

論文の内容の要旨

論文題目

骨芽細胞に発現する RANKL は破骨細胞由来 エクソソームを受容し、骨形成促進に関与する

氏名 青木 重樹

【序論】

骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のサイクル(骨リモデリング)を介して品質が維持されており、骨吸収－骨形成バランスの破綻は骨粗鬆症を含む種々の骨代謝疾患の原因となるため、これらの制御機構の分子基盤解明は非常に重要である。破骨細胞の成熟・活性化過程に関しては、receptor activator of NF- κ B (RANK) ligand (RANKL)－RANK シグナル伝達経路が中心的な役割を果たすことが明らかとされてきた。RANKL は骨芽細胞系細胞群や活性化リンパ球などに発現する膜貫通型のリガンド分子であり、従来は骨芽細胞表面に発現するRANKL分子が細胞間接触を介して破骨前駆細胞表面に発現するRANKに結合し、シグナル入力を行うことで破骨細胞への成熟と活性化を誘導していると考えられてきた。しかしながら近年になって、生理的な破骨細胞形成過程においては、主として骨細胞(骨芽細胞から成熟・分化して形成される)がRANKL 供給源としての役割を担っている可能性が、相次いで報告された。また、骨髄腔内において活性化した破骨細胞と骨芽細胞が空間的に近接していないことも示唆されており、骨芽細胞がRANKL の供給源として寄与する割合は低いことが想定されている。これは裏を返すと、骨芽細胞に発現する RANKL 分子の生理的な役割が現状で不明確であることを示唆しており、新たな研究課題と考えられた。また一方で、骨リモデリングの過程がスムーズに進行するために、骨吸収フェーズから骨形成フェーズへのカップリングを媒介する因子の必要性が想定されており、その実体として ephrinB2－EphB4, semaphorin 3A－neurophilin 1 など、幾つかのシグナル伝達経路の関与が報告されてきた。しかし、活性化した破骨細胞と骨芽細胞の接触が生理的条件下では

生じない可能性を考慮すると、一部のシグナル経路に関してはその伝達機構を再検討する必要性も想定され、カップリング機構の全体像の解明には至っていないのが現状である。

我々はこれまで、骨芽細胞に発現する RANKL 分子の大部分はリソソーム内に蓄積されており、複雑な細胞内トラフィック制御を受けていることを明らかとしてきた。特に、骨芽細胞の表面に局在する少量の RANKL 分子は、細胞外からの RANK 刺激を受容し、リソソーム内に蓄積された RANKL 分子の挙動を変化させるシグナル (RANKL 細胞内シグナル) を、骨芽細胞内に発生する能力を有することが見出された。これらの結果を考慮すると、現状では生理的な役割が不明確となっている骨芽細胞に発現する RANKL 分子に関しては、何らかの形で破骨細胞からの RANK シグナルを受容する分子として機能している可能性を想定することができる。本研究では、上述の骨吸収フェーズから骨形成フェーズへのカップリング機構を担うシグナル経路の1つとして、RANKL 細胞内シグナル経路が重要な役割を担っている可能性を想定して検討を進めることとした。

【方法・結果】

1. 破骨細胞は成熟過程において RANK を表面に発現するエクソソームを分泌する

まず、マウス脛骨より採取した骨髄細胞を、N 末に GST を付加した可溶性の RANKL (GST-sRANKL) と M-CSF の存在下で培養し、破骨細胞に分化・成熟させ、培養上清中への RANK 分泌量の推移をサンドイッチ ELISA 法により定量した。RANK は膜タンパク質であるため、何らかの膜小胞に含まれていることが想定され

た。そこで、段階的遠心法による分画を行い、RANK 含有画分の同定も同時に試みた。その結果、破骨細胞への分化・成熟に伴って細胞内 RANK 発現量の増加、及び RANK 分泌量の増加が認められ、破骨細胞活性化の指標である TRAP 酵素活性が最大となる培養 4 日目においてこれらが最大値を示すこと、及び主としてエクソソームの沈殿画分 (100,000 xg) に RANK が回収されることが明らかとなった (Fig. 1A)。この画分を透過型電子顕微鏡により観察したところ、エクソソーム様構造が確認され (Fig. 1B)、エクソソーム沈殿試薬 ExoQuick-TC™ を用いた検討からも上述同様の結果が得られることが確認された。さらに、この画分を免疫沈降法を用いて解析したところ、エクソソーム表面抗原である CD9 と RANK の共沈降も認められ、破骨細胞成熟過程において RANK を含有するエクソソームが分泌されることが示唆された。

