

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	網脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用

所属 昭和大学歯学部生化学教室
研究者 高橋 直之

分担研究者

宇田川信之	昭和大学歯学部生化学教室
岡橋 暢夫	国立感染症研究所口腔科学部
小関 健由	国立感染症研究所口腔科学部
宮本 政章	三共株式会社第一生物研究所
東尾 侃二	雪印乳業株式会社生物科学研究所

要旨：TGF β スーパーファミリーサイトカインがODF/RANKLの存在下で破骨細胞の分化を相乗的に促進する結果が得られた。LPSはIL-1と同様に、破骨細胞の延命と活性化を促進した。慢性関節リウマチによる炎症、骨破壊、骨粗鬆化に対するOCIF/OPGの効果を、アジュバント関節炎モデルラットを用いて検討した結果、アジュバント感作により惹起された関節炎に伴って生じた骨破壊をOCIF/OPGは改善する傾向を示した。

1. 研究目的

骨は生体の支持組織であるとともに、生体に必要なカルシウムやリンなどのミネラルを貯蔵・供給する重要な組織である。骨は形成された後も、その機能を遂行するために、一定のバランスを保ちながら破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を行っている。このバランスが破綻して骨吸収側に傾いた場合、骨量が減少し、骨粗鬆症等の骨疾患をきたすと考えられている。従って、破骨細胞による骨吸収を抑制することにより骨吸収側に傾いたバランスを正常化することがこれらの骨疾患の治療に対して有効であると想定できる。従来からこの方向で種々の試みが行われてきたが、現在まで十分な成功を収めたとは言いがたい。その原因の一つとして、破骨細胞の分化や活性化を制御する機構が明らかでなかったことが挙げられる。我々の研究グループは破骨細胞の分化や活性化を促進する分子として破骨細胞分化誘導因子(ODF/RANKL)およびODF/RANKLにデコイレセプターとして結合しODF/RANKLの働きを抑制する破骨細胞形成抑制因子(OCIF/OPG)の同定を報告した。

一方、歯周疾患は歯の表面に固着した歯周病原細菌によって引き起こされ、炎症性の歯周組織の破壊と骨吸収によって歯を喪失する。現在、高齢者社会を迎える我が国にとって、50歳代で4割以上が罹患する歯周炎とそれに伴う歯の喪失の予防は緊急の課題であると言える。炎症性の骨吸収は、骨吸収を担う破骨細胞が刺激によって多数誘導されてきたと考えられる。骨吸収を担う破骨細胞の分化と活性化には様々なステップがあり、その各ステップごとに多様なシグナルが必要なことが近年の研究で明らかにされつつある。このシグナルの制御を可能にすれば、活性化した破骨細胞の数を減少させることによる骨吸収性疾患の予防法の開

発に極めて重要な糸口となる。このシグナルの候補の一つとして、近年注目を浴びている TGF β スーパーファミリーのメンバーに着目し、ODF/RANKLとのシグナル伝達のクロストークを詳しく解析した。

また、グラム陰性細菌の細胞表層構成成分であるリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) は、歯周病の発症に密接に関与すると考えられている。ショウジョウバエのTollは微生物感染に抵抗性を発現するために必須な役割を担っている。最近哺乳類において、そのホモログであるToll-like receptor (TLR) ファミリーが発見された。TLRファミリーの機構解析より、TLR4はLPSのレセプターであることが証明された。実際に、LPSに対して不応性を呈するC3H/HeJマウスに、TLR4の変異が見いだされている。TLRの細胞内ドメイン構造はIL-1レセプターのそれと相同性を持ち、シグナル系はともにMyD88、IRAK(interleukin 1 receptor-associated kinase)、TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) を利用する。我々は先に、IL-1 (interleukin 1) は破骨細胞に直接作用して、その延命、融合 (多核化) 更に骨吸収能を促進することを見出した。そこで破骨細胞の機能を調節するLPSの直接効果について解析した。

