

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 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：2013～2014

課題番号：25670632

研究課題名(和文) RANKL逆シグナルを介したSOST分子の経時的な発現制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis on the regulatory mechanism of sclerostin expression coupled with RANKL-reverse signaling

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨細胞より分泌される骨形成抑制因子SOSTに関して、その発現制御にRANKLを受容体とする「RANKL逆シグナル」の関与を検証した。まず、骨細胞の適切なin vitro培養法の構築を行った。骨基質の主要な成分であるI型コラーゲンにマトリゲルを添加した三次元培養下において、骨細胞はその形質を長期間に渡って保持可能であった。続いて、RANKL逆シグナルを骨細胞に入力した結果、SOST分子の発現量が有意に上昇し、同時にRANKL/OPGの発現量比も増大した。これらはマウスでも同様の傾向が観察され、RANKL逆シグナルによって骨吸収の促進、骨形成の抑制が効率的に行われていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Regulatory mechanisms of SOST expression, which is a secreted protein from osteocytes and suppresses bone formation, still remain unclear. We focused on "RANKL reverse signaling" based on RANKL function as a receptor for RANK. At first, we established optimized in vitro assay methods for evaluating osteocyte functions. During 3-dimensional culture composed of type-I collagen and matrigel, osteocytes kept the characteristic features of gene expression and its cell shape over 7 days. Using this novel culture conditions, we examined the effect of RANKL reverse signaling on SOST expression in osteocytes. As a result, activating RANKL reverse signaling resulted in the significant elevation of SOST expression, as well as the ratio of RANKL to OPG expression. Moreover, these effects were also confirmed in mouse in vivo model. Consequently, RANKL reverse signaling in osteocytes may contribute to the efficient bone coupling between bone resorption and formation.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨細胞 骨代謝カップリング

1. 研究開始当初の背景

骨の恒常性は、骨吸収と骨形成の共役（カップリング現象）により維持されている。破骨細胞の Receptor activator of NF- κ B (RANK) と結合し破骨細胞の成熟及び骨吸収を促進する RANK ligand (RANKL) は、骨吸収の主要な制御因子として研究がなされており、近年、骨芽細胞ではなく「骨細胞」が破骨細胞への RANKL 供給源であるが示された。また、代表者らの研究から、骨芽細胞表面の RANKL は RANK 結合刺激の受容体として機能し、その下流では骨芽細胞の分化及び骨形成を亢進する mTOR 経路の活性化が起こることが見出されている。さらに、成熟破骨細胞より分泌されるエクソソーム小胞には RANK 分子が搭載されることから、骨芽細胞の RANKL に対する生理的リガンドとして機能すると考えられた。この破骨細胞における「RANK シグナル」と骨芽細胞における「RANKL 逆シグナル」が、分化段階に従い入力されることが、骨カップリングを構成するメカニズムの一つである可能性が想定されていた。

骨細胞から分泌される Sclerostin (SOST) は、骨芽細胞の Wnt/ β -catenin 経路を負に制御し、骨形成に抑制的に作用する。そのため、抗 SOST 抗体には骨形成の促進作用が期待され、臨床試験の Phase II, III まで開発が進められるなど、大きな注目を集めている。これまで、機械的な負荷により骨吸収が進行している部位では SOST 発現量の減少が報告されている一方で、骨芽細胞から骨細胞への分化を正に制御する核内受容体 Runx2 によって SOST の発現量が増加することが示されている。そのため、骨リモデリングの推移と同期して SOST 発現量が変動することが、カップリング現象の一端を担うことが示唆されるものの、その詳細は未解明であった。代表者らの骨芽細胞を用いた検討から、RANKL 逆シグナルの入力により Runx2 が核内に移行すること、また機械的負荷時に生じるシグナル経路の活性化と一部重複することが示されている。以上のことより、SOST の発現制御への RANKL 逆シグナルの関与が想定された。

2. 研究の目的

代表者らのこれまでの研究から、骨細胞での「リガンド」RANKL が破骨前駆細胞の「受容体」RANK と結合し分化・活性化が誘導されること、また、成熟破骨細胞から分泌されるエクソソーム小胞に搭載された「リガンド」RANK が骨芽細胞表面の「受容体」RANKL と結合することで骨形成が促進されることを見出している。RANK-RANKL 間の相互作用を介した双方向性のシグナル伝達が骨吸収・骨形成間のカップリング現象を担う主要な因子であると想定し、本研究課題では、骨細胞における RANKL の「受容体」としての機能を仮定し、骨細胞における

RANKL 逆シグナルの詳細を解明し、骨形成に対する負の制御因子である SOST の発現制御への関与を検証することを目的とした。

RANKL が「リガンド」及び「受容体」として機能する双方向性のシグナル分子であることは、代表者らが新規に見出したものであり、非常に独創性の高い研究となっている。SOST の発現に関して、骨リモデリングの推移に伴う経時的な制御機構の詳細を解明することは、骨カップリング現象の分子的基盤の理解に寄与し、その生理学的・骨代謝学的な意義は大きい。

