

Table II. TCRAV and TCRBV segments with a high level of expression.*

Patient	Source	TCRAV	TCRBV
1	PBMC	2-2, 7-2, 31-1	-
	Tumor no. 1	2-1, 17-1	8-2, 13-3, 14-1
	Tumor no. 2	2-1	13-3, 14-1
2	PBMC	2-1, 24-1, 25-1	4-1, 16-1
	Tumor no. 1	-	8-1
	Tumor no. 2	25-1	-
3	PBMC	21-1	-
	Tumor no. 1	15-1, 28-1, 30-1	5-4, 14-1, 17-1, 23-1
	Tumor no. 2	7-2, 22-1, 23-1	1-1, 13-3, 22-1, 24-1
4	Tumor no. 2	23-1	2-1, 13-3
	PBMC	1-4, 10-1, 12-1, 13-1	6-4, 10-1
	Normal tissue	12-1	8-1
	Tumor no. 1	12-1	-
	Tumor no. 2	12-1, 21-1	7-1, 13-3
5	Tumor no. 3	-	-
	PBMC	2-1, 6-1, 23-1	13-4
	Tumor no. 1	13-1, 23-1	6-5
	Tumor no. 2	23-1	6-5
6	Tumor no. 3	13-1, 23-1	6-5
	PBMC	17-1, 22-1, 30-1	24-1
7	Tumor no. 1	21-1, 29-1	8-1
	PBMC	2-3, 24-1	8-2
8	Normal tissue	21-1	6-5, 8-1, 12-1
	PBMC	-	15-1
9	Tumor no. 1	20-1	8-1, 13-3
	PBMC	23-1	9-1
10	Tumor no. 1	24-1	2-1, 13-1
	PBMC	-	5-1
11	Tumor no. 1	4-2, 7-2	7-1, 13-2
	Tumor no. 2	17-1, 21-1, 30-1	6-5, 13-2
	PBMC	21-1	5-1
11	Tumor no. 1	3-1, 4-2, 20-1, 21-1	-
	Tumor no. 2	3-1, 4-2, 23-1	13-3
	Tumor no. 3	3-1, 16-1, 20-1, 21-1	6-5

*Significant increase in frequency was defined as follows: the percentage was greater than the mean percentage + 3 standard deviations of PBLs from 20 healthy controls, and the absolute percentage was >5%.

Statistical analysis. Data were statistically analyzed by the Wilcoxon rank-sum test.

Results

TCRAV and TCRBV repertoires in tumor lesions and PBMCs. TCRAV and TCRBV repertoires were analyzed by microplate hybridization assay. The expression levels of mRNA were quantitatively analyzed with 43 oligonucleotide probes

specific for α -chain variable segments and 37 probes specific for β -chain variable segments. Almost all TCRAV and TCRBV segments defined in WHO nomenclature as functional segments can be detected with these probes.

TCR repertoires were analyzed for 11 tumors (total 21 samples), 2 normal tissues, and 11 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 11 patients (Table I). The representative results of TCR repertoire analysis are shown in Fig. 1. We defined the increase as significant, when: i) the