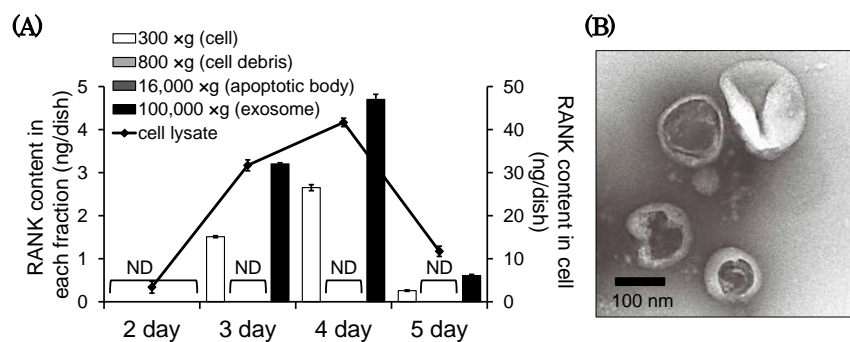


Fig. 1 破骨細胞成熟過程で分泌される小胞と RANK 含有量の分析
(A) 細胞中及び培養上清の段階的遠心分離後の RANK の定量 (n=3, mean±SD; ND, not detected) (B) 超遠心沈殿物の透過型電子顕微鏡像

2. 破骨細胞由来エクソソームは *in vitro* 及び *in vivo* において骨芽細胞の骨形成促進作用を有する

次に、破骨細胞由来エクソソームの骨芽細胞に対する作用を評価するため、破骨前駆細胞様培養細胞である RAW264.7 を 1.と同様に破骨細胞に分化・成熟させ、超遠心によりエクソソーム画分を大量精製し、検討に用いることとし

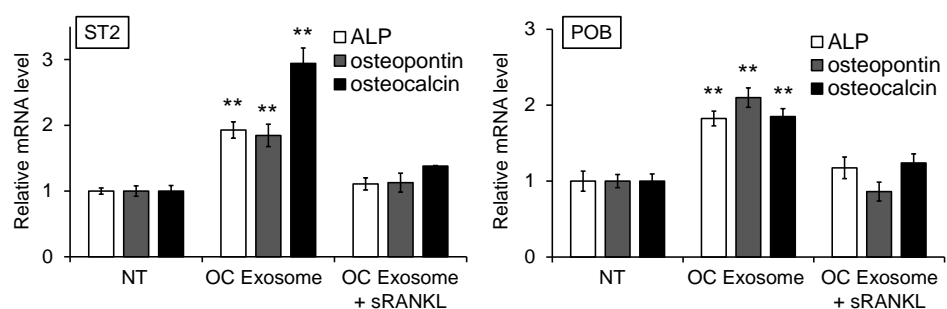


Fig. 2 破骨細胞由来エクソソーム添加後の各種骨形成マーカーの mRNA 発現量変化 (corrected against GAPDH, n=4-6, mean±SD; ALP, 15 day (ST2) or 12 day (POB); the others, 18 day; NT, non treatment; ** p < 0.01 vs NT)

た (OC Exosome)。先述したように、RANK を含有するエクソソームが骨芽細胞に発現する RANKL に結合し、RANKL 細胞内シグナルを発生させる可能性を検証するため、OC Exosome を GST-sRANKL で予め処理し、エクソソーム上の RANK を全て覆ったものを調製し、対比に用いた (OC Exosome + sRANKL)。これらのサンプルをマウス骨芽細胞様培養細胞 ST2、或いはマウス初代培養骨芽細胞 (POB) に添加し、培養を行った。その結果、OC Exosome の添加により骨形成マーカーである alkaline phosphatase (ALP)、osteopontin、osteocalcin の mRNA レベルが有意に上昇することが明らかとなり、さらに RANK を GST-sRANKL で被覆することでその効果は強く抑制された (Fig. 2)。

また、上記 *in vitro* で認められた骨芽細胞活性化効果を *in vivo* で確認するため、コラーゲンゲルに OC Exosome を含浸させ、マウス頭蓋骨欠損モデルを用いて評価した。欠損部へのゲルの留置後 4 週間で、OC Exosome 群では顕著に骨再生効果が認められる一方で、エクソソーム表面の RANK を被覆した場合には、その効果は大きく減弱することが明らかとなり、*in vitro* の結果を支持するものとなった (Fig. 3)。以上の検討から、破骨細胞由来エクソソームは、RANK-RANKL 相互作用を介して骨芽細胞を活性化し、骨形成促進作用を示すことが示唆された。

