始当初の背景

RANKL は、骨芽細胞に発現するリガンド分子であり、生体における骨吸収レベルを最終的に決定する最も重要な因子である。このため、RANKL シグナル受容分子である RANK の下流伝達経路は精力的に研究されてきた。一方、シグナルの入力強度を決定する重要な要因であるにも関わらず、RANKL の骨芽細胞内における挙動とその制御機構に関しては、これまで十分な研究が行なわれていなかった。研究代表者の本間らは、この点に着目した分子論的研究を進めてきた結果、A. 骨芽細胞において新規合成された RANKL 分子の大部分はゴルジ体において既に、OPG と複合体を形成しており、その後 Vps33a 依存的な過程を経てリソソームへと選別輸送され、蓄積されること、および B. この OPG による RANKL 選別輸送の調節機能は、デコイ受容体としての機能より大きく破骨細胞活性化抑制に寄与していることが明らかとなった。また C. 細胞表面に直接輸送される RANKL は発現量のごく一部であるが、この細胞表面に局在する RANKL 分子は破骨前駆細胞にシグナルを入力するだけでなく、RANK との接触に伴って骨芽細胞内の種々のシグナル伝達経路も活性化し (RANKL 逆シグナル) リソソームに蓄積された RANKL 分子を、Rab27a/b 依存的な経路を介して細胞表面へと分泌させることなど、複雑な RANKL 細胞内輸送制御機構を見出してきた。さらに、RANKL の逆シグナルを伝達する分子機構についても解析を進め、D. 骨芽細胞内へのシグナル伝達は RANKL が細胞表面でクラスター化することによってトリガーされ、RANKL 細胞内ドメインとアダプター分子 Grb2 などの SH3 ドメインの相互作用を起点とする可能性があること、および E. 上記シグナル起点の下流では mTOR などの細胞内シグナル分子の活性化が生じること、などを見出した。また、本研究の開始までにさらに行った予検討から、骨芽細胞系培養細胞を用い、RANK 細胞外ドメインを固相化したビーズ (RANK ビーズ) による刺激を用いて RANKL 逆シグナルを入力した場合、ALP および OCN など骨芽細胞分化マーカーの発現上昇が生じることも見出された。また、共同研究者である東京医科歯科大学・青木らの研究では、RANKL 結合ペプチドである W9 ペプチドが、*in vitro* および *in vivo* レベルで骨形成活性を有することを報告しているが、研究代表者らの検討から、W9 ペプチドが RANKL 逆シグナル経路を活性化することも見出している。

研究代表者らが明らかにしてきたこれらの知見は、RANKL 逆シグナルが破骨細胞と骨芽細胞のカップリング機構の分子基盤の 1 つとなっている可能性を示唆している。従って、生体における骨恒常性維持機構の全体像を理解するためには、生体レベルにおける

RANKL 逆シグナルの役割を明らかにすると共に、シグナル伝達メカニズムの全容を解明することが必須であると考え、本申請研究の立案に至った。

## 2. 研究の目的

本研究においては、研究代表者らが新規に見出した骨芽細胞内シグナル伝達経路である RANKL 逆シグナルに関して、その分子メカニズムの全容を解明すると共に、生体レベルでの機能を明らかとし、生理的な骨代謝恒常性維持機構の全体像の理解に寄与することを目標とする。

## 3. 研究の方法

本研究の計画立案時点では、破骨前駆細胞と接触して RANKL の正方向シグナルを入力する細胞は、生理的には骨芽細胞が主体であることを想定していた。しかしながら研究開始直前のタイミングで、骨細胞選択的に RANKL 遺伝子をノックアウトしたマウスにおいて、成熟破骨細胞の形成が顕著に低下することが相次いで報告され、破骨前駆細胞への RANKL 正方向シグナルの供給に関して、生理的に中心的な役割を果たしているのは、骨芽細胞よりはむしろ骨細胞であることが示された。この大きなパラダイムシフトを受け、RANKL 逆シグナルの生理的な役割を理解するためには、骨細胞において RANKL 逆シグナルによる RANKL 細胞内輸送制御が機能しているかを、まず検証する必要に迫られ、計画を見直して開始することとなった。