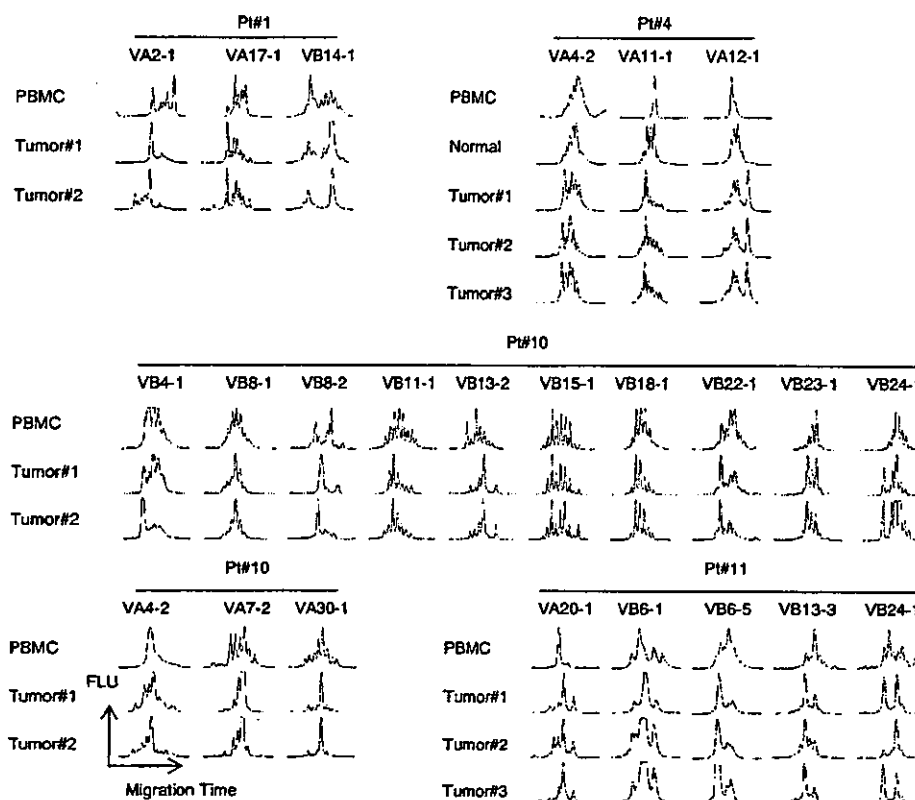


Figure 2. Similarities of CDR3 size spectratyping patterns among multiple samples from different sites of the same tumor. CDR3 spectratyping was performed with PBMCs and tumor tissues obtained from a large number of tumor patients. Representative peak patterns, which had identical peaks in size among multiple tumor samples from the same patient, are shown. X-axis, migration time; Y-axis, fluorescent intensity. Each peak was distributed along the X-axis according to their migration time.

percentage was greater than the mean percentage + 3 standard deviations of PBMCs from 20 healthy controls, and ii) the absolute percentage was >5%. The expression level was defined as uncharged unless the numbers fulfilled these two criteria. There were significant increases in the usage of TCRAV and TCRBV repertoires in tumor lesions, normal tissues, and PBMCs.

In PBMCs, the mean number of variable segments, of which the frequency was significantly increased above the control levels, was 2.1 ± 1.4 (mean \pm SD) per patient for TCRAV and 1.4 ± 1.0 per patient for TCRBV. On the other hand, the mean number was 1.8 ± 1.1 per patient for TCRAV and 1.3 ± 1.1 per patient for TCRBV in tumor lesions. There is no difference in the mean numbers of variable segments between tumor lesions and PBMCs. The results are summarized in Table II. Restricted usage of TCRAV and TCRBV repertoires was not observed in PBMCs from tumor patients. In contrast, significant increases above the control were frequently detected in limited AV and BV segments such as VA21-1 [5 per 11 patients (45%)] and VB13-3 [5/11 (45%)] in tumor lesions.

In AV25-1 of patient 2, VA12-1 of patient 4, VA23-1 of patient 5 and VA21-1 of patient 11, significant increases in the frequency were detected in both PBMC and tumor lesions. In contrast, significant increases were observed within PBMC alone in most variable segments other than these segments. The result indicates a difference in the TCRAV and TCRBV repertoires between PBMCs and tumor

lesions in individual patients. Significant increases in the frequency were observed in common variable segments among two or more samples from different sites of the same tumor. For example, VA2-1, VB13-3 and VB14-1 of patient 1, VA23-1 and VB13-3 of patient 3, VA13-1 and VB6-5 of patient 5, VB13-2 of patient 10, VA3-1, VA4-2 and VA20-1 of patient 11. VA3-1 of patient 11 and VB6-5 of patient 5 were significantly higher in three tumor samples, but not in PBMC. The results show that similar TCRAV and TCRBV repertoires were used for T-cell populations among samples from different sites of the same tumor.

T-cell clonality in tumor. We tried to demonstrate whether oligoclonal or monoclonal T lymphocytes exist in local tumor lesions. First, we examined T-cell clonality with CDR3 size spectratyping in a large number of BV segments, in which the frequency was significantly higher above the controls. The normal pattern displays multiple peaks with a Gaussian pattern with 3-nucleotide intervals. When a clonal T-cell expands in a variety of T-cell populations, a single higher peak appears within multiple low peaks. The clonal peak, which means clonal expansion of T-cells, was detected in a variety of BV segments with PBMCs and tumor lesions. Similar patterns of CDR3 size spectratyping were found among two or more samples from different sites of the same tumor. Interestingly, identical peaks of the same length were detected among multiple samples from the same tumor (Fig. 2). The results showed that a limited number of T-cells infiltrate

