

# 論文の内容の要旨

## Mechanism of RANKL translocation to the cell surface in osteoblasts

### (骨芽細胞表面への RANKL 輸送機構の解析)

苅谷 嘉顕

#### 【序論】

生体における骨量は、破骨細胞による骨吸収および骨芽細胞による骨形成が協調的に起こる骨リモデリングにより厳密に調節され、その恒常性が維持されている。そのため、骨吸収が過剰となることによって骨代謝バランスが破綻する骨粗鬆症などの疾患に対しては、骨吸収抑制が治療戦略となる。しかしながら、既存の骨吸収抑制療法を長期的に行った場合、骨リモデリング全体が過剰に抑制され脆弱な骨へと変質する可能性が近年指摘されてきている。そのため、破骨細胞活性化機構の解析は、骨代謝の生理学的理解のみならず、骨代謝疾患の新規作用標的の探索という臨床上の課題解決の上でも重要である。

過去の多くの報告から、細胞間接触を介して起こる骨芽細胞上のリガンド分子 Receptor Activator of NF- $\kappa$ B (RANK) Ligand (RANKL) と、破骨細胞上の受容体分子 RANK の結合を起点とするシグナル伝達が、破骨細胞分化を誘導する中心的役割を果たすことが示されている。従って、骨芽細胞表面上の RANKL 発現量は生体の骨吸収レベルを決定する主要因であると想定されるが、RANKL が骨芽細胞表面へと輸送され

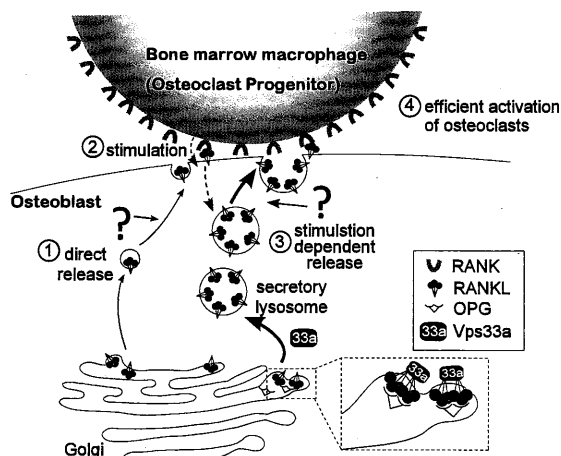


Fig.1 これまでの研究から想定された骨芽細胞における RANKL 細胞内輸送機構

る経路は未解明であった。私の過去の検討および当研究室の青木らによる種々の *in vitro* による検討結果から、骨芽細胞における RANKL 挙動に関する Fig. 1 のようなモデルが想定された。すなわち、ゴルジ体にて新規合成された RANKL の大部分は OPG および Vps33a 依存的に分泌型リソソームへと輸送され、直接細胞表面へ輸送されるのは極一部と考えられた。この少量の RANKL と破骨前駆細胞の接触に伴う骨芽細胞内へのシグナル入力の結果、RANKL が分泌型リソソームより接触面へと移行することが想定された。このような RANKL 挙動は効率的な破骨細胞形成に重要であると考えられるが、*in vitro* 骨芽細胞系を用いた解析結果に基づいたモデルであり、生体レベルで骨恒常性への寄与は不明であった。そこで本研究では、これまで未解明であった RANKL 輸送経路の背後の分子機構の解析を通じて、第一章では分泌型リソソームから刺激依存的に細胞表面へ移行する経路（刺激依存的経路）、第二章ではゴルジ体から直接細胞表面へ輸送される経路（直接経路）が骨恒常性へ与える生理的影響の解析を試みた。

## 【方法及び結果】

### 第一章 Rab27a および Rab27b の刺激依存的経路への関与

#### 1.分泌型リソソームからの刺激依存的経路に Rab27a および Rab27b が関与する

骨芽細胞以外の細胞種における分泌型リソソームの分泌過程においては、低分子量 G タンパク質 Rab27a および Rab27b の関与が複数報告されていたため、RANKL の刺激依存的経路への Rab27a/b の関与を検討した。RANK を表面に固相化したビーズ（RANK ビーズ）による刺激後、接触面に集積し、RANK と結合した RANKL 分子の量を刺激依存的 RANKL 細胞膜移行量の指標として評価した。マウス骨芽細胞様細胞の ST2 細胞に対し、siRNA を用いて Rab27a または Rab27b を一過性に発現抑制した後、GFP を付加した RANKL (GFP-RANKL) を一過性導入した。その後、RANK ビーズにて刺激後、刺激依存的 RANKL 細胞膜移行量を評価したところ、Rab27a または Rab27b 発現抑制下では、その減少が観察された (Fig. 2)。また、同様に Rab27a または Rab27b を発現抑制し GFP-RANKL を導入した ST2 細胞に対し、蛍光標識デキストランをリソソーム内にプレロードし、その後 RANK ビーズ刺激を行って、デキストラン及び RANKL の局在を観察した。その結果、コントロール群ではビーズの輪郭への RANKL の局在移行が観察され、これに伴いリソソームにプレロードしたデキストランが消失し、RANKL 小胞が細胞表面に融合したことが示唆された。一方で、Rab27a または Rab27b 発現抑制下ではデキストランを内部に保持した RANKL 小胞がビーズ近傍に集積する傾向が観察された。これらの結果より、Rab27a および Rab27b は、刺激依存的経路のうち、特に細胞膜直下でのリソソームと細胞表面との融合過程に関与することが示唆された。また、同様の解析を Rab27 のエフェクター分子に対しても行った結果、Synaptotagmin like protein (Slp) 4-a, Slp5, Munc13-4 が刺激依存的経路に関与することが示唆された (Fig. 3)。Rab27a または Rab27b 抑制下では、