### 骨細胞と破骨前駆細胞の三次元共培養手法の確立

骨細胞は生体内では骨基質内に包埋される形で存在しており、骨基質から単離して通常の平面培養を行った場合、骨芽細胞様に脱分化していくことが知られている。このため、骨細胞の機能を *in vitro* で詳細に解析するためには、骨細胞の分化状態を一定期間維持できる培養条件の確立が必要である。そこで本研究ではまず、骨細胞の三次元培養系の確立を行った。新生児マウス頭蓋骨に対し、プロテアーゼ処理および脱灰処理を繰り返し行うことで骨基質を分解し、初代骨細胞を調製した。単離した細胞に関し、初期骨細胞マーカー PDPN および骨芽細胞マーカー ALP に対する二重染色を行って骨細胞の純度を検証した結果、約 7 割の細胞が骨細胞の特徴を有しており、骨芽細胞の混入は最小限であることが確認されたため、次いで骨細胞培養条件を確立する検討へ移行した。初代骨細胞を通常の平面培養で培養した場合 (2D) と、骨基質の主要な構成成分である I 型コラーゲンのゲル内に包埋して培養した場合 (3D) それぞれで経時的に total RNA を回収し、各種骨

細胞マーカーおよび骨芽細胞マーカーの発現量変動を、定量的 PCR 手法を用いて評価した。また、細胞を回収し、イムノプロットおよび ELISA 手法を用いて、マーカー分子の発現量をたんぱく質レベルでも評価した。

一連の検討結果に基づき、I 型コラーゲンを用いた 3D 培養系は骨細胞の機能を評価するのに適していると考えられたため、3D 培養の特徴を維持しつつ、破骨前駆細胞との共培養を可能とする系の構築を行うこととした。先述したように、骨細胞は骨基質中に包埋されているため、細胞体部分で破骨前駆細胞と接触することは考えられず、接触が生じるとすれば、骨細胞樹状突起の先端部位であると推測された。そこで、骨細胞の細胞体部位と破骨前駆細胞の接触を回避しつつ樹状突起の進展を可能とするため、ポアサイズ  $3\mu\text{m}$  の多孔質フィルターを挟んで両細胞の共培養を行う系を考案した。すなわち、コラーゲンコート処理したフィルター上に初代骨細胞を播種し、接着するまで 8 時間培養した。その後、細胞培養プレートに加えた I 型コラーゲン溶液の上に、骨細胞が接着している面を下向きにして乗せ、37 °C でインキュベートを行ってコラーゲンをゲル化させることで骨細胞をゲル内に包埋させた。最後に、破骨前駆細胞をフィルター上に播種し、培養を行った。その後成熟破骨細胞の形成を、マーカー分子の発現誘導を用いて評価した。

#### 骨細胞から破骨前駆細胞への RANKL シグナル伝達様式の解析

RANKL は 型の膜貫通タンパク質であり、MMPs などの作用によって細胞外ドメインが切断され、可溶性の分子 sRANKL を生成する。sRANKL は成熟破骨細胞の形成を *in vitro* で刺激できることも明らかとなっている。このため、骨細胞が直接的な細胞間接触を介して RANKL シグナルを入力しているのか、sRANKL の生成を介して間接的にシグナル入力を行っているのかは明らかでない。そこで前項で確立した共培養系を用いてこの点を明らかにするための検討を行った。まず、共培養系においてメディウム中に放出されている sRANKL のレベルを、ELISA 手法を用いて定量し、破骨前駆細胞の単独培養系のメディウム中に sRANKL 組み換えたんぱく質を添加して直接刺激を行った場合との比較を行った。また、sRANKL の生成に関与する MMPs を阻害することが知られている TIMP-2 を共培養系のメディウム中に添加し、sRANKL の生成を抑制する検討も行った。

さらに、直接的な接触を介して RANKL の正方向シグナルが供給されていることを検証するため、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の成熟破骨細胞形成に関して評価を行った。

#### 骨細胞における RANKL 細胞内挙動制御における RANKL 逆シグナルの解析

一連の検討により、骨細胞の樹状突起の末端は破骨前駆細胞と直接的に接触することで RANKL 正方向シグナルを入力し、効率的に成熟破骨細胞形成を刺激していることが示唆された。この過程で、RANKL 逆シグナルを介して、RANKL の骨細胞内の動態制御が機能している可能性が考えられた。そこで、N 末端に GFP を付加した GFP-RANKL を用い、骨細胞内における RANKL 分子の局在に関して検討を加えた。さらに、共培養系と同様の実験系を用いて骨細胞の樹状突起末端に対して RANKL ピーズによる刺激を行った後、細胞を可溶化して RANKL ピーズを回収し、ピーズと相互作用しているタンパク質をイムノプロット手法により検出した。さらに、骨細胞において OPG が RANKL 細胞内挙動に与える影響に関して、OPG<sup>-/-</sup>マウスより単離した骨細胞を用いて検証した。

#### 骨芽細胞における RANKL 逆シグナルの生理的リガンドの探索および機能評価

一連の骨細胞における知見が明らかになった一方で、骨芽細胞に発現する RANKL の生理的な役割は逆に不明瞭となった。破骨前駆細胞が主として骨細胞と接触して RANKL の正方向シグナル入力を受容していることを考慮すると、骨芽細胞は生理的条件下では骨芽細胞と直接的には接触していない可能性が想定される。そこで、成熟破骨細胞から何らかの分泌型の分子が放出され、これが骨芽細胞に発現する RANKL に対して結合し、RANKL 逆シグナルを入力する、という仮説を立てて検証することとした。

