

論文の内容の要旨

論文題目 破骨細胞形成に必須な持続的 RANK シグナルの伝達機構

指導教員 井上 純一郎

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 田口 祐

骨は骨格として身体の形態を維持するだけでなく、カルシウムの貯蔵や造血など様々な役割を担う多機能臓器である。骨は骨芽細胞による造骨・骨形成と、破骨細胞による溶骨・骨吸収の活性バランスにより一定量に保たれており、そのバランスの破綻は様々な骨疾患を呈することが知られている。特に破骨細胞は、骨粗鬆症や関節リウマチにおける骨量減少、癌骨転移における転移空間形成の原因細胞と考えられている。そのため、破骨細胞の分化・活性化のメカニズムを解明することは、骨疾患の発症・病態の理解及びそれらに対する治療法開発に必要不可欠である。現在、破骨細胞を標的として骨疾患治療に主に使われているビスフォスフォネート系薬剤には多くの副作用があり、破骨細胞形成を特異的・選択的に抑制する薬剤の開発が待たれている。

破骨細胞は造血幹細胞由来の単球/マクロファージ系前駆細胞から、分化誘導される多核の巨大細胞である。骨芽細胞などから分泌されるサイトカイン macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)は破骨前駆細胞/破骨細胞に生存シグナルを与え、同じく骨芽細胞などで発現されるサイトカイン receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)は破骨前駆細胞に分化シグナルを与える。この両サイトカインの刺激により、破骨細胞は分化・成熟する。

RANKL の受容体 RANK は tumor necrosis factor receptor (TNF-R) superfamily に

属しており、RANKL が結合することで TNF-R associated factor 6 (TRAF6)を介して IKK や MAPKs が活性化され、転写因子 NF- κ B や AP-1 が活性化される。また、免疫グロブリン様受容体と会合するアダプター分子 DNAX-activating protein 12 (DAP12)と Fc-receptor common γ -subunit (FcR γ)が RANKL 刺激依存的に活性化され、Syk/Btk/BLNK—phospholipase C γ (PLC γ)—細胞内 Ca²⁺濃度振動—calcineurin の順で活性化され、破骨細胞分化のマスター転写因子 NFATc1 が活性化される。NFATc1 は NF- κ B や AP-1 と協調的に働き、NFATc1 自身をオートクライン的に発現誘導する。この NFATc1 発現誘導によって破骨細胞分化が誘導されることが明らかになっている。この DAP12/FcR γ を介したシグナル伝達経路は、co-stimulatory signal 経路と言われている。

RANKと同じ TNF-R superfamily に属する CD40も破骨前駆細胞上に発現しており、RANKと同様に TRAF6 を介して NF- κ B や AP-1 を活性化できるが、破骨細胞分化を誘導することはできない。そのため、RANK と CD40 の機能差より、RANK には破骨細胞分化誘導に必須な機能領域が特異的に存在していると考えられた。本研究はこの RANK 特異的な機能領域を同定し、RANK による破骨細胞分化誘導の詳細なメカニズムの解明を目的として展開した。

当研究室では以前に、ヒト CD40 (hCD40)の細胞外領域とマウス RANK (mRANK)の膜貫通領域・細胞質内領域を融合させたキメラ受容体(h40/mRK-EAA)をマウス破骨前駆細胞に retro-virus を用いて発現させ、 α -hCD40 抗体で h40/mRK-EAA のみを特異的に刺激して、破骨細胞分化を誘導する実験系を構築していた。この実験系を応用し、h40/mRK-EAA の細胞質内領域における欠失変異受容体をシリーズ(del-1 から del-8 と命名)で作成して、それぞれの破骨細胞分化誘導能を検討することで、RANK 細胞質内領域において破骨細胞分化誘導に必須な領域を探索した。その結果、Ser-501 から Val-539 を欠失した del-6 受容体では破骨細胞分化誘導能が消失していた。Ser-501 から Val-539 は TRAF6 結合部位とは異なる領域であり、新規機能領域であることが示唆された。また、この欠失領域を含む近辺のアミノ酸配列が進化的に高度に保存されていることがアライメント解析から明らかになったので、Pro-487 から Glu-546 の領域を Highly Conserved domain in RANK (HCR)と名付けた。

