

## 骨と免疫の相互作用の解析とその病理学的意義の解明

東京大学大学院医学系研究科 骨免疫学寄付講座

岡本一男

### 【背景・目的】

骨の恒常性は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成とのバランスにより維持される。破骨細胞は単球/マクロファージ系前駆細胞由来の多核巨細胞であり、酸やタンパク質分解酵素を分泌して骨を吸収する。破骨細胞の分化には、骨芽細胞や骨細胞などの間葉系の支持細胞が産生するTNFファミリーサイトカイン・RANKLからシグナルを受け取ることが必要である(Okamoto et al, *Physiol Rev*, 2017)。RANKL及び受容体であるRANKの遺伝子欠損マウスは重篤な大理石骨病と歯の萌出不全を呈し、またヒトの常染色体劣性大理石骨病においてもRANKLとRANKの機能喪失型変異が見出されている。またRANKLは骨のみならず、胸腺やリンパ節、腸管M細胞の分化など免疫組織の形成にも必須のサイトカインである。実際、RANKL欠損マウスはリンパ節の形成不全や胸腺髄質細胞分化障害、腸管M細胞の分化障害もきたす。すなわち、RANKLは骨のみならず、胸腺やリンパ節、腸管M細胞の分化など免疫組織の形成にも必須のサイトカインであり、まさに骨と免疫の共有因子の代表格として知られている。

一方、逆に、病的要因によりRANKLが過剰に発現されると、破骨細胞の分化・生存が増進され、関節リウマチの骨破壊や閉経後骨粗鬆症、がん骨転移における骨病変など、様々な骨量減少疾患の誘因となる。近年RANKLに対するヒト型モノクローナル抗体製剤デノスマブが骨粗鬆症、多発性骨髄腫及び固形癌骨転移による骨病変、関節リウマチの骨破壊の治療に承認され、強い破骨細胞抑制効果を示している。こうした背景からも特に関節リウマチ研究では、血清中のRANKL濃度が骨吸収評価の対象にされつつある。RANKLは治療のみならず予防医療という点でも重要な生体制御因子として考えられる。

遠隔臓器へのがん転移はがん患者死亡の最大の要因であり、その制御はがん研究領域の克服すべき課題である。骨は代表的な転移標的臓器であり、激しい骨痛、病的骨折、筋力低下、脊髄圧迫による麻痺症状や高カルシウム血症などをもたらす。特に体幹部分の荷重骨への転移は、患者の生活に著しい障害を与える。骨はがん細胞に対して肥沃な環境を提供する一方、がん細胞は破骨細胞分化必須因子RANKLの発現を亢進させることで、骨基質中の増殖因子の放出を促す作用があり、こうしたがん骨との悪循環が骨転移病態に根付いている。RANKL抗体デノスマブはこの悪循環を断ち切ることで、がん骨転移における骨病変を抑える効果をもたらす。我々も最近、新規RANKL低分子阻害剤がマウスの骨転移モデルを抑えることを実証し、低分子薬によるRANKL阻害の有効性を提唱した(Nakai, Okamoto et al, *Bone Res*, 2019)。またRANKLは1回膜貫通型タンパク質として産生され、ホモ三量体として機能する。さらにFasなど他のTNFファミリーサイトカインと同様に、細胞外領域でプロテアーゼによる切断を受け、可溶性タンパク質としても産生される。このように膜タンパク質が細胞表面でプロテアーゼによる切断を受け、細胞外ドメインが可溶性として放出される現象をectodomain sheddingと呼ばれる。TNFファミリーの他、上皮成長因子(EGF)などの増殖因子で認められ、様々な生理活性を発揮させる上で重要な制御機構である。例えばTNFやEGFはectodomain sheddingにより産生された可溶性が主に生理活性を示すのに対し、FasLは膜型がアポトーシス誘導活性を示す。RANKLのectodomain sheddingを担うプロテアーゼとしては、MMP14やADAM10などが知られている。*in vitro*実験により、膜型RANKLも可溶性RANKLもRANKのagonistic ligandとして機能することが分かっているものの、これまでいくつかの*in vitro*培養実験から、膜型RANKLの方が破骨細胞分化を効率的に誘導できる、と考えられてきた。最近我々および米国の他研究者は、可溶性RANKLのみを選択的に欠損するマウスを作製し、生理的な骨代謝な閉経後骨粗鬆では可溶性RANKLはほとんど重要ではないことを実証した。しかしながら、がん骨転移における膜型RANKLおよび可溶性RANKLそれぞれの役割については明らかにされていなかった。そこで我々は、可溶性RANKL欠損マウスを用いた解析により、がん骨転移における可溶性RANKLの病理学的意義および、RANKLによるがん骨転移形成機構の解明に取り組んだ。