RANKL に対して結合性を示す分子としては、RANK および OPG が考えられるが、破骨細胞系に発現するという条件を満たすのは RANK である。RANK は 型の膜貫通タンパク質であるため、細胞外に分泌されることを想定した場合、リン脂質二重膜に埋め込まれた膜小胞として放出されると考えられた。そこで、マウスより単離した破骨前駆細胞を sRANKL で刺激し、経時的に培養上清を回収し、段階的な超遠心分画手法を用いて、RANK を含有する分画が存在するかを検討し、さらに骨芽細胞に与える作用を評価した。

#### 4. 研究成果

##### 骨細胞と破骨前駆細胞の三次元共培養手法の確立

後期骨細胞マーカーである SOST および FGF23 の発現量は、2D 培養では速やかに発現量が低下し、初期骨細胞マーカーである PDPN および DMP1 の発現量が経時的に増

大することが確認された。また、骨芽細胞マーカーである OCN および ALP についても培養時間経過と共に増大する傾向が観察され、初代骨細胞は 2D 培養に伴ってより未分化な状態に脱分化していくことが確認された。また、RANKL の発現量は後期骨細胞マーカーと類似した経時変化を示す一方、OPG に関しては骨芽細胞マーカーと類似した推移を示すことも明らかとなった。一方 3D 培養条件下では、初期骨細胞マーカーおよび骨芽細胞マーカーの上昇が抑制される傾向が観察され、後期骨細胞マーカーについても発現量低下が 2D 培養条件と比較して遅延する傾向が観察された。さらに、PDPN および ALP に関して、イムノプロット手法を用いてタンパク質レベルでの発現量変化に関して追跡したところ、RNA レベルの発現量変動と同様の傾向が観察された。また、分泌型タンパク質である SOST, FGF23 に関して ELISA を用いてメディウム中分泌量の測定を行った結果、RNA レベルの発現量変動と同様の傾向が確認された。また、共焦点顕微鏡を用いて 3D 培養条件下の骨細胞の形態を観察したところ、骨細胞に特徴的な樹状突起の形成が確認された。

次いで、コラーゲンゲルに包埋培養した骨細胞と破骨前駆細胞を、多孔質フィルターを挟んで共培養する実験系において、成熟破骨細胞マーカーである TRAP 活性の経時変化を測定したところ、共培養開始 5 日目～9 日目にかけて顕著な TRAP 活性の増大が認められた。また他のマーカー分子についても、定量 PCR 手法を用いて発現量の変化を評価した結果、いずれのマーカー分子の発現量も共培養開始 5 日目～9 日目にかけて有意に上昇しており、成熟破骨細胞の形成が進行していることが示唆された。さらに、抗 TRAP 抗体を用いてフィルター上面の蛍光免疫染色を行ったところ、TRAP 陽性の多核細胞が多数観察され、成熟破骨細胞が形成していることが確認された。これらの結果に基づき、多孔質フィルターを挟んだ共培養系を用い、骨細胞の破骨細胞分化支持能を評価可能であると考えた。

#### 骨細胞から破骨前駆細胞への RANKL シグナル伝達様式の解析

骨細胞との共培養系におけるメディウム中 sRANKL 濃度は 0.1 ng/mL 程度であることが明らかとなった。一方、破骨前駆細胞の単独培養系に添加して直接刺激を行った場合、10 ng/mL まで添加濃度を上げた際にも、骨細胞との共培養系で観察される TRAP 活性と比較して有意に低い値が観察され、成熟破骨細胞の形成が低いことが明らかとなった。また、TIMP-2 を共培養系の培地中に添加した場合、濃度依存的に sRANKL の生成を低下させた一方で、共培養系の TRAP 活性には有意な影響を与えなかった。これらの結

果から、骨細胞による成熟破骨細胞形成制御において、sRANKL の寄与は低いことが示唆され、直接的な接触を介している可能性が想定された。実際、共焦点顕微鏡を用いて共培養系における骨細胞および破骨前駆細胞の形態を観察したところ、骨細胞は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た。そこで、共培養系において多孔質フィルターを二重にした場合の影響を評価したところ、TRAP 活性は顕著に低下し、またポアサイズを変更した場合にも、サイズ依存的に TRAP 活性の低下が認められた。これら一連の結果は、骨細胞の樹状突起と破骨前駆細胞の直接接触を阻害した場合には、破骨細胞分化支持能が大きく抑制されることを示しており、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と考えられた。