慢性関節リウマチは、関節滑膜の増殖性病変と進行性の軟骨・骨破壊を呈する原因不明の疾患であり、現在でも骨破壊に対して有効な治療法がないことが問題になっている。前年度、我々はこの慢性関節リウマチを対象疾患として選び、遺伝子組換え型ヒト破骨細胞形成抑制因子(recombinant human osteoclastogenesis inhibitory factor: rhOCIF)の有効性を検討した。抗タイプIIコラーゲン抗体カクテルの投与により誘導される実験的慢性関節リウマチモデル動物を用いて、その炎症、骨破壊、骨粗鬆化に対する影響を検討したところ、rhOCIFが骨破壊および骨粗鬆化に一定の効果を示すことを確認した。しかしながら本モデルにおいては主要病変の発生率が低い上に組織学的変化が軽度である為、リウマチによる炎症、骨破壊に対するOCIF/OPGの抑制効果は必ずしも明かではなかった。そこで今回は慢性関節リウマチに対するOCIF/OPGの効果を詳細に検討する目的で、炎症像や骨破壊がより明瞭に現われるアジュバント関節炎モデルラットを用いて検討を行った。

2. 研究方法

(1) TGF β スーパーファミリーサイトカインとODF/RANKLとのシグナル伝達のクロストーク

ddY マウスの骨髄細胞を脛骨から採取し 10%FCS- α MEM 培地にて M-CSF 存在下で3日間培養し、洗浄後の付着性の細胞をマウス骨髄マクロファージ(M-BMM)とした。この M-BMM に、破骨細胞分化因子 (RANKL/ODF)を添加し4日間培養して破骨細胞に誘導した。また、破骨細胞への分化のモデル細胞株として、マウス・マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を使用し、ODF を添加した10%FCS- α MEM 培地にて5日間培養して破骨細胞を誘導した。培養細胞及び破骨細胞は、細胞分画の調整を行い各実験に供した。また、破骨細胞の計数は、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) の活性染色後、陽性の3個以上の核を持つ巨細胞を破骨細胞として計数した。

RAW264.7 細胞株をODF を添加した10%FCS- α MEM 培地にて5日間培養して破骨細胞を誘導した。形成された破骨細胞様の巨細胞は、破骨細胞と同様に硬組織吸収能があることが報告されている。また、この細胞株に Superfect を使用して、NF- κ B レポーター遺伝子を導入し、Luciferase assay system にて転写活性を測定した。読み出した値は、内部コントロールに使用した β -galactosidase 活性にて補正した。

サイトカインにて処理された細胞は、Lysis buffer にてタンパク質を抽出し、Western Blotting 法にて細胞内シグナル伝達タンパク質の細胞内レベルの動態を観察した。さらに、SAPK/JNK assay kit を用いて JNK 活性を観察した。細胞内酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼは、細胞を PBS に懸濁した後、凍結融解を3回繰り返して上清を得、タンパク質濃度測定後、酸性ホスファキII-テスト和光にて測定した。

(2) 破骨細胞の機能を調節するLPSの役割の解析

ddYマウス（正常マウス）、C3H/HeJマウスおよびTNFI型レセプターノックアウトマウスを用いた。骨芽細胞と骨髄細胞を活性型ビタミンDの存在下で6日間共存培養し、破骨細胞の形成を促した。共存培養をプロナーゼで処理し骨芽細胞を除き、ディッシュ上に破骨細胞を純化した。また、骨芽細胞様株細胞KS-4と骨髄細胞を活性型ビタミンDの存在下で共存培養した後、プロナーゼ処理により骨芽細胞をのぞいた。更に、echistatinで処理し、ディッシュより破骨細胞を遊離させた。これらの純化された破骨細胞画分を用いて、破骨細胞の延命と機能に及ぼすLPSの効果を解析した。また、NF- κ Bの活性化はゲルシフト assay法を用いて評価した。更に、CD14、TLR4のmRNAの発現をRT-PCRにて解析した。