### 【研究結果および考察】

CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集技術を用いて、RANKL細胞外領域のプロテアーゼ認識箇所を欠損させることで、可溶性RANKLが産生されない遺伝子改変マウス(RANKL $\Delta$ S)を作製した。実際にRANKL $\Delta$ Sマウスの血清、骨髄液、並びに新生仔頭蓋冠由来細胞の培養上清では可溶性RANKLは検出されなかった。一方、新生仔頭蓋冠由来細胞の膜型RANKLは野生型マウス由来の細胞と同等に発現しており、RANKL $\Delta$ Sは可溶性RANKLのみを選択的に欠損したマウスであることが確認された。上述の通り、RANKL $\Delta$ Sマウスは正常な歯牙の萌出と成長を認め、6週齢のマウスでは海綿骨、皮質骨共に骨量増加を認めなかった。破骨

細胞数、骨芽細胞数、骨形成速度いずれも野生型マウスと有意な差は認めず、可溶性RANKLは骨格形成や骨リモデリングに寄与しないことが判明した。これまでの*in vitro*研究の報告通り、破骨細胞分化には膜型RANKLが主に機能すると考えられた。また、RANKL  $\Delta$ Sマウスではリンパ節形成、胸腺髄質上皮細胞分化および腸管M細胞分化も正常であり、可溶性RANKLは免疫組織形成にも必要ではないことが示された。さらに閉経後骨粗鬆症モデルである卵巣摘出モデルを実施し、可溶性RANKLの病理学的意義を検証した。野生型マウスでは卵巣摘出により血清中の可溶性RANKLが上昇する。それにも関わらず、RANKL  $\Delta$ Sマウスでも野生型マウス同等に卵巣摘出による骨量減少が認められた。したがって、エストロゲン低下による骨粗鬆症においても可溶性RANKLの関与は少ないと考えられた。

骨転移は肺癌、乳癌、前立腺癌、悪性黒色腫で頻度が高いことが知られている。そのうち肺癌、乳癌などは溶骨性骨転移を示す。すなわち、転移が成立すると、腫瘍細胞はPTHrPやIL-6等のサイトカインを介して、骨芽細胞上のRANKL発現を亢進させ、破骨細胞による骨吸収を促す。その結果、骨基質中に含まれる成長因子が溶出し、腫瘍細胞の増殖をさらに促進する。また、骨転移を起こす多くの乳癌、前立腺癌、腎細胞癌、悪性黒色腫はRANKを発現しており、RANKLは腫瘍細胞に直接作用することで腫瘍細胞の骨組織への走化性を高め、骨組織への転移嗜好性に関与していることが報告されている (Jones et al, Nature, 2006)。

