

論文の内容の要旨

論文題目 RANKL 可溶化の分子メカニズムに関する研究

指導教官 中村耕三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 疋田温彦

緒言

骨組織は身体内最大のカルシウム貯蔵庫として生体の恒常性(ホメオスターシス)維持に重要な役割を果たしている。骨リモデリングとは、破骨細胞による急速な骨吸収と、それに引き続く骨芽細胞による緩徐な骨形成の過程である。骨吸収が相対的に骨形成を上回ると骨粗鬆化が生じ、逆に骨形成が骨吸収を上回ると大理石骨病となる。

骨芽細胞、破骨細胞は骨代謝におけるメインプレイヤーである。全身の骨量が骨形成と骨吸収の厳密なバランスにより保たれていることから、以前よりこれらの細胞は相互の活性を調節しながら働いていると考えられていたが、その調節機構に関わる分子の実態は長

らく謎のままであった。

しかし、1990年代の後半に破骨細胞分化に不可欠なサイトカインである receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)がほぼ同時期に複数のグループにより同定された事により、骨代謝分野における分子生物学的研究は急速な進歩を遂げた。RANKLは tumor necrosis factor (TNF)リガンドファミリーに属する2型膜タンパクであり、活性化したT細胞に発現して樹状細胞の生存を促進するサイトカインとして同定された。RANKLは骨吸収因子刺激で骨芽細胞、骨髄ストローマ細胞に、T細胞レセプター刺激でT細胞に発現する。RANKLは破骨細胞前駆細胞である単球・マクロファージ系細胞膜上に存在するRANKに結合しそれを活性化する。RANKLと結合したRANKは、アダプター分子である TNF receptor-associated factor (TRAF)6を介してNF- κ B、ERK、JNK、NFATc1などを活性化し、破骨細胞の分化・活性化を促進し、細胞死を抑制する。正常な骨組織の発達におけるRANKLの重要性は様々な遺伝子改変マウスにより確認されている。RANKLあるいはRANK欠損マウス、あるいは生理的なRANKLの阻害因子である osteoprotegerin (OPG)の過剰発現マウスは成熟破骨細胞の欠損により重篤な大理石骨病を示す。一方、OPG欠損マウスで

は破骨細胞分化が促進した結果、重篤な骨粗鬆症を引き起こす。

膜タンパクが細胞外で切断され、周囲の組織あるいは全身に放出される過程は *ectodomain shedding* と呼ばれる。RANKL も膜タンパクとして合成された後、何らかのタンパク切断酵素により切断され、可溶性 RANKL に変換されることが報告されているが、RANKL 切断の生理的・病的意義は未だ明らかにはされていない。

これまでいくつかのタンパク切断酵素が RANKL 切断活性を持つとされてきたが、未だ生理的・病的に意義のある RANKL 切断酵素は同定されていない。a disintegrin and metalloproteinase domain family (ADAM)17 あるいは ADAM19 欠損マウスの胚線維芽細胞の RANKL 切断活性は野生型細胞と差が無い。matrix metalloproteinase 14 (MMP14 あるいは membrane-type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP とも呼ばれる)も RANKL を切断し得るが、その切断部位はこれまでに報告されている部位とは異なっている。これらの結果から、RANKL 切断にはこれまでに報告されているもの以外の分子が関わっている可能性が示唆される。

RANKL 切断を直接あるいは間接的に調節する分子を同定するために、申請者は新しいスクリーニング系を確立した。

方法

secreted placental alkaline phosphatase (SEAP)と RANKL の stalk region、膜貫通ドメイン、細胞内ドメイン(truncated RANKL, tRANKL)の融合タンパクを発現するベクター(tRANKL-SEAP)を作成した。このプラスミドとヒト MMP14 発現ベクターを 293T 細胞に共発現すると、培養上清中のアルカリフォスファターゼ活性の上昇が認められた。このアッセイ系を用いて、マウス骨髄ストローマ細胞株 ST2 の cDNA ライブラリーについて RANKL 切断活性を持つ分子のスクリーニングを行った。

結果、考察

スクリーニングした 100,000 クローンから 9 つのポジティブクローンが同定された。これらの cDNA 断片のシーケンスを同定することにより、ポジティブクロンの 1 つが Ca^{2+} -promoted Ras inactivator (CAPRI)の新しいスプライスバリエーション(Δ CAPRI)である事が分かった。CAPRI は本来 Ras シグナル系の抑制因子である RasGAP の一つとして同定された分子であり、Arg473Ser 変異により CAPRI の RasGAP 活性は減少し、ATP あるいは ionomycin による Erk のリン酸