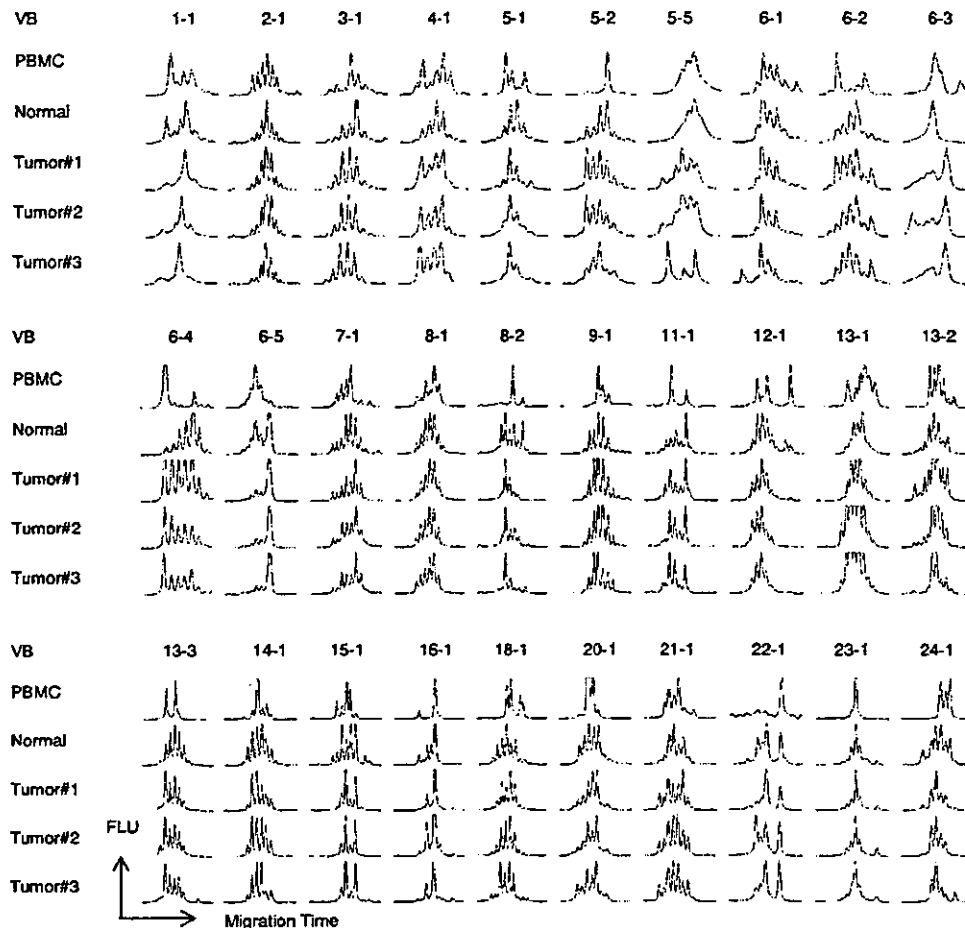


Figure 3. CDR3 size spectratyping profiles of PBMC, tumor lesion, and normal tissue. CDR3 spectratyping was performed with a peripheral blood mononuclear cell (PBMC), a normal tissue (normal), and three tumor lesions (tumor) obtained from patient 4. Similar spectratyping patterns were observed among three tumor lesions in a majority of the V β segments analyzed. In contrast, the spectratyping patterns for tumor lesions were different from that for PBMC and normal tissue.

into tumor tissues. We also performed the spectratyping with normal tissue around a tumor in which few lymphocyte infiltrations were found (Fig. 3). The result showed that the spectratyping patterns obtained with normal tissue were different from that with tumor lesions from the same patient. This indicated that the appearance of clonal or oligoclonal T-cells was not due to non-specific activation or contamination of peripheral lymphocytes. Next, to examine whether clonal peaks with similar size are due to clonal expansion of identical T-cells, we determined nucleotide sequences of CDR3 region of cDNA clones obtained from multiple tumor lesions and PBMC from the same patient (Table III). The result showed that cDNA clones with identical nucleotide sequence were obtained from two tumor lesions, but not from PBMC. Furthermore, these cDNA clones existed frequently in tumor lesions, which was consistent with the result from CDR3 size spectratyping. There was no common motif or conserved amino acid sequences of CDR3 regions among these cDNA clones.

Cytokine expression in local tumor lesions and PBMCs. We examined the expression levels of mRNA of interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interferon- γ

(IFN- γ), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in PBMCs (n=11) and tumor lesions (n=21) by real-time quantitative polymerase chain reaction (Fig. 4). There was no difference of the expression levels of IL-5 and IFN- γ between tumor lesions and PBMCs. In contrast, the expression levels of IL-2, IL-4, and TNF- α were lower in tumor lesions than in PBMCs ($p < 0.005$). Especially the expression level of IL-4 was considerably lower in tumor lesions compared with PBMCs.

