

骨芽細胞の RANKL が骨形成を促進する創薬標的になることを発見

骨粗鬆症の新規治療薬開発に繋がる可能性も

1. 発表者：

本間 雅（東京大学医学部附属病院 薬剤部 講師）
池淵 祐樹（東京大学医学部附属病院 薬剤部 助教）
青木 和広（東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授）
鈴木 洋史（東京大学医学部附属病院 薬剤部 教授）

2. 発表のポイント：

骨芽細胞に発現する RANKL は、破骨細胞から放出される RANK を認識する受容体として機能し、骨芽細胞分化促進・骨形成上昇に寄与していることを明らかにしました。骨芽細胞における役割が不明瞭であった RANKL に関して、その生理的な役割を解明した初めての研究となります。研究グループは、骨芽細胞に発現する RANKL が、骨形成を促進する創薬標的となり得る事も示しており、骨粗鬆症に対する新規治療薬の開発に繋がると期待されます。

3. 発表概要：

骨細胞（注1）に発現する RANKL（注2）は、破骨細胞（注3）に発現する RANK（注4）を刺激し、破骨細胞の成熟と骨吸収（老朽化した骨の除去）の促進を行うリガンド分子として知られ、RANKL に対する中和抗体（注5）は骨吸収を抑制する骨粗鬆症治療薬として臨床応用されています。一方、骨芽細胞（注6）に発現する RANKL に関しては、これまでその生理機能が不明瞭のままとなっていました。今回、東京大学医学部附属病院の本間雅講師らを中心とし、東京医科歯科大学など5大学による共同研究グループは、骨芽細胞に発現する RANKL が、破骨細胞から膜小胞（注7）の形で放出される RANK を認識する受容体として機能しており、骨芽細胞分化の促進および骨形成の上昇に寄与していることを、RANKL 遺伝子の点変異マウスを用いた解析などから明らかにしました。骨芽細胞に発現する RANKL は、骨形成を促進するための創薬標的になり得ると考えられ、骨粗鬆症新規治療薬の開発に繋がるものと期待されます。

4. 発表内容：

【研究の背景】

骨は、老朽化した部位が破骨細胞によって吸収除去され、引き続いて骨芽細胞による新しい骨の形成が生じて埋め戻される、という一連のサイクルを繰り返すことで骨量や骨質が維持されています。骨吸収過程から骨形成過程への移行が円滑に進行する背景には、両者を繋ぐ何らかのカップリング機構が存在すると想定され、近年盛んに研究が行われています。骨粗鬆症の治療において広く用いられている破骨細胞抑制剤に関しては、骨吸収の抑制に引き続いて骨形

成の低下も生じる事が知られていますが、これは破骨細胞数の減少に伴ってカップリング因子の供給も低下するためと考えられています。

RANKLは骨芽細胞や、骨芽細胞から分化して形成される骨細胞に強く発現する分子であり、ノックアウトマウスなどを用いた過去の解析から、破骨細胞の成熟を刺激して骨吸収を促進する中心的なシグナル入力分子であることが明らかにされてきました。また、生体内で破骨細胞に対してRANKLシグナルを入力している細胞は、従来は骨表面に局在している骨芽細胞であると想定されてきました。しかし近年になって、骨細胞特異的なRANKLノックアウトマウスを用いた解析などから、生理的にRANKLシグナルの主要な供給源となっているのは、骨基質中に分散してネットワークを形成している骨細胞であることが明らかにされました。このため逆に、骨芽細胞に発現するRANKLの生理的な役割に関しては不明瞭な状態となっていました。