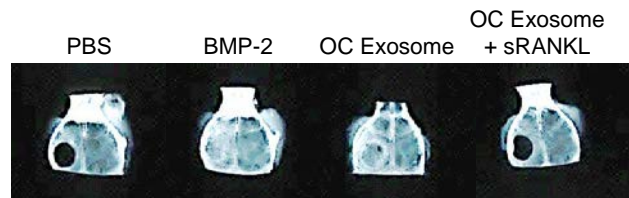


Fig. 3 マウス *in vivo* における破骨細胞由来エクソソームによる骨形成促進効果 (マウス頭蓋骨ソフト X 線画像) (BMP-2, for positive control)

3. 破骨細胞由来エクソソームは RANK-RANKL 相互作用を介して PI3K-Akt-mTORC1 経路を活性化させ、Runx2 の核内移行を促進させる

OC Exosome が骨芽細胞を活性化し、骨形成促進効果を有することが示されたため、次いで ST2 細胞を用い、詳細なシグナル伝達機構の解析を行った。まず、骨芽細胞分化を中心的に制御する転写因子である runt-related transcription factor 2 (Runx2) の核内移行量について検討した。その結果、OC Exosome の添加によって Runx2 の核内移行量が増大し、その結果として骨芽細胞分化が促進する可能性が示唆された (Fig. 4)。

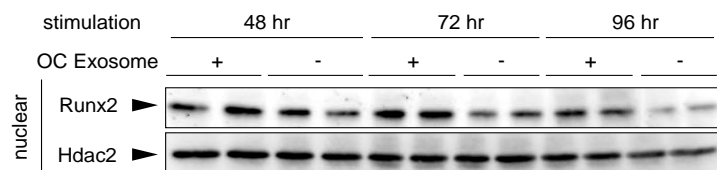


Fig. 4 破骨細胞由来エクソソーム添加後の Runx2 の核内移行量推移 (Hdac2, histone deacetylase 2)

骨芽細胞において、Runx2 は mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1 (mTORC1) によってそのタンパク質発現量、及び活性が制御されることが報告されている。そこで、ST2 細胞に対して OC Exosome を添加し、mTORC1 活性の推移を ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K1) のリン酸化 (Thr389) を指標に評価した。その結果、OC Exosome の添加に伴って、持続的な mTORC1 の活性化が認められ、その効果はエクソソーム表面を GST-sRANKL で被覆することで減弱することが明らかとなった (Fig. 5)。さらに、mTORC1 の活性化を引き起こす上流シグナル経路として、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt の活性化を、それぞれ Akt のリン酸化 (Thr308)、proline-rich Akt substrate 40 kDa (Pras40) のリン酸化 (Thr246) を指標に評価したところ、OC Exosome の添加により同様の活性化推移が認められた (Fig. 5)。さらに、mTORC1 阻害剤である rapamycin で処理することで、OC Exosome 添加に伴う mTORC1 の活性化を抑制した場合、Runx2 の核内移行量が低下することも確認された。また、PI3K

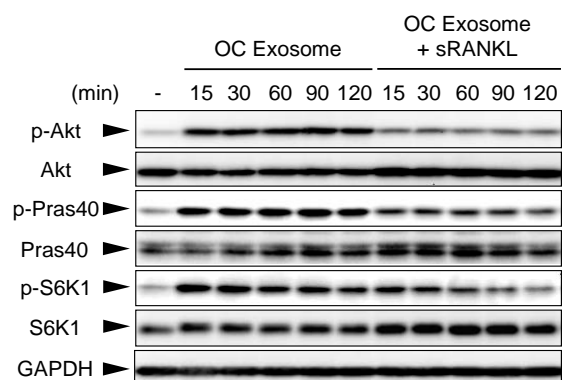


Fig. 5 破骨細胞由来エクソソーム添加後の PI3K-Akt-mTORC1 経路の活性化時間推移

やAktの阻害剤の処理に伴って、mTORC1活性化が抑制されたことも併せて考慮すると、RANKL細胞内シグナル伝達の主経路として、PI3K-Akt-mTORC1経路が考えられ、その下流においてRunx2の核内移行が促進することが示唆された (Fig. 7 参照)。

4. RANKLの細胞内ドメインPRMを介して骨芽細胞内シグナルが伝達される

OC Exosome 刺激に伴い、RANKLの細胞内ドメインを介してシグナルが伝達されることが想定される。RANKLの細胞内ドメインには proline-rich motif (PRM) と呼ばれる特徴的な構造が存在する。Src homology 3 (SH3) ドメインを有するタンパク質は PRM と相互作用する例が多く報告されており、SH3ドメインを有し、かつPI3Kの活性化に影響を与え得る分子として、