#### 骨細胞における RANKL 細胞内挙動制御における RANKL 逆シグナルの解析

骨細胞において、GFP-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いることが明らかとなった。また、RANK ビーズ刺激実験では、GFP-RANKL のビーズへの結合が確認された。この際、リソソーム酵素である NAGA の培地中への放出も確認され、骨細胞において、RANKL 逆シグナルの入力は、リソソーム内に蓄積されている RANKL の、細胞表面への放出をトリガーすることが示された。

さらに OPG-/- マウスより単離した骨細胞においては、GFP-RANKL は主としてゴルジ体に集積し、リソソームへの蓄積は顕著に減少していた。また、OPG を共導入することで GFP-RANKL のリソソーム局在が回復することも確認された。この時、骨細胞表面に局在する RANKL 分子の量は増大しており、破骨前駆細胞との共培養系では TRAP 活性の上昇が顕著に増大することも確認された。これらの結果は、OPG による RANKL 局在制御機構が骨細胞において機能していることを示唆している。

#### 骨芽細胞における RANKL 逆シグナルの生理的リガンドの探索および機能評価

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) を分泌することが明らかとなった。さらに、OC エクソソームは骨芽細胞表面の RANKL と結合して細胞内へシグナルを入力し、Runx2 の核内移行を促進することで、骨芽細胞の分化を促進し、骨形成活性を上昇させることが明らかとなった。マウス頭蓋骨欠損モデルを用い、OC エクソソームを含浸したコラーゲンスポンジを欠損部位に留置した検討の結果、OC エクソソーム群ではコン

トロール群と比較して顕著な骨再生が認められた。さらに、RANKL 下流の骨芽細胞内シグナル経路を探索した結果、RANKL 細胞内ドメインに含まれる PRM と SFK の相互作用が起点となり、PI3K-Akt-mTORC1 経路の活性化が生じ、この経路の活性化が主に Runx2 の核内移行を促進していると考えられた。さらに、RANKL の PRM 内に Pro29Ala 点変異を導入することで、逆シグナルが減弱することも確認され、Pro29Ala 変異型 RANKL をロックインした遺伝子改変マウスでは、骨吸収フェーズから骨形成フェーズへの円滑なカップリングが障害されていることも示された。すなわち RANKL 逆シグナルは、生体内ではカップリング機構を構成するシグナル伝達経路の一つであることが明らかとなった(論文投稿中)。

#### 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)

Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Hayashi M, Hayashi N, Aoki S, Suzuki H. RANKL subcellular trafficking and regulatory mechanisms in osteocytes. *J Bone Miner Res.* 2013 Sep; 28(9):1936-49. doi: 10.1002/jbmr.1941.

Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H. Establishment of optimized in vitro assay methods for evaluating osteocyte functions. *J Bone Miner Metab.* 2015 Jan; 33(1):73-84. doi: 10.1007/s00774-013-0555-5. Epub 2014 Jan 1.

Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H. Regulatory mechanisms of RANKL presentation to osteoclast precursors. *Curr Osteoporos Rep.* 2014 Mar; 12(1):115-20. doi: 10.1007/s11914-014-0189-0. Review.

[学会発表](計 4 件)

Ikebuchi Y, Honma M, Kariya Y, Hayashi M, Hayashi N, Aoki S, Suzuki H. Osteocytic RANKL contributes to osteoclastogenesis in a direct cell-to-cell contact through the dendritic processes. 第 6 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 京都大学大学院薬学研究科記念講堂(京都府・京都市), 2012 年 11 月 23~24 日

Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Hayashi M, Hayashi N, Aoki S, Suzuki H. RANKL subcellular trafficking in

osteocytes. *European Calcified Tissue Society 2013, Lisbon, Portugal*, 2013 年 5 月 18~21 日

Honma M. Regulatory mechanisms of RANKL presentation to osteoclast precursors 11th Meeting of Bone Biology Forum, 富士教育研修所(静岡県・裾野市), 2014 年 08 月 22~23 日

本間雅、林円香、池淵祐樹、青木重樹、菅森泰隆、青木和広、鈴木洋史 骨芽細胞における RANKL 逆シグナルの役割 第 33 回日本骨代謝学会学術集会, 京王プラザホテル(東京都・新宿区), 2015 年 07 月 23~25 日

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 抗 RANKL 抗体

発明者: 本間雅、池淵祐樹、林円香、苅谷嘉顕、鈴木洋史

権利者: 国立大学法人東京大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2015/054806

出願年月日: 2015 年 02 月 20 日

国内外の別: 外国

#### 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・特任准教授

研究者番号: 60401072

##### (2) 研究分担者

鈴木 洋史 (SUZUKI, Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 80206523