（3）慢性関節リウマチモデル動物の作製と実験プロトコール

8~9週齢の雌性Lewisラット42匹を、体重と骨密度を指標にして6群に分けた。関節炎は *Mycobacterium butyricum* の加熱死菌をメノウ乳鉢で微細化後、乾熱滅菌した流動パラフィンに2 mg/mlの割合になるように懸濁し超音波処理したアジュバントを、尾根部の2箇所（尾根）の皮内に各0.05 ml/bodyで注射して惹起した。rhOCIFはアジュバント感作後9日目から15日目までの7日間、2, 10 mg/kg/dayの用量を腹腔内に、あるいは10 mg/kg/dayの用量を静脈内にいずれも1日2回に分けて投与した。実験期間中、全動物の後肢の腫脹体積を測定した。アジュバント感作15日目から24時間の採尿を行い、尿中デオキシピリジノリン(D-Pyr)排泄量を測定した。採尿後、麻酔下で腹大動脈より採血して失血死させた。両側の大腿骨、第4および5腰椎を摘出して骨密度測定に供した。右後肢足根関節は μ フォーカス X線で撮影し足根骨および中足骨の骨破壊の程度をスコア化した。左後肢足根関節は病理学的評価を行った。右脛骨骨幹端は骨形態計測に供した。摘出した大腿骨および腰椎は、軟部組織を除去した後、DXA装置DCS-600Rを用いて骨密度を測定した。測定データの解析は、低エネルギー側のX線(22keV)の吸収のみを利用した一重エネルギーX線吸収法に基づいて行った。

尿サンプルは4℃、2150Gで20分間遠心し、得られた上清中のD-Pyr濃度をHPLC法にて測定した。

μ フォーカス X線システムにより、管電圧25kV、管電流100 μ A、照射時間5秒の条件で、右後肢中足骨および足根骨の拡大透過画像を撮影し、骨破壊の程度をブラインドでスコア化した。左後肢足根関節は、PLP固定液で8時間固定後、EDTA・4Na溶液中で4℃で3週間脱灰し、AMeX法で包埋後HEおよびTRAP染色を施し、評価を行なった。摘出した脛骨は、軟部組織を除去した後、70%エタノールで固定し、Villanueva bone stainを行った後、メチルメタクリレート包埋非脱灰薄切標本を作製した。骨形態計測は骨形態計測解析ソフト（Osteoplan II）を用いて行った。

3. 研究成果

（1）TGF β スーパーファミリーサイトカインとODF/RANKLとのシグナル伝達のクロストーク

①骨髄由来マクロファージおよびマクロファージ細胞株は、それぞれ M-CSF 及び ODF または ODF 単独にて4日目から破骨細胞が形成された。この培養系にTGF β スーパーファミリーのメンバーであるTGF- β 1, activin A, BMP-2 を添加すると、TGF- β 1 及び activin A は、破骨細胞の形成を促進したが、BMP-2 は促進効果が観察されなかった。Activin Aは、他のいくつかの生理活性と同様に TGF- β 1の活性より100倍以上の濃度を必要とした。骨髄由来マクロファージおよびマクロファージ細胞株が同じ様にTGF β スーパーファミリーに対して反応が観察されたので、RAW264.7 細胞株を用いて、TGF β スーパーファミリーの破骨細胞形成時における役割の解析を行った。②RAW264.7 細胞株において、TGF β スーパーファミリーの破骨細胞誘導促進を確認する為に、破骨細胞の分化マーカーである、細胞内酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) の活性を測定したところ、TGF- β 1 及び activin A 単独で36時間作用させると、分化マーカーである TRAP 量が増加した。同様に ODF で破骨細胞に分化させた時も TRAP 量の上昇が観察された。

ODF と TGF- β 1 または activin A の両者の存在下で RAW264.7 細胞株を分化させると、TRAP 上昇量の増加が観察された。また、もう一つの破骨細胞の分化マーカーである c-*Src* は、TGF- β 1, activin A, BMP-2 の 3 者単独では上昇が見られなかったが、ODF の存在下では TGF- β 1 または activin A はより強い発現誘導が観察された。③ TGF- β 1 または activin A が破骨細胞の分化時のどの段階に作用するかを調べるために、両者を前培養、又は短期間の ODF との共培養を行って、破骨細胞の形成促進能を観察すると、前培養又は 1 時間の共培養でも破骨細胞の形成促進効果があった。これは、RAW264.7 細胞株に ODF を作用させる際の極めて初期の段階か前段階に TGF- β 1 及び activin A が作用している事を示す。また、分化した破骨細胞に両者を作用させても、破骨細胞の延命効果は観察されなかった。④ ODF によって活性化される主なシグナルと考えられている NF- κ B 及び JNK の活性を測定したところ、NF- κ B に関しては、TGF- β 1 または activin A は作用が観察されなかった。同様に JNK 活性にも影響を与えなかった。しかしながら、ODF 及び TGF- β 1 にて誘導される JunB の量は、両者の共培養で増加した。

