

論文の内容の要旨

論文題目 骨細胞による成熟破骨細胞形成制御機構の解析

氏 名 本間 雅

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その品質が保たれており、閉経後骨粗鬆症・リウマチ性関節炎などの骨破壊疾患では、破骨細胞の過剰な活性化を伴う骨吸収の亢進が生じ、骨量の減少が引き起こされる。成熟破骨細胞は、血球系細胞である破骨前駆細胞が receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) ligand (RANKL) の刺激を受容することで活性化・細胞融合することでオンデマンドに形成される。従来、生理的な成熟破骨細胞の形成制御において、骨芽細胞が供給する RANKL シグナルが中心的な役割を果たしていると想定されてきた。しかしながら近年になって、骨芽細胞が最終的に分化して形成される骨細胞選択的に RANKL 遺伝子をノックアウトしたマウスにおいて、成熟破骨細胞の形成が顕著に低下することが見出され、生理的な成熟破骨細胞形成制御において中心的な役割を果たしているのは骨細胞であることが示された。骨細胞は、骨芽細胞が自身の分泌した骨基質内へ浸潤して分化することで形成される細胞であり、骨基質内に包埋される形で存在する骨細胞が、どのようにして破骨前駆細胞へ RANKL シグナルを供給しているのかに関しては明らかとされていなかった。そこで本研究では、骨細胞による成熟破骨細胞形成の制御がどのようなメカニズムで行われているかを明らかにすることを目標とした。

まず、骨細胞と破骨前駆細胞の *in vitro* 共培養系の構築を行った。新生マウス頭蓋骨より初代骨細胞を調製し、骨細胞マーカーおよび骨芽細胞マーカーに対する二重染色を行って骨細胞の純度を検証した結果、約 7 割の細胞が骨細胞の特徴を有しており、骨芽細胞の混入は最小限であることが確認された。次いで、初代骨細胞を通常の平面培養を行った場合 (2D) と、骨基質の主要構成成分である I 型コラーゲンのゲル内に包埋して培養した場合 (3D) それぞれで経時的に total RNA を回収し、骨細胞マーカーおよび骨芽細胞マーカーの発現量変動を評価した。その結果、後

期骨細胞マーカーの発現量は 2D 培養で速やかに発現量が低下し、逆に初期骨細胞マーカーの発現量が経時的に増大することが確認された。また、骨芽細胞マーカーに関しても培養時間経過と共に増大する傾向が観察され、初代骨細胞は 2D 培養に伴ってより未分化な状態に脱分化していくことが確認された。また、RANKL の発現量は後期骨細胞マーカーと類似した経時変化を示す一方、RANKL に対するデコイ受容体として知られる osteoprotegerin (OPG) に関しては骨芽細胞マーカーと類似した推移を示すことも明らかとなった。これに対し 3D 培養条件下では、初期骨細胞マーカーおよび骨芽細胞マーカーの上昇が抑制される傾向が観察され、後期骨細胞マーカーについても発現量低下が遅延する傾向が観察された。各マーカーのタンパク質レベルでの発現量に関しても RNA レベルと同様の傾向が観察された。さらに、3D 培養条件下では、骨細胞に特徴的な樹状突起の形成も確認された。一連の検討結果に基づき、I 型コラーゲンを用いた 3D 培養系は骨細胞の機能を評価するのに適していると考えられたため、3D 培養の特徴を維持しつつ、破骨前駆細胞との共培養を可能とする系の構築を行った。骨細胞の細胞体部位と破骨前駆細胞の接触を回避しつつ樹状突起の進展を可能とするため、3D 培養した骨細胞と破骨前駆細胞の間にポアサイズ $3\mu\text{m}$ の多孔質フィルターを挟んで共培養を行った。共培養開始後経時的に、成熟破骨細胞形成の指標として用いられる tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 活性の変化を測定したところ、共培養開始 5 日目～9 日目にかけて顕著な TRAP 活性の増大が認められた。また、共培養系より total RNA を抽出し、成熟破骨細胞マーカーの発現量変化を評価したところ、いずれのマーカー分子の発現量も共培養開始 5 日目～9 日目にかけて有意に上昇していることが明らかとなった。さらに、抗 TRAP 抗体を用いてフィルター上面の蛍光免疫染色を行ったところ、TRAP 陽性の多核細胞が多数観察され、成熟破骨細胞が形成していることが確認された。一連の結果に基づき、多孔質フィルターを挟んだ共培養系を用い、骨細胞の破骨細胞分化支持能を評価可能であると考えた。