【研究の内容】

そこで研究グループは、骨芽細胞に発現するRANKLは破骨細胞に発現するRANKからのシグナルを受け取る受容分子として機能している可能性を想定して検討を進めました。まず、破骨細胞からの分泌物を分析したところ、破骨細胞の成熟段階においてRANKの発現量が増大すると共に、RANKが含まれる膜小胞が盛んに分泌されることが確認されました。この膜小胞を用いて骨芽細胞に対して刺激を加えたところ、骨芽細胞分化および骨形成が促進されることが明らかになりました。RANKLノックアウトマウス由来の骨芽細胞ではこの効果が認められないことから、破骨細胞由来の膜小胞の作用は骨芽細胞に発現するRANKLを介して生じていることも確認されました。

次いで、破骨細胞由来の膜小胞で刺激した骨芽細胞内で活性化しているシグナル伝達経路を解析したところ、RANKLの下流ではPI3K-Akt-mTORC1経路の活性化が生じ、最終的に骨芽細胞の分化を中心的に制御する転写因子であるRunx2(注8)の活性化が生じていることが明らかになりました。この一連のシグナル経路(RANKL逆シグナル経路)の活性化には、RANKLの細胞内ドメインに存在するプロリン・リッチ・モチーフが必要である事も明らかとなりました。そこで、この部分にアミノ酸変異(29番目のプロリンをアラニンに変異)を導入したマウスを新たに作出しました。この変異マウスでは、通常は骨吸収の活性化に引き続いて生じる骨形成の上昇が生じなくなっており、骨吸収と骨形成のカップリングが破綻していることが明らかとなりました。すなわち、骨芽細胞に発現するRANKLを起点とするRANKL逆シグナル経路は、生理的には骨吸収と骨形成のカップリングを媒介していることが示唆されました(図1)。

さらに、RANKLの細胞外ドメインに結合してRANKL逆シグナルを活性化できる改変抗体を創製し、骨粗鬆症モデルマウスにおける薬理作用の評価も行いました。RANKLに対する中和活性のみを有する改変抗体では、破骨細胞の成熟阻害と骨吸収の抑制に伴って、骨芽細胞による骨形成も低下する様子が観察されましたが、RANKL逆シグナルを活性化できる改変抗体を投与した場合には、骨吸収を同程度に抑制する活性に加えて、骨形成の抑制を阻止する活性も認められ、骨芽細胞におけるRANKL逆シグナルは骨形成を促進する薬理標的として機能する事も見出されました(図2)。

【今後の予定】

骨粗鬆症に対して広汎に使用されている骨吸収抑制剤は、強力的に骨吸収を抑制する結果、カップリング因子の枯渇を引き起こし、骨形成も低下していく点が臨床上の課題となっています。本研究を通じて、骨芽細胞に対して作用し、RANKL逆シグナルを入力することで骨形成を上

昇させる活性に加えて、骨細胞上の RANKL に対しても作用して、破骨細胞成熟を抑制する活性を併せ持つ、バイファンクショナルな改変抗体の創製が可能であることが示されました。今後は、タンパク質としての産生量や安定性、生体内での半減期などをさらに改善した改変抗体の作出を目指して検討を進め、従来の薬剤の問題点を克服した、骨粗鬆症に対する新規治療薬の完成を目指します。また、骨吸収と骨形成を繋ぐカップリング機構に関しては、近年さまざまな分子の関与が報告されてきており、従来想定されていたよりも遥かに複雑で、時空間的に精密に制御された分子メカニズムが関与していることが明らかになりつつあります。破骨細胞由来の膜小胞に含まれる他の分子の役割なども含めて、カップリング機構の全体像の理解に向けた検討を推進していく予定です。

5. 発表雑誌：

雑誌名：Nature

論文タイトル：Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling

著者：Yuki Ikebuchi[†], Shigeki Aoki[†], Masashi Honma^{*†}, Madoka Hayashi, Yasutaka Sugamori, Masud Khan, Yoshiaki Kariya, Genki Kato, Yasuhiko Tabata, Josef M. Penninger, Nobuyuki Udagawa, Kazuhiro Aoki & Hiroshi Suzuki