The tumor specimens are thought to contain a large amount of non-lymphocyte cells derived from cancers. Therefore, a difference of the number of cytokine-producing cells such as T-cells and monocytes may have existed between tumor lesions and PBMCs. We thus compared the balance of T helper 1 (Th1) or T cytotoxic 1 (Tc1) to T helper 2 (Th2) or T cytotoxic 2 (Tc2), which was shown by the ratio of the levels of TNF- γ to that of IL-4, between tumor lesions and PBMCs. The ratio of IFN- γ to IL-4 was significantly higher for tumor lesions than PBMCs ($p < 0.05$) (Fig. 5).

Discussion

Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) respond against tumor antigens at local sites (20). To elucidate the characteristics

Table III. Alignment of amino acid sequences of CDR3 regions from cDNA clones.

Source	Frequency	AV/BV Segment	AV/BV sequence	N/N-D-N	AJ/BJ sequence	AJ/BJ Segment
PBMC	1/3	BV13S2	YFCASSY	GTPFGDTPFG	DTQYFGPGTRLTVL	BJ2S3
	1/3	BV13S2	YFCASSY	KH	EQFFGPGTRLTVL	BJ2S1
	1/3	BV13S2	YFCASSY	SPGQGA	GYTFGSGTRLTVV	BJ1S1
Tumor no. 1	3/5	BV13S2	YFCASSY	TTSG	SYEQYFGPGTRLTVT	BJ2S7
	1/5	BV13S2	YFCASS	SVSGQLQ	AFFGQGTRLTVV	BJ1S1
	1/5	BV13S2	YFCASSY	PFGTFP	NTGELFFGEGSRLTVL	BJ2S2
Tumor no. 2	2/4	BV13S2	YFCASSY	TTSG	SYEQYFGPGTRLTVT	BJ2S7
	1/4	BV13S2	YFCAS	TDTGTTYR	AFFGQGTRLTVV	BJ1S1
	1/4	BV13S2	YFCASSY	QSLGQGAF	TEAFFGQGTRLTVV	BJ1S1
PBMC	1/5	AV7S2	YLCAV	ITDS	WGKLQFGAGTQVVVTP	AJ24
	1/5	AV7S2	YLCAV	THR	NYGQNFVFGPGTRLSVLP	AJ26
	1/5	AV7S2	YLCAV	QPFY	GGYQKVTFGTGTLQVIP	AJ13
	1/5	AV7S2	YLCA	ATLLG	AGNNRKLWGLGTS LAVNP	AJ38
	1/5	AV7S2	YLCAVR	PI	SDGQKLLFARGTMLKVDL	AJ16
Tumor no. 1	4/5	AV7S2	YLCAVR	DMA	NAGKSTFGDGTTLTVKP	AJ27
	1/5	AV7S2	YLCAV	V	DSNYQLIWGAGTKLIKP	AJ33
Tumor no. 2	3/4	AV7S2	YLCAVR	DMA	NAGKSTFGDGTTLTVKP	AJ27
	1/4	AV7S2	YLCAV	THR	NYGQNFVFGPGTRLSVLP	AJ26

All samples were obtained from patient no. 10. TCRAV and BV gene segments were described according to the nomenclature reported by Arden *et al* (26) and Wei *et al* (27). TCRAJ and BJ gene segments were also described according to the nomenclature reported by Koop *et al* (28) and Toyonaga *et al* (29).

