

4. 外国人特別研究員との共同研究の概要（外国人特別研究員との分担状況を明らかにした上で簡潔に記述してください。）

Summary of the collaborative research (Clarify your role and the Fellow's role in the collaborative research.)

Masud Khan 先生との共同研究は、我々が 10 年以上前から取り組んでいる新たな骨形成促進薬創出のための新規薬物標的である RANKL (Receptor activator of NF- κ B ligand) 分子の役割を明らかにすることであった。Khan 博士の責任分担は、彼が得意とする動物を用いた骨評価解析であり、RANKL に結合する受容体分子 RANK (Receptor activator of NF- κ B) が RANKL のリガンドとして働く可能性を骨形成評価系のスタンダードモデルであるマウス頭蓋骨骨欠損モデルを用いて調べることが彼の主な責任分担であった。私の役割は、RANKL に結合する分子を徐放する薬物担体を選ぶことであり、また共同研究をしている東京大学医学部薬剤部の先生方との架け橋となり、Khan 博士の一連の仕事を指導監督する立場にあった。

2000 年頃から 7 年間は RANKL 分子に結合するペプチドが骨吸収抑制作用を明らかにしてきたが、その後、RANKL 結合ペプチドが骨吸収抑制作用だけでなく、骨形成促進作用も有することが明らかとなり、そのメカニズム解明を目指してきた。Khan 博士が東京大学医学部薬剤部との共同研究で明らかとなってきた成熟破骨細胞から分泌される直径 30~100 nm の RANK を含む小胞の骨形成促進作用を彼が得意とするマウスモデルを用いた骨評価系により明らかにすることになった。

さらに、Khan 博士は RANKL に結合するペプチドの作用機序を詳細に検討するプロジェクトにも貢献した。同じ RANKL 結合分子であっても、RANKL 結合ペプチドでは骨形成促進作用を示すが、同じ RANKL に結合するオステオプロテゲリン (osteoprotegerin ; OPG) では、骨形成を担当する骨芽細胞を刺激して骨形成促進作用を示すことができない。RANKL 結合ペプチドの骨形成促進作用を解明するためには、OPG との違いを明らかにする必要があった。Khan 博士はこのプロジェクトも担当することにより、自身の研究テーマである「骨形成を促進する受容体として働く RANKL の解析と治療への応用」に向けて努力を重ねた。

5. 外国人特別研究員との共同研究の成果とその評価

Results and Evaluation of the collaborative research

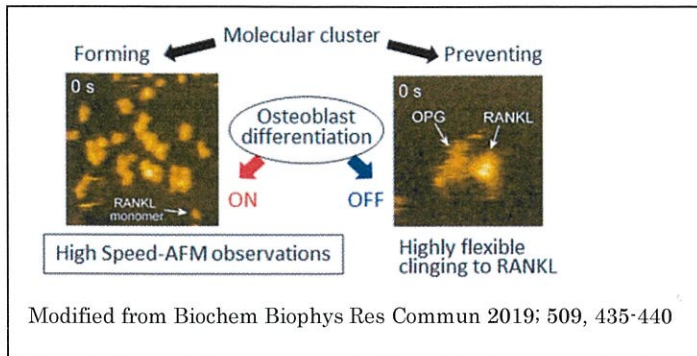
Khan 博士との共同研究で最大の成果は、外国人特別研究員採用から 2 年目 (2018 年) の 9 月に Nature 誌に掲載される業績を残したことである (Nature, 561, 195-200, Sep 13, 2019) 。我々がかねてから着目していた RANKL 依存的な骨形成促進作用がこの論文により明らかとなり、「骨形成を促進する受容体として働く RANKL の解析と治療への応用」という研究課題の「治療への応用」という課題以外は成し遂げられたことになった。

我々は、破骨細胞分化促進因子としての RANKL 分子に着目するのではなく、骨芽細胞の細胞膜上に発現する RANKL 分子が受容体として働くことにより、RANKL 結合ペプチドが骨形成促進作用を示すメカニズムを明らかにすることができた。Khan 博士は、頭蓋骨骨欠損モデルを用いて成熟破骨細胞由来の RANK 含有分泌小胞 (mOC-SEVs) が骨形成を促進するか否かを調べた。驚くことに mOC-SEVs は、骨形成タンパク質である BMP-2 に匹敵する骨形成促進作用を認めた。また、mOC-SEVs に可溶性 RANKL の前処置を施し、mOC-SEVs 上の RANK をあらかじめ塞いでしまうと、mOC-SEVs の骨形成促進作用は大きく減弱した。このことからこの実験では RANK は受容体ではなく、リガンドとして働くことにより骨形成を促進させることが示唆された。

今回の発見により RANKL が骨形成促進作用を誘導する標的分子であることが明らかとなったことから、「治療への応用」は新規骨形成促進因子の創薬につながるものと期待している。

さて、Khan 博士の次の功績は、RANKL 結合ペプチドによる骨形成促進作用には骨芽細胞上の膜 RANKL 分子のクラスター化の維持が必要であることを示したことである。

RANKL に結合する OPG は骨芽細胞分化を促進しない。しかし、同じ RANKL に結合するペプチドは骨芽細胞分化を促進し骨形成を促進する。高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) を用いた無細胞系の観察では RANKL 分子は RANKL 分子同士がクラスター化しやすい性質があることがわかり、RANKL 結合ペプチド



の存在下でも、RANKL 分子のクラスター化現象は観察された。しかし、OPG は RANKL のクラスター化を妨げる性質があることがわかったため、OPG でもクラスター化を誘導すれば、骨芽細胞分化を促進するか否かを検証した。

OPG も OPG-Fc も骨芽細胞分化を促進しないが、IgM を用いて骨芽細胞膜上の RANKL 分子の 5 量体化を促進すると初期分

化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) や Runx2、Col1a1 などの亢進が明らかとなった (下図参照)。このことから RANKL に結合するだけでは骨芽細胞分化は促進せず、細胞膜表面の RANKL 分子のクラスター化を妨げない分子が骨形成促進薬として有用である可能性が示唆された。

Khan 博士はこれら一連の実験に大きく貢献し、RANKL を標的とした新規薬物開発に大きな功績を建てたとと思われる。

