

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り、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骨代謝関連疾患に対しては、骨吸収抑制が治療戦略となるが、現在臨床使用されている薬剤は、種々の副作用・長期毒性発現が近年問題視されつつある。破骨細胞の活性化において、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中心的役割を果たす。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、生体内で **RANKL** が骨芽細胞表面へと輸送される経路は未解明であった。申請者らによるこれまでの種々の *in vitro* による検討結果から、次のような仮説的モデルが想定された。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。しかし、*in vitro* 骨芽細胞系を用いた解析結果に基づいたこの **RANKL** 挙動の生体レベルでの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を解明することで、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）、および、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行っている。これらの解析を通じて、各 **RANKL** 輸送経路の生体レベルでの骨代謝における生理的意義の解明および新規創薬標的としての可能性の検討を試みている。

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刺激依存的経路に関与する分子の同定、および、この経路の生理的寄与の解析を試みている。過去の分泌型リソソームの分泌に関与する分子の知見から、低分子量 G タンパク質 **Rab27a** および **Rab27b** を想定し、**RNAi** による発現抑制時の刺激依存的 **RANKL** 細胞膜移行量が減少すること、および、種々の局在観察実験から **Rab27a** および **Rab27b** が刺激依存的経路に関与することを *in vitro* にて見出している。また、**Rab27a** または **Rab27b** と協調的に働く分子として **Slp4-a**, **Slp5**, **Munc13-4** の関与を同様の実験系にて見出している。これら解明した分子機構に基づき、**Munc13-4** に機能欠損変異を有するマウスの骨表現型を解析し、骨量が大幅に増加することを確認している。また、このマウスの骨芽細胞の破骨細胞分化支持能が著しく低いことも確認されている。これらの結果は、刺激依存的経路が骨恒常性維持に重要な役割を果たすことを、初めて生体レベルで示唆したものである。

第二章では、ゴルジ体から直接細胞表面へ輸送される直接経路に関与する分子の同定、および、この経路の生理的寄与の解析を試みている。各種遺伝子欠損マウス由来の骨芽細胞に対して、**RNAi** による発現抑制した際の細胞表面上 **RANKL** 発現量を評価することで、直接経路は少なくとも 2 種類の経路が存在することが示唆されている。すなわち、**Rab3d** が **Slp1** と共役して機能する経路と **Rab27a** が関与する経路である。また、**Slp1** 欠損マウスの骨表現型を解析し、骨量の増加傾向が確認されている。**Slp1** 欠損骨芽細胞での破骨細胞分化支持能低下も観察されており、刺激依存的経路の破綻時の破骨細胞分化支持能低下レベルとの比較から、直接経路と刺激依存的経路が連続的に起こるという **RANKL** 挙動に関する仮説的モデルと矛盾しないと考えられる。これらのことから、直接経路も骨恒常性維持に重要な役割を果たすことが示唆されている。

以上、申請者の研究は、これまで未解明であった骨芽細胞における **RANKL** の細胞表面への輸送機構、すなわち、刺激依存的経路および直接経路に関与する分子を同定し、いずれの経路も生体レベルで骨恒常性維持に重要な役割を果たすことを見出している。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である可能性が示唆され、骨代謝においてこれまで解析が充分に行われてこなかった分子の細胞内動態の重要性に脚光を浴びせるモデル研究としての価値が非常に大きい。さらに、本研究から得られた知見は、**RANKL** の局在を制御することにより生体レベルで骨量を変動させようことを示唆している。残る未解明部を明らかにすることにより、**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、臨床への貢献が期待できる意義深い研究である。従って、申請者の業績は博士（薬学）の授与にふさわしいものと判断した。