3. 研究の方法

(1) 初代培養骨細胞の培養条件最適化

骨細胞は、生理的には I 型コラーゲンを主成分とする骨基質中に埋め込まれた環境に存在しており、マウス頭蓋骨等から単離した初代培養骨細胞を通常の培養条件で平面培養すると、その特徴的な形態や遺伝子の発現を速やかに失うことが知られている。また、骨細胞様培養細胞として頻用される MLO-Y4 細胞では SOST の発現が著しく低下しているなど、これまで適切な *in vitro* 評価系が存在しないことが骨細胞研究を遂行する上で大きな障害となっていた。

代表者らのこれまでの検討から、初代培養骨細胞は I 型コラーゲンをういた三次元培養下においては、その形質を数日間保持することが示されている (Honma M. et al, J Bone Miner Res. 2013)。SOST の経時的な発現変動を追跡するためには、より長期間に渡る培養を行う必要があるため、最初に *in vitro* 培養系の改善を試みた。具体的には、骨基質を構成するオステオカルシンやヒアルロン酸、あるいは人工基底膜マトリゲルや IGF-1 などの複数の成長因子を I 型コラーゲンを添加することで、初代培養骨細胞の形質をより長期に保持可能な培養条件を検証した。

(2) 初代培養骨細胞を用いた RANKL 逆シグナルによる SOST 発現制御の解析

(1) で最適化した条件下で初代培養骨細胞を培養し、これに RANKL 逆シグナルを入力することで、SOST を含む骨細胞の遺伝子変動を解析した。「受容体」RANKL に対する生理的な「リガンド」分子は、破骨前駆細胞表面に発現する RANK、あるいは成熟破骨細胞から分泌される RANK 搭載エクソソームと想定されるが、これらを用いた検討では多くの因子による影響を排除しきれない。複数の RANKL 分子が適切な距離間で架橋されることが RANKL 逆シグナル発生のトリガーとなることが示唆されており、代表者らはこれまでに、RANKL 結合性の短鎖可変領域フラグメント (single-chain Fv: scFv) の C 末端側に Isoleucine-zipper を付加した scFv 三量体が RANKL 逆シグナルの入力活性を有することを見出している。ファージディスプレイ

レイ法を用いたスクリーニングから、RANKL 逆シグナルの入力活性を持つ複数のクローンを取得しており、これらを用いて初代培養骨細胞に RANKL 逆シグナルを入力し、その後の経時的な SOST 遺伝子の発現量変動を解析した。

(3) マウス in vivo における RANKL 逆シグナルによる SOST 発現制御の解析

マウス初代培養骨細胞を用いた in vitro 解析と並行して、マウスに抗 RANKL scFv 三量体を反復投与することで骨細胞に RANKL 逆シグナルを入力し、血清中 SOST 濃度の経時的な変動を測定した。

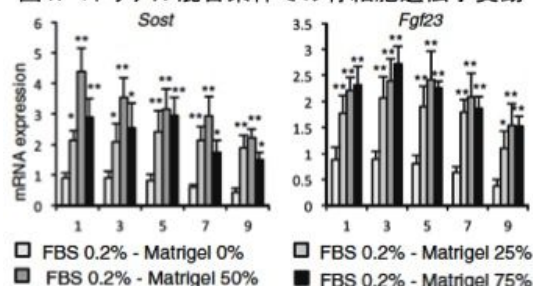
4. 研究成果

(1) 初代培養骨細胞の培養条件最適化

まず、初代培養骨細胞を包埋する I 型コラーゲンゲルに対して、骨基質を構成するその他の主要な因子(オステオカルシン、ヒドロキシアパタイト、ヒアルロン酸)を添加した。骨細胞マーカー遺伝子(初期: DMP-1、E11、後期: SOST、FGF23)の培養に伴う経時的な変動を確認した結果、I 型コラーゲン単独の場合と比較して有意な差は認められなかった。培養開始から 5 日間ほど経過すると、SOST 等の発現量が顕著に低下し脱分化する様子が観察されたため、その他の培養条件を検討することとした。

次に、肝細胞などの初代細胞の培養において頻用される基底膜マトリゲルをコラーゲンゲルに混合し、骨細胞を培養したところ、特に 1:1 の混合比では SOST 等の発現量を 7~9 日程度まで保持出来ることが分かった。また、この際に骨細胞に特徴的な樹状突起様の構造の伸長がより促進されており、マトリゲルの添加によって骨細胞の形質がより長期に渡って保持されることが明らかとなった。

図1. マトリゲル混合条件での骨細胞遺伝子変動



マトリゲルには、種々の細胞外マトリクスと共に IGF-1 や TGFβ など、骨芽細胞・骨細胞の分化に関わる成長因子が多く含まれることが知られている。これらの含有量を減少させた GFR (growth factor reduced) 型のマトリゲルを添加した場合には SOST 等の発現量が有意に低下したため、いずれかの成長因子が骨細胞の培養に有効であると考えられた。GFR 型のマトリゲルで特に含有量が低下している 4 種類の成長因子(IGF-1、TGFβ、EGF、PDGF)を I 型コラーゲンゲルに添加