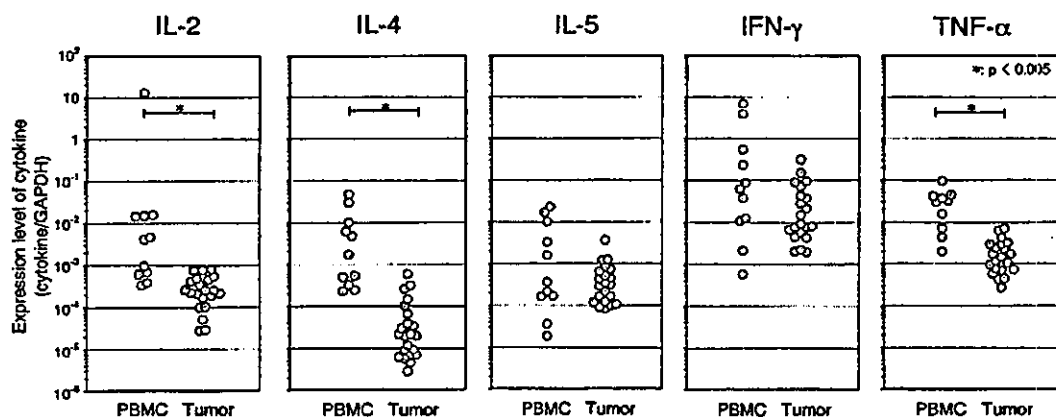


Figure 4. Comparison of the expression levels of several cytokines between tumor lesions (n=21) and PBMCs (n=11). The expression levels of mRNA of interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interferon- γ (IFN- γ), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured by real-time quantitative polymerase chain reaction as described in Materials and methods. Each open dot indicates a single sample. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was used for the internal control. The levels of mRNA expressed by the ratio of the amount of the respective cytokine-specific cDNA to the amount of GAPDH-specific cDNA were compared between PBMC and tumor lesions. The expression levels of IL-2, IL-4, and TNF- α were lower in tumor lesions than in PBMCs ($p < 0.005$).

of TILs in local microenvironments, we analyzed T-cell receptor (TCR) repertoires at the levels of mRNA with tissue samples and PBMCs. It is possible that *in vitro* culture in the presence of IL-2 causes skewing of TCR variable region

repertoires (21). We therefore directly analyzed tissue samples freshly removed from tumor specimens of surgical patients. This enabled us to accurately analyze the TCR repertoire with a small amount of tissues containing a limited number

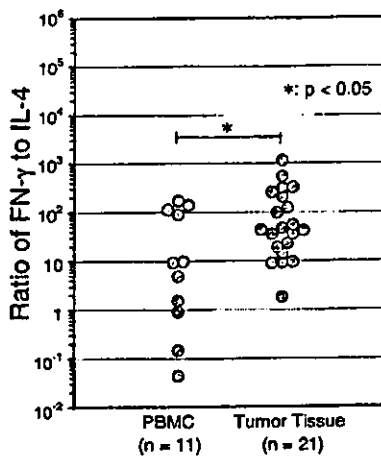


Figure 5. Predominant production of T helper 1/T cytotoxic 1 type cytokine in tumor lesions. Ratio of the expression levels of IFN- γ to that of IL-4 were compared between tumor lesions (n=21) and PBMCs (n=11). Each open dot indicates a single sample. The ratio was significantly higher in tumor lesions than in PBMCs ($p < 0.05$).

of TILs. Clonal expansion of T-cells in renal cell carcinoma has been already reported (8). In the report, many sets of variable region-specific primer were used for analysis of TCR repertoire. However, different amplification efficiencies among individual primers or cross-reactivity between sub-families hampered the accurate estimation of the frequency of individual families. An adaptor ligation-mediated PCR used in this study is more efficient and less skewing through PCR cycles than other PCR-based methods.

The frequencies of one or more variable segments were significantly increased in most of the tissue samples analyzed. There was, however, no difference of the mean number of variable segments, of which the frequency increased significantly, between tumor lesions and PBMCs. This indicates that the extent of skewing of TCR repertoires was not different between tumor lesions and PBMCs. This does not necessarily mean that the immunological alterations did not occur in local sites around the tumor. We observed that several variable segments were frequently used in tumor lesions, but not in PBMCs. This finding suggested that TILs have a limited TCR repertoire and may recognize a common tumor-specific antigen. The possibility exist that non-specific inflammation of T-cells at local sites or the homing of T-cells with a limited TCR repertoire to an inflamed site may induce the skewing of TCR repertoires. However, we observed a similarity of TCR repertoire among multiple samples from different sites of the same tumor. Such similarity was not detected between tumor lesions and normal tissues or between tumor lesions and PBMCs. This suggests that a limited number of antigen-specific TILs infiltrate into multiple local sites around a tumor. It is known that the TCR repertoire becomes skewed with aging as a result of clonal expansion (22,23). Because the tumor patients used in this study were mostly elderly, skewed TCR repertoires could be expected even in PBMCs.

