

〔別紙 2〕

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 青 木 重 樹

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である骨リモデリングを介して品質が維持されている。破骨細胞の成熟・活性化過程に関しては、receptor activator of NF- κ B (RANK) –RANK ligand (RANKL) シグナル伝達経路が中心的な役割を果たす。RANKL は骨芽細胞系細胞群に発現する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、シグナルを入力する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、主として骨芽細胞から分化して形成される骨細胞が RANKL の供給源としての役割を担っている可能性、および骨芽細胞と活性化破骨細胞が空間的に近接していないことが相次いで報告された。このため、骨芽細胞に発現する RANKL 分子の生理的な役割を明らかにする必要があると考えられる。RANKL を含む TNF スーパーファミリーのタンパク質は、対応する TNFR スーパーファミリーの受容体に結合し、シグナルを入力するリガンド分子として働くことに加え、受容体分子との相互作用を介してリガンド分子側にもシグナルを発生させる双方向性分子として機能する例が多く報告されている。そこで申請者は、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 分子に関しても、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し、骨芽細胞内にシグナルを発生させるのではないかと考えた（申請者はこれを「RANKL 細胞内シグナル」と命名している。）。さらに申請者は、RANKL 細胞内シグナルの下流で骨芽細胞の活性化が起こるのではないかと仮説を立て、それが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担うシグナル経路となる可能性を想定して検討を進めた。

第一章では、破骨細胞の分化・成熟過程において表面に RANK を含むエクソソーム小胞が分泌されることを見出しており、そのエクソソームを骨芽細胞が受容した際に、骨芽細胞分化・骨形成促進作用が認められることを明らかとしている。まず、骨芽細胞に発現する RANKL に対して刺激を入力する因子が、破骨細胞から RANK を含む膜小胞の形で放出されるのではないかと考えて探索を試みている。具体的には、段階的遠心法により、エクソソームと考えられる画分に RANK が濃縮的に回収されることを明らかとしている。また、その画分の電子顕微鏡による形状の観察や、エクソソーム表面抗原タンパク質との免疫沈降による解析等か

ら多面的に、破骨細胞の成熟過程において RANK を含有するエクソソームが放出されることを示している。さらに、破骨細胞由来エクソソームは *in vitro* において骨芽細胞の分化促進作用を有すること、およびマウス *in vivo* において骨形成促進作用を示すことを見出している。また、この作用には RANK-RANKL 相互作用が重要であることも示している。これら一連の結果は、破骨細胞からエクソソームが放出されることを生化学的に解析した初めての例であり、さらにこのエクソソームが RANK-RANKL 相互作用を介して骨芽細胞へのシグナル入力因子として機能することを *in vitro*、*in vivo* 両面から明らかとしている。

第二章では、RANKL 細胞内シグナルの伝達機構をより詳細に検討している。前章で見出された破骨細胞由来エクソソームによる骨芽細胞活性化効果から、骨芽細胞分化を中心的に制御する runt-related transcription factor 2 (Runx2) に着眼するところから始まり、RANKL の細胞内ドメイン proline-rich domain (PRM) を介したシグナル入力までボトムアップする形で論理的に検討を進めている。その結果、破骨細胞由来エクソソームの刺激に伴って、骨芽細胞内の RANKL 直下で Src family kinases (SFKs) の集積が起こり、その下流で phosphoinositide-3-kinase (PI3K) -Akt の活性化、次いで mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1 (mTORC1) の活性化を介して Runx2 の核内移行量が増大することを見出し、その結果として骨芽細胞分化が促進されることを示唆している。さらに、RANKL の細胞内ドメイン PRM の点変異マウスを作成し、そのマウスより採取した骨芽細胞を用いた解析も行っている。これら一連の解析から、従来リガンド分子としてのみ認識されてきた RANKL 分子が起点となり骨芽細胞内シグナルが発生することを初めて明確な形で示している。

以上、申請者の研究は、生理的意義が不明確であった骨芽細胞に発現する RANKL 分子が受容体として機能し得ることを見出しており、RANKL に対するリガンド因子としての破骨細胞由来エクソソームの発見から、骨芽細胞内シグナル下流での骨芽細胞分化促進作用までを明らかとしている。これら一連の研究結果は、破骨細胞由来エクソソームが骨カップリング因子として機能する可能性を提示することで骨代謝研究領域におけるマイルストーンとなるだけでなく、近年脚光を浴びているエクソソームの生化学研究としても意義深い。さらに、RANKL 細胞内シグナルが新規骨形成促進薬の標的となる可能性を期待させ、臨床への貢献が十分大きいと考えられる。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。