化は亢進することが報告されている。 Δ CAPRI は RasGAP ドメイン内において Arg473 を含む 1 エクソン(138-bp)を欠損しているが、この部分は CAPRI の FLR motif が RasGTPase の活性部分である arginine-finger loop を安定化している部分でもある。以上のことから、 Δ CAPRI は Arg473Ser 変異体と同様に優性阻害型として働き、Ras の活性を促進する可能性が考えられた。その他の幾つかのポジティブクローンには既に切断活性を持つ事が報告されている MMP14 が含まれていた。RT-PCR により Δ CAPRI はマウス骨芽細胞および破骨細胞に発現していることが示されたが、その発現量は wtCAPRI に比して低かった。

tRANKL-SEAP と野生型 CAPRI(wtCAPRI)を同時にトランスフェクトした 293T 細胞の培養上清は低いアルカリフォスファターゼ活性しか示さなかったが、 Δ CAPRI の過剰発現により培養上清への tRANKL-SEAP の放出は有意に促進された。しかし wtCAPRI を同時に発現させることにより切断は抑制され、 Δ CAPRI と wtCAPRI は拮抗する働きを持つことが示唆された。 Δ CAPRI による全長 RANKL の切断亢進はウエスタンブロッティングで示された。以上の結果から、293T 細胞において Δ CAPRI の発現により膜結合型 RANKL の切断が

増加する事が示唆された。同様に骨芽細胞系の細胞株である SaOS2 細胞においても、 Δ CAPRI の過剰発現により RANKL の切断が亢進した。

wtCAPRI は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により C2 ドメイン依存性に迅速に細胞膜へと移動し、RasGAP 活性を上昇させ Ras/Mek/Erk シグナル系を抑制するが、 Δ CAPRI も、NIH3T3 あるいは 293T 細胞において Ca ionophore である ionomycin 刺激後に細胞膜へと移動する事が細胞免疫染色および細胞画分の分析により示された。wtCAPRI を過剰発現させた 293T 細胞では Erk の活性化が抑制される一方、 Δ CAPRI の過剰発現により ionomycin による Erk のリン酸化が増強された。この結果から Δ CAPRI は Ras シグナル系を活性化することが明らかになった。

恒常活性型 Ras (Ras^{CA})の過剰発現により 293T 細胞における RANKL 切断は有意に亢進した。 Δ CAPRI により促進した RANKL 切断は、優性阻害型 Ras (Ras^{DN})の共発現により有意に抑制された。しかしながら興味深い事に、293T 細胞において恒常活性型 Mek1 (Mek^{CA})による Erk 活性の上昇は培養上清中のアルカリフォスファターゼ活性を増加させなかった。これらの結果は Ras の活性化が RANKL の切断に

重要な役割を果たすこと、その下流では Mek-Erk 以外のシグナル伝達系が関与している可能性が示唆された。RANKL 切断を調節している Ras 下流のシグナル系を明らかにするために更なる検討が必要と考えられた。

293T 細胞から抽出した mRNA に対するリアルタイム PCR により、 Δ CAPRI は MMP14 の発現量を増加させるが、同時に Ras^{DN} を共発現させると発現上昇が有意に抑制される事、Ras^{CA} は MMP14 の発現量を増加させるが、Mek^{CA} は MMP14 の発現量に影響を与えない事が示された。この結果より、 Δ CAPRI は MMP14 の発現上昇を介して RANKL 切断を亢進させる事が示唆された。MMP14 に対する siRNA は SaOS2 細胞において内在性の MMP14 の発現を抑制し、 Δ CAPRI により亢進した RANKL の切断を阻害した。

MMP13 欠損マウスは骨梁の増加などの骨格系の異常を示すことが最近報告されたが、MMP13 を過剰発現しても培養上清中のアルカリフォスファターゼ活性の上昇はごくわずかであり、MMP13 の RANKL 切断活性は MMP14 に比較してきわめて弱く、MMP13 が生理的・病的な RANKL shedding に関与している可能性は低いと考えられた。

総括

申請者は RANKL 切断に関わる分子に対する新しいライブラリースクリーニング法を確立し、CAPRI のスプライスバリエントである Δ CAPRI をその候補の一つとして同定した。 Δ CAPRI は Ras シグナル系を活性化し、Mek-Erk 系とは独立のシグナル伝達系を介して MMP14 の発現増加を促し、RANKL 切断を引き起した。本研究から Δ /wtCAPRI-Ras-MMP14 系が RANKL 切断において重要な役割を果たす事が示された。