We analyzed T-cell clonality with CDR3 size spectratyping. The clonality analysis coupled with quantitative analysis of

the TCR repertoire could provide important information about TILs. When tissue samples containing a small number of T-cells are used for the clonality analysis, the clonality might be increased through PCR cycles. However, the increase of clonality accompanied by an elevated frequency of expression offers firm evidence for a large population of oligoclonal or clonal T-cells existing within local tumor lesions. We found the increase of T-cell clonality in a majority of TCR variable segments, with higher frequencies than the controls. We also detected similar peak patterns of CDR3 spectratyping among multiple samples from different sites of the same tumor. The cDNA clones with identical nucleotide sequence of CDR3 region were obtained from two tumor samples of the same patient. These results suggest that a limited number of TILs proliferate within local sites in response to tumor antigen. The elevated level of clonality was also found in PBMCs of tumor patients. However, we were able to find a difference of spectratyping peak patterns between tumor lesions and PBMCs. Sequence analysis indicated that clonal T-cells existing frequently in tumor lesions were not observed in PBMC. This excludes the possibilities of non-specific expansion of T-cells or the homing of T-cells from peripheral blood lymphocytes to inflammatory sites. Instead, this suggests that a limited number of TILs locally expanded in response to tumor antigens.

T-cells are functionally characterized by the pattern of cytokine productions, i.e., T helper 1 (Th1)/T cytotoxic 1 (Tc1) and T helper 2 (Th2)/T cytotoxic 2 (Tc2). In addition, local production of cytokines probably impacts on the function of T-cells infiltrating into tumor tissues. Thus, we quantitatively measured the amounts of cytokine mRNA in tumor lesions and PBMCs. Similar levels of IL-5 and IFN- γ were observed between PBMCs and tumor lesions, whereas low levels of expression of IL-2, IL-4 and TNF- α were found in tumor lesions. It has been reported that IL-2, IFN- γ and TNF- β were not expressed at higher levels in the TIL of lung carcinoma patients (24). Our results did not indicate high level expression of IFN- γ or TNF- α , which is thought to be Th1-type cytokine, in tumor lesions. Instead, the data showed an apparent decrease in IL-4 production in tumor lesions. Although freshly isolated tissue specimen was suitable for direct estimation of the cytokine profile in a local microenvironment, the tissues contained a large amount of non-lymphocyte cells derived from the tumor. Thus, it may be difficult to directly compare the expression levels of cytokine mRNA between tumor lesions and PBMCs. The balance of Th1/Tc1-type cytokine to Th2/Tc2-type cytokine is meaningful for understanding the immunological status at local sites. The ratio of IFN- γ to IL-4 was significantly increased in tumor lesions compared with PBMCs. This suggests that Th1/Tc1-type cells may selectively infiltrate into the local tissues. However, another possibility that IL-4-producing Th2 cells accumulated in PBMC of tumor patients can be proposed. To clarify these possibilities, the levels of IFN- γ and IL-4 mRNA might need to be measured in PBMC from age-matched healthy donors. It has been reported that TILs were characterized by a type 1 (Th1/Tc1-like) pattern of cytokine expression in human colorectal carcinoma (25). No or only very small amounts of IL-4 transcripts have been detected in TIL. Our results are

consistent with this report. Th1 and Tc1 promote cellular immunity through the production of type 1 cytokines, such as IL-2 and IFN- γ . Alteration of the cytokine pattern may promote TILs to strengthen the anti-tumor response although TILs cannot control tumor growth.

In conclusion, similar usage of the TCR variable region repertoire and a similar peak pattern of CDR3 spectratyping were frequently observed among different tissue samples from the same patients with gastric and colorectal cancers. These results suggest that TILs proliferate locally in response to tumor antigens. Predominant Th1/Tc1-type cytokine to Th2/Tc2 (IFN- γ /IL-4) was apparently found in tumor lesions. These results show that T helper type 1 (Th1) and T cytotoxic type 1 (Tc1) may exert immunoregulatory effects on anti-tumor immune responses.