Fig.2 Rab27a または Rab27b 発現抑制により刺激依存的な RANKL 細胞膜移行は抑制される

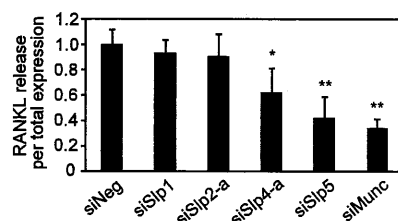


Fig.3 Slp4-a, Slp5, Munc13-4 発現抑制により RANK 刺激依存的な RANKL 細胞膜移行は抑制される

各エフェクター分子発現抑制の効果が消失したことから、刺激依存的経路において、Slp4-a, Slp5, Munc13-4 が Rab27a または Rab27b と機能共役すると考えられた。

## 2. Munc13-4 機能欠損マウスでは骨量が増大する

刺激依存的な RANKL 細胞膜移行が *in vivo* 骨恒常性維持に与える影響を検証するため、Munc13-4 遺伝子に機能不全となる変異を有する Jinx マウスを用いて骨表現型の解析を行った。各種マウスから採取した初代培養骨芽細胞と野生型マウスから回収した骨髄マクロファージの共培養を行ったところ、Jinx マウス由来の骨芽細胞との共培養系で

は、野生型に比べ破骨細胞形成マーカーである酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (TRAP) の酵素活性が著しく低下し (Fig. 4A)、破骨細胞分化支持能の低下が示唆された。さらに、Jinx および野生型マウスに関し、 $\mu$ CT を用い脛骨近位部骨幹端の 3 次元構造を観察したところ、Jinx マウスでは、骨量が増大していた (Fig. 4B)。非脱灰切片を用いた計測より同部位における破骨細胞数が減少していることも明らかとなり、Jinx マウスでは骨芽細胞の破骨細胞分化支持能低下に伴って骨量が増大していることが示唆され、*in vivo* の骨表現型が *in vitro* から予想されるものと合致した。

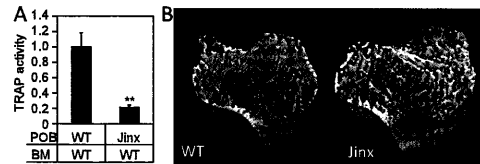


Fig.4 Munc13-4 が機能欠損した Jinx マウス由来骨芽細胞は破骨細胞分化支持能が低下し、脛骨骨幹端付近の骨量が増加する (A) 骨芽細胞 (POB) と骨髄マクロファージ (BM) の共培養後の TRAP 活性、(B) 脛骨近位部骨幹端付近の  $\mu$ CT 画像

## 第二章 Rab3d および Rab27a の直接経路への関与

### 1. Slp1 はゴルジ体からの直接経路に関与し、その遺伝子欠損は骨量を増大させる

Rab27 エフェクター分子のうち Slp1 および Slp2-a は、刺激依存的経路への関与は見出されなかったものの、Slp1 または Slp2-a 欠損マウスおよび野生型マウスの脛骨近位部骨幹端に関して 3 次元構造を  $\mu$ CT にて解析した。その結果、Slp2-a 欠損マウスでは有意な変化は観察されなかった一方で Slp1 欠損マウスにおける骨量の増加が明らかとなった (Fig. 5A)。このため、Slp1 の RANKL 細胞内輸送過程への関与をより詳細に検討することとした。まず、無刺激状態での細胞表面上 RANKL 発現量を評価したところ、Slp1 欠損マウス由来骨芽細胞では野生型に比べ減少していた (Fig. 5B)。さらに、RANKL のリソソームへの

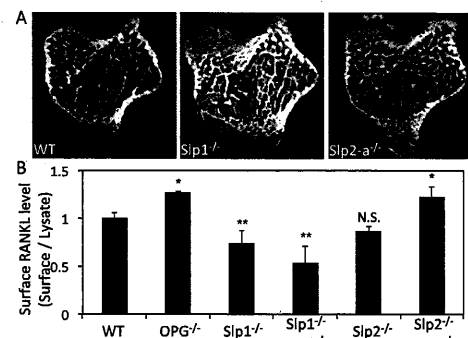


Fig.5 Slp1 欠損によりゴルジ体からの直接経路が抑制され、脛骨骨幹端付近の骨量が増大する (A) 脛骨近位部骨幹端付近の  $\mu$ CT 画像、(B) 各遺伝子欠損マウス由来骨芽細胞での細胞全体での内在性 RANKL 発現量に対する細胞表面上の発現割合 (相対値)