HCR の機能を解明するために、h40/mRK-EAA もしくは del-6 受容体を破骨前駆細胞に発現させ、 α -hCD40 抗体で刺激して RANK 下流のシグナル分子について調べて比較した。その結果、90 分間までの短時間刺激に対する応答では、IKK や MAPKs、co-stimulatory signal 経路の PLC γ 2 の活性化においては、h40/mRK-EAA と del-6 では差がみられず、HCR は短時間刺激では機能していないことが示唆された。しかし、刺激 48 時間後までシグナルを調べて比較したところ、IKK と PLC γ 2 が h40/mRK-EAA への刺激では 48 時間後まで活性化

されていたのに対し、del-6 受容体における活性化は顕著に減少していた。また、RANKL 刺激24時間後の分化途中の細胞にPLC阻害剤を投与することで、破骨細胞分化誘導が阻害されることが明らかになり、長期活性化の重要性が示唆された。更に、破骨細胞分化を誘導できないhCD40にHCRを挿入したキメラ受容体(h40/HCR)では、破骨細胞を分化誘導できるようになり、PLC γ 2の活性化も長期維持されることが示された。これらの結果から、HCRにはIKK/NF- κ BとPLC γ 2/co-stimulatory signalの活性化を長期継続維持してNFATc1の発現誘導を引き起こす機能が有り、破骨細胞分化誘導に必須な新規機能ドメインであることが明らかになった。

次に、HCR機能の分子メカニズムを明らかにするために、HCR結合タンパク質の同定を試みた。遺伝子破壊マウス等の解析により破骨細胞分化に重要であると既に報告されている分子のうち、RANKシグナルに関与すると思われる分子をHCR結合因子候補として考え、HCRとの結合を調べた。その結果、Grb2-associated binding protein 2 (Gab2)とDAP12がHCRと結合し得ることが明らかになった。更に、Gab2はHCRに分化刺激依存的に結合することが明らかになり、HCRにおいて新規シグナル複合体が形成される可能性が示唆された。

HCRのアミノ酸配列に対して相同性の有るタンパク質はRANK以外には見出せず、HCRはRANK特異的配列であることが示唆された。そのためHCRにおけるシグナル複合体はRANKシグナル特異的に機能している可能性が高く、副作用の少ない破骨細胞分化抑制剤を開発する標的として最適に思えた。即ち、HCRペプチドを破骨前駆細胞内に過剰に存在させることで、HCRのシグナル複合体形成を阻害して破骨細胞分化を抑制できると考えられた。そこで実際に、HCRペプチドを破骨前駆細胞内に過剰発現させたところ、破骨細胞の形成が顕著に抑制された。この結果は、仮説通りにHCRペプチドが破骨細胞分化抑制剤として機能することを示唆しており、溶骨性骨疾患に対する治療法の開発において重要な知見となるだろう。今後、HCRペプチドの導入方法や、*in vivo*での抑制効果の検証を行いたい。

HCR機能の分子メカニズムをより詳細に明らかにするために、h40/mRK-EAA、del-6受容体、hCD40、h40/HCRの細胞内局在性を解析した。その結果、HCRを持つ受容体は刺激依存的に細胞膜上から細胞内へinternalizationされ、late endosomeに局在することが明らかになった。HCRは、受容体の局在を支配することで活性を調節する機能を保持している可能性が示唆された。

本研究における全ての結果を総合すると、RANKシグナルにおける新規分子メカニズムモデルが提唱できる。従来までは、RANK/RANKLはTRAF6を介してNF- κ Bを活性化し、同時にDAP12やFcR γ が外部刺激によって活性化されてPLC γ -Ca²⁺濃度振動という順にco-stimulatory signal経路が活性化されると考えられていた。しかし、本研究結果から、まずRANKL刺激によってTRAF6を介したNF- κ Bの活性化が起こり、次いでHCRにおいてGab2

と DAP12 を含むシグナル複合体が形成され、RANK は細胞内へ internalization して late endosome に局在し、RANK シグナルの活性化を維持することで細胞内 Ca^{2+} 濃度振動が引き起こされて NFATc1 の発現誘導が起こり、破骨細胞分化が誘導されるというモデルが考えられる。従来までのモデルとは、RANK の細胞内局在が変化する点と、HCR における新規シグナル複合体が形成される点において大きく異なる。本研究は今後の RANK 解析において重要な知見と成り得るだろう。

本研究は、破骨細胞分化誘導における RANK シグナルの新規分子メカニズムを明らかにすると同時に、溶骨性骨疾患に対する新規治療薬開発の可能性を示した。これらのことは、破骨細胞分化を理解して、より良い治療方法を開発するための重要な知見となったであろう。