(2) 破骨細胞の機能を調節する LPS の役割の解析

① 純化した破骨細胞はアポトーシスを起こし短時間内に死滅したが、LPS を添加すると破骨細胞の延命が認められた。② 骨芽細胞と破骨細胞はともに CD14 と TLR4 を強く発現していた。③ LPS は純化した破骨細胞の NF- κ B を活性化した。④ LPS は C3H/HeJ マウス由来の破骨細胞に対しては延命効果を示さなかった。一方、RANKL と IL-1 は C3H/HeJ マウス由来の破骨細胞に対しても延命効果を示した。⑤ マウス TNF α は、TNF 型レセプターノックアウトマウスに由来する破骨細胞の延命を促進しなかったが、LPS はその延命を促進した。⑥ Osteoprotegerin は RANKL が支持する破骨細胞の延命を完全に阻害したが、LPS が促進する破骨細胞の延命を全く抑制しなかった。⑦ IL-1 抗体は IL-1 が支持する破骨細胞の延命を完全に阻害した。一方、IL-1 抗体は、LPS が促進する破骨細胞の延命を一部抑制したが、完全には抑制しなかった。⑧ 純化した破骨細胞を象牙質切片上で培養しても吸収窩はほとんど形成されなかったが、IL-1 を添加すると、牙質切片上に多数の吸収窩が形成された。同様に、この系に LPS を添加しても吸収窩形成が認められた。

(3) 慢性関節リウマチモデル動物を用いた解析

① アジュバント感作した全ての群で 9 日目より後肢足根関節の腫脹が認められ、経時的に増悪した。rhOCIF 10 mg/kg/day 投与群において腫脹を抑制する傾向が認められた。② 大腿骨遠位端において正常群に比べアジュバント感作群では 10% の骨密度減少が認められた。一方、rhOCIF 10 mg/kg/day 投与により骨密度は正常群と同程度に維持された。腰椎においても大腿骨遠位端と同様に、rhOCIF 10 mg/kg/day の投与によりアジュバント感作による骨密度の低下が抑制された。③ アジュバント感作後 16 日目における尿中 D-Pyr 排泄量は、アジュバント感作により増加し、rhOCIF 投与により低下する傾向が認められた。④ アジュバント感作後 16 日目の足根関節における骨破壊スコアは、アジュバント感作により軽度ではあるが上昇した。rhOCIF 投与群では骨破壊を抑制する傾向が認められた。⑤ アジュバント感作 16 日目における足根関節の炎症性変化、パンス形成および骨組織の破壊・侵食は比較的軽度であり、また足根関節における病変の発症率は個体間のバラツキが大きかった。⑥ rhOCIF 投与群においてもこれらの所見については個体差が大きかったため、統計的な有意差は認められなかったが、10 mg/kg/day 投与群では上記の何れのパラメーターにおいても改善傾向が認められた。足根関節の TRAP 陽性細胞形成に関しては、アジュバント感作群で TRAP 陽性細胞がパンス中に認められ、また骨組織中では有意に増加していたが、rhOCIF 10 mg/kg/day 投与群ではパンス中では有意に減少、骨組織中でも減少する傾向が認められた。

4. 考察

TGF β スーパーファミリーのメンバーはその多彩な生理活性作用と、ファミリー内での相反する活性を示すことから、器官形成時の分化の制御や形作りの制御に重要な役割を果たしていると考えられている。骨の分野でも、TGF β スーパーファミリーのメンバーは、特に骨添加の方面にて注目を浴び続けてきた。BMP-2 と TGF- β 1 は、骨芽細胞の分化に作用していると報告され、硬組織の再建への臨床応用の期待が大いに高まっている。一方、このTGF β スーパーファミリーメンバーの破骨細胞への作用は、現在まであまり注目されなかった。しかしながら、TGF- β 1 及び activin のリコンビナント・可溶性レセプタを、マウス胎児の頭蓋の培養系に添加すると破骨細胞が形成しなくなることが報告されると、生理的濃度でのTGF β スーパーファミリーの破骨細胞への作用が注目されるに至った。我々の実験では、anti-TGF- β 抗体を骨髄由来マクロファージおよびマクロファージ細胞株に添加すると、破骨細胞の形成が抑制される事、その作用は抗体を除くと解除されることを確認している。骨のマトリックス内には、骨芽細胞由来のTGF- β が硬組織結晶と一緒に埋め込まれているとされ、破骨細胞はこの TGF- β 1 の活性によって分化が強く誘導されるのかもしれない。