References

- Boon T, Cerottini JC, van den Eynde B, van der Bruggen P and van Pel A: Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12: 337-365, 1994.
- Vose BM and Moore M: Human tumor-infiltrating lymphocytes: a marker of host response. *Semin Hematol* 22: 27-40, 1985.
- Coulie PG, Brichard V, van Pel A, *et al*: A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 180: 35-42, 1994.
- Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, *et al*: Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with *in vivo* tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6458-6462, 1994.
- Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, *et al*: Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 180: 347-352, 1994.
- Boon T, Coulie PG and van den Eynde B: Tumor antigens recognized by T-cells. *Immunol Today* 18: 267-268, 1997.
- Hogan KT, Eisinger DP, Cupp SB III, *et al*: The peptide recognized by HLA-A68.2-restricted, squamous cell carcinoma of the lung-specific cytotoxic T lymphocytes is derived from a mutated elongation factor 2 gene. *Cancer Res* 58: 5144-5150, 1998.
- Gaudin C, Dietrich PY, Robache S, *et al*: *In vivo* local expansion of clonal T-Cell subpopulations in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 55: 685-690, 1995.
- Davis MM and Bjorkman PJ: T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334: 395-402, 1988.
- Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H and Ohtani H: CD8⁺ T-cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 58: 3491-3494, 1998.
- Nakano O, Sato M, Naito Y, *et al*: Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res* 61: 5132-5136, 2001.
- Abbas AK, Murphy KM and Sher A: Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793, 1996.
- Mosmann TR, Li L and Sad S: Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin Immunol* 9: 87-92, 1997.
- Sad S, Marcotte R and Mosmann TR: Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8⁺ T-cells into cytotoxic CD8⁺ T-Cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 2: 271-279, 1995.
- Cerwenka A, Carter LL, Reome JB, Swain SL and Dutton RW: *In vivo* persistence of CD8 polarized T-cell subsets producing type 1 or type 2 cytokines. *J Immunol* 161: 97-105, 1998.
- Li L, Sad S, Kagi D and Mosmann TR: CD8Tc1 and Tc2 cells secrete distinct cytokine patterns *in vitro* and *in vivo* but induce similar inflammatory reactions. *J Immunol* 158: 4152-4161, 1997.
- Matsutani T, Yoshioka T, Tsuruta Y, Iwagami S and Suzuki R: Analysis of TCRAV and TCRBV repertoires in healthy individuals by microplate hybridization assay. *Hum Immunol* 56: 57-69, 1997.
- Matsutani T, Yoshioka T, Tsuruta Y, *et al*: Restricted usage of T-cell receptor alpha-chain variable region (TCRAV) and T-cell receptor beta-chain variable region (TCRBV) repertoires after human allogeneic haematopoietic transplantation. *Br J Haematol* 109: 759-769, 2000.
- Mempel M, Musette P, Flageul B, *et al*: T-cell receptor repertoire and cytokine pattern in granuloma annulare: defining a particular type of cutaneous granulomatous inflammation. *J Invest Dermatol* 118: 957-966, 2002.
- Wang RF and Rosenberg SA: Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol Rev* 170: 85-100, 1999.
- Dietrich PY, Walker PR, Schnuriger V, *et al*: TCR analysis reveals significant repertoire selection during *in vitro* lymphocyte culture. *Int Immunol* 9: 1073-1083, 1997.
- Schwab R, Szabo P, Manavalan JS, *et al*: Expanded CD4⁺ and CD8⁺ T-cell clones in elderly humans. *J Immunol* 158: 4493-4499, 1997.
- Wack A, Cossarizza A, Heltai S, *et al*: Age-related modifications of the human alphabeta T-Cell repertoire due to different clonal expansions in the CD4⁺ and CD8⁺ subsets. *Int Immunol* 10: 1281-1288, 1998.
- Roussel E, Gingras MC, Grimm EA and Roth JA: High expression of adhesion molecules/activation markers with little interleukin-2, interferon gamma, and tumor necrosis factor beta gene activation in fresh tumor-infiltrating lymphocytes from lung adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 41: 1-9, 1995.
- Csiszar A, Szentes T, Haraszti B, Zou W, Emilie D, Petranyi G and Pocsik E: Characterization of cytokine mRNA expression in tumor-infiltrating mononuclear cells and tumor cells freshly isolated from human colorectal carcinomas. *Eur Cytokine Netw* 12: 87-96, 2001.
- Arden B, Clark SP, Kabelitz D and Mak TW: Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42: 455-500, 1995.
- Wei S, Charnley P, Robinson MA and Concannon P: The extent of the human germline T-cell receptor V beta gene segment repertoire. *Immunogenetics* 40: 27-36, 1994.
- Koop BF, Rowen L, Wang K, *et al*: The human T-cell receptor TCRAC/TCRDC (C alpha/C delta) region: organization, sequence, and evolution of 97.6 kb of DNA. *Genomics* 19: 478-493, 1994.
- Toyonaga B, Yoshikai Y, Vadasz V, Chin B and Mak TW: Organization and sequences of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell receptor beta chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8624-8628, 1985.

II. 骨代謝調節系

破骨細胞の機能・骨吸収メカニズム 骨吸収促進因子

破骨細胞分化因子 RANKL

Possible role of RANKL in bone resorption

宇田川信之¹ 中村美どり² 高橋直之³

Key words : RANKL, OPG, 破骨細胞, 骨芽細胞, 骨代謝共役因子

1. RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand)の発見

1997年, 3つの異なる研究グループ(雪印乳業, アムジェン, スミスクラインビーチャム)によって破骨細胞形成を抑制する新規因子のcDNAクローニングが成功し, ほぼ同時期に報告された¹⁾. この同一分子(骨を防御する因子として命名された osteoprotegerin(OPG)という統一名称を使用することが米国骨代謝学会で決議された)は, TNF受容体ファミリーでありながら膜貫通領域が存在しない分泌性の蛋白質であった¹⁾.