して骨細胞を培養したところ、IGF-1 の添加により有意な SOST の発現上昇が認められた一方で、マトリゲルを添加した条件ほどの骨細胞の形質保持は認められなかった。4 種類の成長因子を混合した条件においても同様の傾向が認められたため、マトリゲル中に含まれるいずれの因子が骨細胞の形質保持に必須であるかの同定は達成出来なかったが、これまでの培養条件よりも改善した in vitro 評価系を構築することが出来た。また、この際に添加する FBS 濃度を 0.2% 程度まで低下させることによって、僅かながら骨細胞の形質を長く保てることが分かった。これらの研究成果は、"Establishment of optimized in vitro assay methods for evaluating osteocyte functions." (発表論文) にて発表された。

(2) 初代培養骨細胞を用いた RANKL 逆シグナルによる SOST 発現制御の解析

(1) で構築した初代培養骨細胞の三次元培養法を用いて、これに RANKL 逆シグナルの入力活性を有する抗 RANKL scFv 三量体を添加した。その結果、刺激開始後 1~3 日の時点では SOST の発現量が有意に上昇した。また、同時に測定した RANKL も同様に発現量が上昇し、Osteoprotegerin (OPG) の発現量は低下していた。骨細胞が破骨細胞活性化における主要な RANKL 供給源であり、OPG 分子は RANKL のデコイ受容体として作用し RANKL-RANK シグナルを阻害すること、また SOST が骨形成に対する抑制的な作用を持つことを併せて鑑みると、一連の RANKL 逆シグナルによる遺伝子変動は骨吸収を活性化し、骨形成を抑制するものと考えられる。生理的な環境を考えると、骨細胞と破骨前駆細胞が接触した局所において破骨細胞の活性化、骨吸収が効率的に行われ、その周囲での骨形成を分泌された SOST が抑制することで、骨吸収から骨形成へと続く一連のカップリング現象がスムーズに行われているものと推測される。

また、骨細胞を培養しているコラーゲン・マトリゲル混合ゲルを切断し機械的な負荷を与えると、切断面周囲でも同様の遺伝子変動が認められた。マウス骨折回復モデル等でも同様の現象が報告されており、この際に Runx2 の関与が示唆されている。現在までに骨細胞における RANKL 逆シグナルの詳細な経路の解析には至っていないが、これらとの類似性をもとに更なる解析を進める予定である。

(3) マウス in vivo における RANKL 逆シグナルによる SOST 発現制御の解析

C57BL/6 マウス (12 週齢雌) に対して、抗 RANKL scFv 三量体を反復投与 (10mg/kg、12 時間毎に 5 日間腹腔内投与) した。頸静脈より経時的に採血し、血清中の SOST 濃度を ELISA 法により測定したところ、投与開始後

5日目の時点で SOST 濃度は上昇する傾向が認められた。(2)での in vitro での検討と同様に RANKL、OPG の血清中濃度も同時に測定すると、やはり scFv 三量体投与群においては RANKL 濃度の有意な上昇、OPG 濃度の有意な低下が観察された。scFv 三量体による骨芽細胞への RANKL 逆シグナル入力の影響や、また RANKL-RANK シグナルの阻害による骨吸収の抑制など、単純に骨細胞への影響のみを評価することは困難だが、生体内においても、骨細胞で RANKL 逆シグナルが機能し、SOST 等の発現制御に関わっていることが示唆された。今後は、より長期に渡る影響の評価や、卵巣摘出等による骨疾患モデル動物を用いた解析を進め、RANKL 逆シグナルによる骨カップリング調節機構の解明を試みる予定である。

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2件)

Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H. Regulatory mechanisms of RANKL presentation to osteoclast precursors. *Current osteoporosis reports*. 2014 Mar;12(1):115-20.
PubMed PMID: 24477414.
DOI: 10.1007/s11914-014-0189-0.
(査読あり)

Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H. Establishment of optimized in vitro assay methods for evaluating osteocyte functions. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2015 Jan;33(1):73-84.
PubMed PMID: 24381056.
DOI: 10.1007/s00774-013-0555-5.
(査読あり)

[学会発表](計3件)

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11月15日~16日 熊本
口頭発表

池淵祐樹 成熟破骨細胞形成における骨細胞 RANKL 提示機構の解析 新学術領域「統合的多階層生体機能学領域の確立とその応用」若手ワークショップ 2014年9月21日~23日 熱海
口頭発表

Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y,

Suzuki H. RANKL subcellular trafficking in osteocytes. European Calcified Tissue Society 2013 50th anniversary conference 2013年5月18日~21日 Lisbon, Portugal
ポスター発表

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[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/~todayiak/>

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

(3)連携研究者