マウスのがん転移モデルとして汎用されているマウス悪性黒色腫細胞株B16F10は破骨細胞誘導活性を示さず、骨破壊を伴わない骨梁間型骨転移を生じることが知られている。またB16F10細胞もRANKを発現しており、RANKLに対する走化性を生体内で評価できる細胞株である。そこでRANKL  $\Delta$ Sマウスに対して、B16F10細胞株の左心室移植による骨転移モデルを実施したところ、長管骨、脊椎に対する骨転移が野生型マウスと比べて有意に抑えられることがわかった。一方、破骨細胞活性化には両マウス間で差異が認められなかった。CRISPR/Cas9法を用いてRANK遺伝子欠損B16F10細胞株を樹立し、骨転移モデルを試したところ、野生型マウスにおける骨転移率は著明に減少し、またその骨転移率はRANKL  $\Delta$ Sマウスでも同等であった。したがって、可溶性RANKLは破骨細胞活性化に関わらず、腫瘍細胞自身のRANKに作用することで転移を促すことが判明した。B16F10細胞株は高頻度に副腎と卵巣にも転移するが、こうした骨以外の組織への転移には可溶性RANKLは関与しない。さらにB16F10細胞の皮下移植モデルの実験から、可溶性RANKLは直接腫瘍増殖にも寄与しないことがわかった。さらに、マウス乳がん細胞株E0771の骨転移モデルに関しても、RANKL  $\Delta$ Sマウスで著明に骨転移が抑えられた。E0771細胞は破骨細胞活性化を促し溶骨型転移を示すものの、骨転移巣の破骨細胞活性化に関してはRANKL  $\Delta$ Sマウスでは差が認められなかった。したがって溶骨性変化を伴うE0771細胞の骨転移においても、可溶性RANKLは破骨細胞の活性化に影響は与えず、骨特異的に転移を誘導することが示された。以上より、可溶性RANKLは腫瘍細胞に直接作用することで、ケモカインのように働き、細胞走化性を誘引して骨転移を導くことがわかった。以上より、可溶性RANKLは生理的状況下における骨代謝および免疫組織形成、閉経後骨粗鬆症には必要ではなく、主に膜結合型RANKLが重要であることが判明した。一方、可溶性RANKLは腫瘍細胞に直接作用することで、骨への走化性を促して骨転移を誘導することが判明し、がん骨転移における可溶性RANKLの特異機能が明らかとなった (Asano, Okamoto, et al, Nat Metab, 2019)。

可溶性RANKLは骨組織で高く産生されるため、血液と骨髄の間で可溶性RANKLの濃度勾配が生じることになる。その結果、RANK陽性がん細胞は、可溶性RANKL濃度に従い骨への遊走が進むと考えられる。骨組織ではRANKLは骨芽細胞や骨細胞、軟骨細胞にて産生され、特に成体では骨細胞がRANKLの主要な産生源として働くことが報告されている (Nakashima et al, Nat Med, 2022; Xiong et al, Nat Med, 2011)。一方、活性化T細胞もRANKLを産生し、我々は以前T細胞由来のRANKLが多発性硬化症におけるか細胞の中枢神経組織浸潤に必要であることを報告した (Guerrini, Okamoto et al, Immunity, 2015)。しかし骨髄液中の可溶性RANKLの供給源は全く不明である。そこで骨細胞 (Dmp1-Cre) およびT細胞 (CD4-Cre) で特異的にRANKLを欠損させたマウス、ならびにRag1欠損マウスにおける骨髄液中の可溶性RANKL量を測定したところ、いずれのマウスでも野生型マウスと同様の可溶性RANKL産生量が検出された。したがって、骨細胞およびリンパ球は骨髄液中可溶性RANKLの供給源ではないと考えられた。骨芽細胞特異的にRANKLを欠損させたマウス (Sp1-Cre) は重度な大理石骨病を呈するため、骨髄液が採取できず、こうした解析が実施不可能である。また最近、骨髄の脂肪前駆細胞も骨リモデリングに必要なRANKL産生細胞であると報告された (Yu et al, J Clin Invest, 2020)。今後成体マウスで一過性に骨芽細胞および脂肪前駆細胞を欠失できるマウスを作製・解析することで、骨髄液中可溶性RANKLの供給源としてのこれらの細胞の重要性を検証する予定である。可溶性RANKLが産生されるには、RANKLの細胞外領域がプロテアーゼMMP14やADAM10によって切断される必要である。そこで、既報のマウス骨髄細胞のシングルセルRNA-seq解析データ (GSE128423) を独自に再解析し、可溶性RANKL関連プロテアーゼの発現パターンを解析した。RANKLはこれまでの報告に一致する通り、骨芽細胞および脂肪前駆細胞で高い発現が認められた。一方、MMP14、ADAM10は線維芽細胞や血管内皮細胞で有為な発現が検出された。したがって、骨髄の可溶性RANKLはこうした様々な細胞種によって一体的に制御されていることが想定された。こうした可溶性RANKL関連プロテアーゼは、腫瘍の他、免疫細胞や線維芽細胞なども産生し、特に炎症反応によって強く発現誘導されることが知られている。実際、関節リウマチのほか、若年性突発性関節炎や強直性関節炎など、血清中可溶性RANKL濃度と病態重症度との相関性が報告されており、多様な炎症シグナルは病変部のRANKL濃度を増強する傾向にある。今後、原発巣での腫瘍進展に伴う炎症反応が骨組織に影響しRANKL発現増強をもたらす可能性についても、検証を進める予定である。