の積み込み過程が破綻している OPG 欠損骨芽細胞では、RANKL はゴルジ体から直接経路を介して細胞表面へ輸送されると考えられたため、OPG 単独欠損骨芽細胞と OPG・Slp1 二重欠損骨芽細胞の細胞表面上 RANKL 発現量を比較することで、Slp1 の直接経路への関与を検討した。その結果、細胞表面上 RANKL 発現量は、Slp1・OPG 二重欠損骨芽細胞では、OPG 単独欠損に比べ有意に減少し (Fig. 5B)、Slp1 の直接経路への関与が示唆された。これらの結果から、Slp1 が RANKL 直接輸送経路に関与し、この直接輸送経路の遮断により骨量が増大する可能性が示唆された。

## 2. Rab3d および Rab27a はゴルジ体からの直接経路に関与する

Slp1 と共役して機能する Rab 分子を探索するため、まずゴルジ体からの直接経路に関与する Rab 分子の同定を試みた。ゴルジ体からの分泌に関与する分子として Rab3, Rab8, Rab27 のサブファミリーメンバーに焦点を絞った。RANKL が主として直接経路を介して細胞表面へ輸送される性質を有する OPG 欠損骨芽細胞において、siRNA 導入により発現が認められた各 Rab 分子を発現抑制し、細胞表面上 RANKL 発現量を評価した。その結果、Rab3d または Rab27a の抑制により表面 RANKL 量が減少し、これら分子の直接経路への関与が示唆された(Fig. 6)。また、Slp1 および OPG を共に欠損している骨芽細胞を用いた際には、Rab27a 抑制に伴う効果は観察されたが、Rab3d 抑制に伴う効果は消失した。このことから、ゴルジ体からの直接経路において Slp1 は Rab3d と共役することが示唆された。

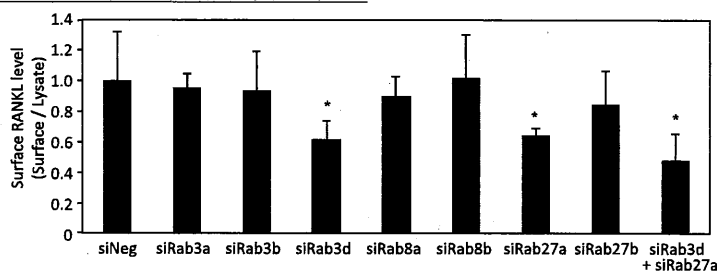


Fig.6 Rab3d および Rab27a 発現抑制によりゴルジ体からの直接経路が障害される 各 Rab 発現抑制後の OPG 欠損骨芽細胞における表面 RANKL 発現量

その結果、Rab3d または Rab27a の抑制により表面 RANKL 量が減少し、これら分子の直接経路への関与が示唆された(Fig. 6)。また、Slp1 および OPG を共に欠損している骨芽細胞を用いた際には、Rab27a 抑制に伴う効果は観察されたが、Rab3d 抑制に伴う効果は消失した。このことから、ゴルジ体からの直接経路において Slp1 は Rab3d と共役することが示唆された。

### 【まとめと考察】

本研究において私は、RANKL の骨芽細胞表面への輸送経路のうち、①分泌型リソソームからの刺激依存的経路には Rab27a, Rab27b およびエフェクター分子 Slp4-a, Slp5, Munc13-4 が共役して機能していること、②ゴルジ体からの直接経路には Rab3d と Slp1 と共役する経路と Rab27a が関与する経路が機能していることを見出した。これらの経路はいずれも生体レベルで骨恒常性維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

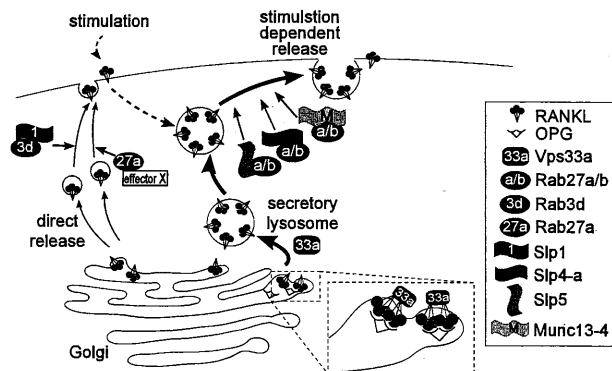


Fig.7 骨芽細胞表面への RANKL 輸送機構

本研究を通じて、基底状態において細胞表面に微弱に発現する RANKL 分子に破骨前駆細胞が結合することで、分泌型リソソームから RANKL が接触面へと移行し、破骨細胞分化を効率的に起こすという一連のスキームが、生体レベルの骨恒常性維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。RANKL の局在を制御することで、生体レベルで骨量を変動させうると考えられ、残る未解明部を明らかにし、最終的には RANKL の挙動を効果的に制御する新規創薬標的の発見が期待される。