次いで、骨芽細胞から破骨前駆細胞への RANKL シグナルの伝達様式を明らかにするための検討を行った。RANKL は II 型膜貫通タンパク質であり、細胞外ドメインが切断されて可溶性の分子 (sRANKL) を生成すること、および sRANKL は成熟破骨細胞の形成を *in vitro* で刺激できることが明らかとなっている。このため、骨細胞が直接的な細胞間接触を介して RANKL シグナルを入力しているのか、sRANKL の生成を介して間接的にシグナル入力を行っているのかは明らかでない。そこでまず、共培養系においてメディアム中に放出されている sRANKL のレベルを定量した結果、骨細胞との共培養系におけるメディアム中 sRANKL 濃度は 0.1 ng/mL 程度であることが明らかとなった。一方、破骨前駆細胞の単独培養系のメディアム中に sRANKL 組み換えたんぱく質を添加して直接刺激を行った場合、 10 ng/mL まで添加濃度を上げた際にも、骨細胞との共培養系で観察される TRAP 活性と比較して有意に低い値が観察され、成熟破骨細胞の形成が低いことが明らかとなった。また、sRANKL の生成阻害剤を共培養系メディアム中に添加したところ、阻害剤濃度依存的に sRANKL の生成低下が観察された一方で、TRAP 活性に有意な影響は生じなかった。これらの結果は、

骨細胞による成熟破骨細胞形成制御において sRANKL の寄与が低いこと示唆しており、直接接触を介してシグナルを入力している可能性が想定された。共焦点顕微鏡を用いて共培養系における骨細胞および破骨前駆細胞の形態を観察したところ、骨細胞は多孔質フィルターのポアを介して樹状突起をフィルター逆側まで進展し、複数の破骨前駆細胞と接触している様子が観察された。そこで、多孔質フィルターを二重にする、あるいはフィルターのポアサイズをより小さいものに変更し、樹状突起の進展を妨げた場合の成熟破骨細胞形成に関して評価を行った結果、いずれの場合も TRAP 活性の顕著な低下が認められた。一連の結果から、骨細胞から破骨前駆細胞への RANKL シグナル供給は、直接接触を介して生じていることが示唆された。

さらに、OPG が骨細胞による成熟破骨細胞形成支持を負に制御する機構に関する検討を行った。細胞間接触を介したシグナル入力を考えた場合、骨細胞表面に提示されている RANKL 分子の量はシグナル入力強度を決定する主要因の 1 つと考えられる。過去の報告から、骨芽細胞において RANKL は主としてリソソームに局在しており、RANKL 分子はリソソーム酵素に耐性であること、また RANK 結合刺激に伴ってリソソームに蓄積されている RANKL の一部が刺激部位に放出されることが明らかにされている。そこで、N 末端に GFP を付加した RANKL (GFP-RANKL) を用い、骨細胞内における RANKL 分子の局在に関して検討を加えた。その結果、骨細胞においても骨芽細胞同様、GFP-RANKL は主としてリソソームに局在し、細胞表面への局在は制限されていることが明らかとなった。また、RANK 細胞外ドメインを表面に固相化したポリスチレンビーズ (RANK ビーズ) を調製し、共培養系と同様の実験系を用いて骨細胞への刺激を行った結果、GFP-RANKL のビーズへの結合が確認され、同時にリソソーム酵素がメディアウム中に放出されることも確認された。骨芽細胞と同様に骨細胞においてもリソソーム内に蓄積され RANKL の放出が生じていると考えられる。また、骨芽細胞においては、OPG は小胞体-ゴルジ体における新規タンパク質合成段階から RANKL と相互作用して複合体を形成し、RANKL-OPG 複合体としてリソソームへ輸送されることで、細胞表面への RANKL 提示量が負に制御されていることが明らかとなっている。そこで骨細胞においてもこの点を検証した。OPG^{-/-}マウスより単離した骨細胞においては、GFP-RANKL は主としてゴルジ体を集積し、リソソームへの蓄積は顕著に減少していた。また、OPG を共導入することで GFP-RANKL のリソソーム局在が回復することも確認された。この時、骨細胞表面に局在する RANKL 分子の量は増大しており、破骨前駆細胞との共培養系では TRAP 活性の上昇が顕著に増大することも確認された。これらの結果は、OPG による RANKL 局在制御機構が骨細胞においても機能していることを示唆している。さらにこの点を確認するため、デコイ受容体としての機能は維持されている一方、細胞内選別輸送制御機能は失っている OPG 変異体を用いた検討を行った。OPG 変異体を OPG^{-/-}骨細胞に導入した場合、GFP-RANKL のリソソーム局在回復は観察されず、RANKL の細胞表面提示量を抑制する効果も野生型 OPG と比較して大きく低下していた。この条件下で破骨前駆細胞との共培養を行った結果、OPG 変異体と野生型ではタンパク質レベルでの発現量に差が認められない一方で、

成熟破骨細胞形成に対する抑制効果は大幅に減弱していることが明らかとなった。これらの結果は、RANKL に対する細胞内局在制御機能が、OPG による RANKL シグナル調節機構の一部として機能していることを示唆していると考えられた。

以上本研究を通じて、骨細胞によって支持される成熟破骨細胞形成には、骨細胞の樹状突起と破骨前駆細胞の直接的な接触が必要であり、sRANKL の寄与は小さいことが明らかとなった。また骨細胞においても、RANKL はその生合成過程において OPG と複合体を形成してリソソームへと選別輸送されていると考えられ、OPG の RANKL 選別輸送制御機能は、デコイ受容体としての機能に加えて RANKL シグナル入力強度の調節機構として寄与していることが示唆された。