ヒトの臨床試験では、前立腺がん患者のランダム化比較試験において抗RANKL抗体denosumabの投

与により骨転移の発症が遅延したという報告がある。しかし昨年、乳がん患者のランダム化比較試験では有意に骨転移の予防効果が認められなかったという報告がなされた(Okamoto, J Bone Miner Metab, 2021)。RANKLと同様に、がん細胞に直接働いて細胞走化を促して骨転移に関わるケモカインとして、CXCL12やCX3CL1などが知られている。したがって、がんの種類、がんの進展状況、患者の個体差(遺伝背景や疾患歴、治療背景)によって、骨転移における可溶性RANKLへの依存度は異なることが多いと考えられ、可溶性RANKLへの依存度を定める要因についても今後明らかにしていきたいと考えている。

#### 【研究業績】

(原著論文)

1. Asano T, Okamoto K\*, Nakai Y, Tsutsumi M, Muro R, Suematsu A, Hashimoto K, Okamura T, Ehata S, Nitta T, Takayanagi H\*. (\*corresponding authors) Soluble RANKL is physiologically dispensable but accelerates tumour metastasis to bone. *Nature Metabolism*, 1:868- 875, 2019
2. Tsukasaki M, Huynh NC, Okamoto K, Muro R, Terashima A, Kurikawa Y, Komatsu N, Pluemsakunthai W, Nitta T, Abe T, Kiyonari H, Okamura T, Sakai M, Matsukawa T, Matsumoto M, Kobayashi Y, Penninger JM, Takayanagi H. Stepwise cell fate decision pathways during osteoclastogenesis at single-cell resolution. *Nature Metabolism*, 2: 1382-1390, 2020
3. Tsukasaki M, Asano T, Muro R, Huynh NC, Komatsu N, Okamoto K, Nakano K, Okamura T, Nitta T, Takayanagi H. OPG production matters where it happened. *Cell Reports*, 32: 108124, 2020
4. Kostik MM, Makhova MA, Maletin AS, Magomedova SM, Sorokina LS, Tsukasaki M, Okamoto K, Takayanagi H, Vasiliev DS, Kozlova DI, Mushkin AY. Cytokine profile in patients with chronic non-bacterial osteomyelitis, juvenile idiopathic arthritis, and insulin-dependent diabetes mellitus. *Cytokine*, 143: 155521, 2021

(英文総説)

1. Okamoto K, Role of RANKL in cancer development and metastasis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 39: 71-81, 2021

(日本語総説)

1. 岡本一男、高柳広 「骨免疫学の20年 ～骨と免疫の接点から骨免疫系の確立へ～」 感染 炎症 免疫 Vol. 50, No. 2, p22-32, 2020