本研究より、LPSはIL-1と同様に、破骨細胞の延命と活性化を促進した。最近、LPSのレセプターがTLR4であることが明らかにされた。更に、TLR4の細胞内ドメインとシグナルの解析より、TRAF6が結合することが示されている。従来より、IL-1レセプターを介するシグナルはTRAF6に伝達されることが知られており、IL-1とLPSはTRAF6のシグナル系を介して破骨細胞の延命と活性化を促進するものと考えられる。以上の知見は、炎症性骨吸収においてLPSはプロスタグランジンE2(PGE2)産生や他のサイトカインを介して破骨細胞の形成を促進するのみではなく、IL-1と同様に直接破骨細胞に作用しその活性化を誘導することを示するものである。歯周炎の発症にLPSが重要な役割を果たしていることが示唆された。

rhOCIFの慢性関節リウマチ治療薬としての開発の可能性を探る目的で、アジュバント感作により誘導される実験的関節炎モデルラットに、感作後9日目よりrhOCIFを1週間投与し、炎症、骨破壊、骨粗鬆化に対する影響を検討した。その結果、rhOCIFは実験的関節炎モデルラットの関節炎自体には著明な影響を与えなかったが、骨破壊、骨粗鬆化およびTRAP陽性細胞の形成に対しては、一定の予防効果を示した。rhOCIFはヒトタンパクであることから、長期間投与の評価を実験動物を用いて正確に行うことは難しい。そのためrhOCIFの投与期間を1週間に限定し、腫脹が生じる時期から投与を開始したが、アジュバント感作からの経過日数が短かったため、試験終了時での骨破壊は軽微であった。OCIF/OPGの骨破壊に対する作用をより明確に調べるためには、骨破壊が顕著に生じ始める感作後14日目以降にOCIF/OPGの投与を行う試験が必要であると考えられる。

5. 結論

TGF β スーパーファミリーのメンバーの ODF による破骨細胞の分化への作用を検索した。骨髄由来マクロファージおよびマクロファージRAW264.7 細胞株では、TGF- β 1 及び activin A は分化促進効果を示したがBMP-2 ではその効果が観察されなかった。TGF- β 1 及び activin A の分化促進の作用メカニズムを検索したところ、両者は単独で破骨細胞のマーカーである酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ量を上昇させた。しかしながらこの両者は、形成された破骨細胞の延命効果は無く、分化の極めて初期の段階に作用する事が示された。TGF- β 1 及び activin A は、ODF による NF- κ B 及び JNK の活性化に大きな影響を与えなかったが、JunB の誘導を促進している事が示され、上昇した JunB が核内でシグナルを修飾している可能性が示された。TGF- β 1 は骨芽細胞に作用して分化の促進を行って骨添加の促進作用を行い、また破骨細胞を誘導して骨吸収の促進を行う両刃の剣の生理活性を併せ持つので、骨吸収と添加の2相性の代謝の回転を早めている事が示唆され、骨組織の生物学的活性を健康な状態に高めて維持するための創薬の重要な鍵となるで

あろう事が示された。

歯周炎の骨破壊にはPGE類、IL-1とともにLPSが関与すると考えられてきたが、その作用機序は不明であった。我々は先にIL-1は破骨細胞に直接作用し破骨細胞の延命、融合更に骨吸収機能を誘導することを報告した。本研究では、破骨細胞はTLR4を発現しており、LPSは破骨細胞に直接作用して、その延命と活性化を誘導した。細菌感染による炎症性の骨吸収において、LPSは極めて重要な役割を有するものと考えられる。

OCIF/OPGの慢性関節リウマチ治療薬としての開発の可能性を探る目的で、アジュバント感作により誘導される実験的関節炎モデルラットにrhOCIFを投与し、本剤が骨破壊および骨粗鬆化に対して予防効果を有する事を確認した。