Src family kinases (SFKs) の関与が考えられた。そこで、SFKsに焦点を当て、RANKL細胞内シグナルに与える影響を検討した。その結果、ST2細胞において、SFKsの阻害剤であるPP2及びdasatinibの処理によって、OC Exosomeによるシグナル伝達は濃度依存的に抑制されることが示された (Fig. 6)。

また、ST2細胞に、RANKLのPRM内にP29AまたはP39Aの点変異を導入した変異体を過剰発現させた際には、OC Exosome刺激によるシグナル伝達の減弱が認められた。さらに、ST2細胞にRANKを表面に固相化したビーズで刺激を与え、ビーズ界面タンパク質を回収する検討を行ったところ、RANKビーズ刺激にตอบสนองしてRANKL及びSFKsが集積して回収されることも明らかとなった。最後に、RANKLの細胞内ドメインPRMを介してシグナルが伝達されることをより詳細に確かめるために、P29A点変異ノックインマウスを作成した。このマウスより採取した初代培養骨芽細胞に対してOC Exosomeによる刺激を与えたところ、確かにシグナル伝達の減弱が認められ、また、OC Exosomeによる骨形成促進効果も抑制されていた。これらの検討結果を考慮すると、RANKL細胞内シグナルはPRMを介して伝達され、特にPRMと相互作用するSFKsが重要な役割を担うことが示唆された。

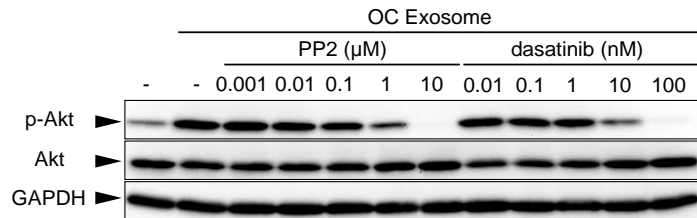


Fig. 6 SFKs 阻害剤による破骨細胞由来エクソソームを介した RANKL 細胞内シグナルの抑制効果

【結論・考察】

本研究において私は、①破骨細胞は成熟過程において、RANK を含有するエクソソームを分泌すること、②そのエクソソームは骨芽細胞に対して骨形成促進作用を有すること、③エクソソーム上のRANKと骨芽細胞上のRANKLとの相互作用を起点とし、骨芽細胞内に SFKs からPI3K-Akt-mTORC1、Runx2に至るシグナルカスケードを発生させることを見出した (Fig. 7)。骨芽細胞において、RANK刺激に伴って骨芽細胞内にシグナルが発生することは示唆されていたが、その詳細な機序、役割はこれまで不明であった。本研究から、破骨細胞由来エクソソームの存在が示唆され、それを骨芽細胞が受容することによって、骨芽細胞活性が上昇し、骨形成が促進することが新たに見出された。

これまで、骨吸収フェーズから骨形成フェーズへの移行を媒介するカップリング機構の全体像は明らかとされていないが、本研究で見出された成熟破骨細胞由来のエクソソームはカップリング機構において重要な役割を果たす可能性が想定される。さらに、本研究で見出された RANKL 細胞内シグナル伝達経路は新規骨形成促進薬開発の標的となる可能性もある。

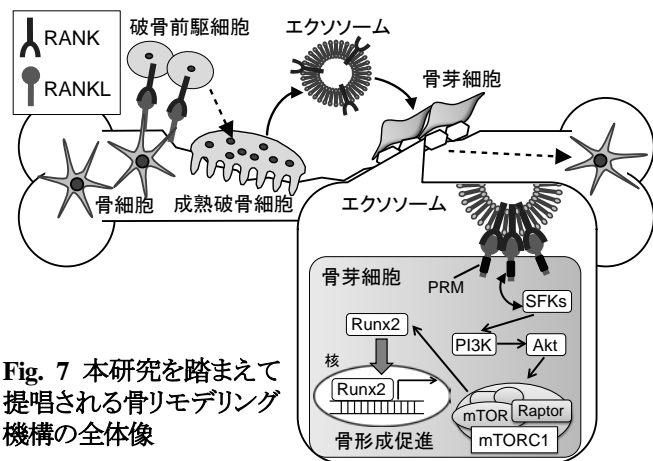


Fig. 7 本研究を踏まえて提唱される骨リモデリング機構の全体像