[†] equal contribution, ^{*} corresponding author

DOI 番号：10.1038/s41586-018-0482-7

アブストラクト URL：http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0482-7

6. 問い合わせ先：

< 研究内容に関するお問い合わせ先 >

東京大学医学部附属病院 薬剤部

講師 本間 雅 (ほんま まさし)

電話 03-3815-5411 (内線 30757) E-mail: mhonma-tky@umin.ac.jp

< 広報担当者連絡先 >

東京大学医学部附属病院 パブリック・リレーションセンター (担当：渡部、小岩井)

電話：03-5800-9188 (直通) E-mail：pr@adm.h.u-tokyo.ac.jp

東京医科歯科大学 総務部総務秘書課広報係

電話：03-5803-5833 (直通) E-mail：kouhou.adm@tmd.ac.jp

7. 用語解説：

(注1) 骨細胞：骨組織の中でも最も数の多い細胞であり、骨芽細胞の一部が自身の分泌した骨基質の内部に侵入し、そこで最終分化することで形成されます。そのため、骨基質全体に分散して存在しており、骨細管(骨基質中に空いているトンネル状の通路)を通じて樹状突起を伸張し、近傍の細胞と細胞間ネットワークを形成しています。

(注2) RANKL：Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand の略称で、TNF スーパーファミリーに属する膜貫通タンパク質です。骨芽細胞・骨細胞などの骨芽細胞系譜の細胞に高発現しています。破骨細胞に発現する RANK に結合してシグナルを入力し、破骨細胞の

分化成熟を刺激するリガンド分子としての活性が最も良く知られています。RANKL ノックアウトマウスでは成熟破骨細胞が失われ、大理石骨病様の症状を示すことが知られており、生体内で破骨細胞成熟を制御する中心的な分子と考えられています。TNF スーパーファミリーに属する幾つかの分子は、シグナルを入力するリガンド分子としてだけでなく、逆にシグナルを受容する双方向のシグナル分子として機能することが報告されており、今回の研究ではこれらの報告を踏まえ、逆シグナルが存在する可能性を想定して検討が進められました。

(注3) 破骨細胞：血球系の細胞である破骨前駆細胞が、細胞表面に発現する RANK を介して RANKL 刺激を受容することで活性化し、複数の細胞が融合することで形成される多核の細胞です。酸およびタンパク質分解酵素を分泌することで骨基質を溶解して吸収する活性を有しています。成熟破骨細胞は、一定期間の骨吸収（老朽化した骨の破壊）を行なった後に、アポトーシスを生じて除去されると考えられており、その後吸収された部分が、骨芽細胞による新生骨の形成によって埋め戻されます。

(注4) RANK：Receptor activator of nuclear factor- κ B の略称で、TNF 受容体スーパーファミリーに属する膜貫通タンパク質。破骨細胞に発現しており、RANKL 刺激を受容する事で破骨細胞の成熟が誘導されます。膜貫通タンパク質であるため、そのままでは細胞外に分泌されることはありませんが、脂質二重膜構造を有する膜小胞に含まれる形で細胞外に分泌し得る事が知られています。

(注5) RANKL 中和抗体：RANKL の細胞外ドメインに結合し、RANK と RANKL の結合を阻害することで、成熟破骨細胞の形成を阻害する中和抗体が臨床応用されています。強力に成熟破骨細胞の形成を抑制できるため、閉経後骨粗鬆症など骨吸収が過剰となっている病態に対して有効性を示しますが、骨吸収の抑制に引き続いて骨形成の低下も引き起こされる点が、臨床上の課題となっています。この点を克服した新規薬剤の開発が期待されています。

(注6) 骨芽細胞：間葉系の細胞から分化する細胞であり、タイプ I コラーゲンを中心とする骨基質タンパク質、およびハイドロキシアパタイト結晶の成長を促す基質小胞などを分泌する事で、新生骨の形成を担う事が知られています。破骨細胞による骨吸収が行われて除去された骨組織を新生骨で埋めもどすサイクルを、骨リモデリングと呼んでいます。