6. 研究発表

1. Takahashi, N., Udagawa, N., Suda, T. : A new member of tumor necrosis factor ligand ODF/RANKL/TRANCE/OPGL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256 : 449-455 (1999).
2. Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M.T., Martin, T.J., Suda, T. : IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* 103 : 1345-1352 (1999).
3. Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T., Martin, T.J. : Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the TNF receptor and ligand families. *Endocr. Reviews* 20 : 345-357 (1999).
4. Daci, E., Udagawa, N., Martin, T.J., Bouillon, R., Carmeliet, G. : The role of the plasminogen system in bone resorption in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 14 : 946-952 (1999).
5. Jimi, E., Akiyama, S., Tsurukai, T., Okahashi, N., Kobayashi, K., Udagawa, N., Nishihara, T., Takahashi, N., Suda T. : Osteoclast differentiation factor (ODF) acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J. Immunol.* 163 : 434-442 (1999).
6. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Goto, M., Mochizuki, S-I., Tsuda, E., Morinaga, T., Udagawa, N., Takahashi, N., Suda, T., Higashio, K. : A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone* 25 : 109-113 (1999).
7. Udagawa, N., Takahashi, N., Jimi, E., Matsuzaki, K., Tsurukai, T., Itoh, K., Nakagawa, N., Yasuda, H., Goto, M., Tsuda, E., Higashio, K., Gillespie, M.T., Martin, T.J., Suda, T. : Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of ODF/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor. *Bone* 25 : 517-523 (1999).
8. Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., Nakagawa, N., Kinoshita, M.,

- Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Morinaga, T., Higashio, Martin, T.J., Suda, T. : Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J. Exp. Med.* 191 : 275-285 (2000).
9. Tsurukai, T., Udagawa, N., Matsuzaki, K., Takahashi, N., Suda, T. : Roles of macrophage colony-stimulating factor and osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *J. Bone Miner. Metab.* 18 : 177-184 (2000).
10. Itoh, K., Udagawa, N., Matsuzaki, K., Takami, M., Amano, H., Shinki, T., Ueno, Y., Takahashi, N., Suda, T. : Importance of membrane- or matrix-associated forms of M-CSF and RANKL/ODF in osteoclastogenesis supported by SaOS-4/3 cells expressing recombinant PTH/PTHrP receptors. *J. Bone Miner. Res.* 15 : 1766-1775 (2000).
11. Udagawa, N., Takahashi, N., Yasuda, H., Mizuno, A., Itoh, K., Ueno, Y., Shinki, T., Gillespie, M.T., Martin, T.J., Higashio, K., Suda, T. : Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 141 : 3478-3484 (2000).
12. Takami, M., Takahashi, N., Udagawa, N., Miyaura, C., Suda, K., Woo, J.-T., Martin, T.J., Nagai, K., Suda, T. : Intracellular calcium and protein kinase C mediate expression of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in osteoclasts. *Endocrinology* 141 : 4711-4719 (2000)
13. Kotake, S., Udagawa, N., Ishiyama, S., Hakoda, M., Mogi, M., Yano, K., Tsuda, E., Takahashi, K., Furuya, T., Kim, K.-J., Saito, S., Nishikawa, T., Takahashi, N., Togari, A., Tomatsu, T., Suda, T., Kamatani, N. : Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes : possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis & Rheumatism* (in press) (2001).
14. Yamato K., Hashimoto S., Okahashi N., Ishisaki A., Nonaka K., Koseki T., Kizaki M., Ikeda Y., and Nishihara N. Dissociation of bone morphogenetic protein-mediated growth arrest and apoptosis of mouse B cells by HPV-16 E6/7. *Exp. Cell Res.* 257, 198-205 (2000)
15. Inohara N., Koseki T., Lin J., del-Peso L., Lucas P.C., Chen F., Ogura Y., and Nunez G. : An induced proximity model for NF- κ B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 275, 27823-27831 (2000)
16. Kawamura C., Kizaki M., Yamato K., Uchida H., Fukuchi Y., Hattori Y., Koseki T., Nishihara T., and Ikeda T. Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3. *Blood* 96, 2005-2011 (2000)
17. Okahashi N., Murase Y., Koseki T., Sato T., Yamato K., and Nishihara T. Osteoclast differentiation is associated with transient upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 and p27KIP1. *J. Cell. Biochem.* 80, 339-345 (2001)

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社