(注7) 膜小胞：脂質二重膜からなる直径 100～200nm 程度の小胞で、多くの細胞はこのような膜小胞を細胞外へと分泌する性質があります。脂質二重膜中あるいは表面にさまざまな膜タンパク質が含まれます。また小胞の内部にも、さまざまなタンパク質や核酸などが含まれる事が知られています。直接的な細胞間接触の無い細胞の間で、情報伝達を媒介する可能性が指摘され、近年盛んに研究が行われています。

(注8) Runx2：Runt-related transcription factor 2 の略称で、骨芽細胞の分化を制御するマスター転写因子として知られています。Runx2 の活性化は、特に骨芽細胞の初期分化を促進すると考えられています。

8. 添付資料

図1：骨芽細胞に発現する RANKL は破骨細胞由来の膜小胞型 RANK を認識し、RANKL 逆シグナルを活性化することで、骨吸収と骨形成のカップリングを媒介する。

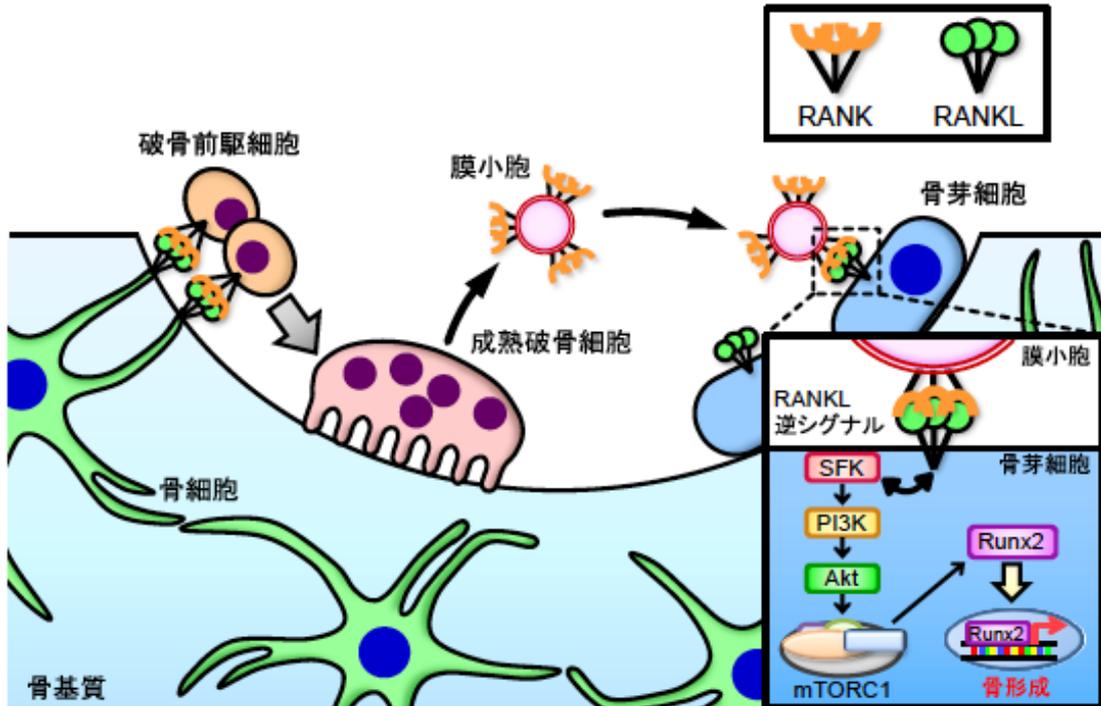


図2：RANKL 細胞外ドメインに結合して RANKL 逆シグナルを入力できる改変抗体は、骨吸収の抑制活性と骨形成の促進活性を併せ持つ。