更に, 雪印乳業のグループは, OPGが結合するリガンドとしてTNFファミリーに属する膜結合蛋白質のcDNAのクローニングに成功した²⁾. この分子こそ, 骨芽細胞の細胞膜表面上に発現誘導される破骨細胞分化因子(ODF)そのものであった. ODFの細胞内領域と膜貫通領域を欠如した可溶性ODFを遺伝子工学的に作製し, 破骨細胞分化誘導活性をマウスあるいはヒトの血液細胞の培養系を用いて調べたところ, 骨芽細胞の非存在下でも可溶性ODFとマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)の添加によって破骨細胞が多数形成された. これらの破骨細胞形成促進活性はOPGの添加によって完全に

阻害された³⁾.

ODFの真の受容体は, 既に報告されていたRANK(receptor activator of NF- κ B)と呼ばれるTNF受容体ファミリーに属する膜結合蛋白質であることが種々の実験により証明された. したがって現在, ODFはRANKリガンド(RANKL)という名称で統一されている¹⁾(図1).

一方, OPGはRANKLのおとり受容体(decoy receptor)としてRANKLの真の受容体であるRANKと競合し, RANKよりもはるかに高い親和性でRANKLに結合することにより, RANKLの活性を抑制することが明らかとなった¹⁾(図1). RANKL遺伝子欠損マウスは破骨細胞の欠如により大理石骨病を呈することより, RANKLの破骨細胞分化における重要性が証明されている³⁾.

2. 活性化Tリンパ球に発現するRANKLは破骨細胞の分化を直接促進する

RANKLは破骨細胞の分化のみならずリンパ節の発生およびリンパ球の分化にも重要な役割を果たしていることが, RANKL遺伝子欠損マウスの所見から明らかとなり, 免疫系におけるRANKLの重要性が注目されている³⁾.

最近, 関節リウマチ(RA)患者およびリウマチモデル動物の関節滑膜組織におけるRANKL

¹Nobuyuki Udagawa: Department of Biochemistry, Matsumoto Dental University 松本歯科大学生化学 ²Midori Nakamura: Department of Pediatric Dentistry 同小児歯科学 ³Naoyuki Takahashi: Division of Hard Tissue Research, Institute for Oral Science 同総合歯科医学研究所硬組織疾患制御再建学

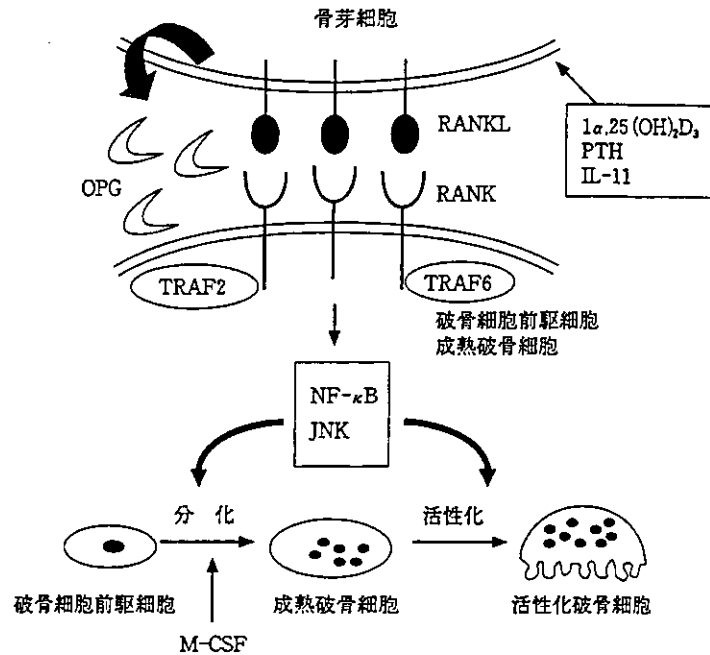


図1 破骨細胞形成の分子機構

の発現を解析した実験成績が相次いで報告された。著者らも、*in situ* hybridization法を用いて観察したところ、RA患者の関節滑膜組織において多数増殖が認められる線維芽細胞およびCD3陽性の活性化Tリンパ球にRANKLのmRNAおよび蛋白の発現を認めた⁴⁾。また、RA患者の関節液中の可溶性RANKL濃度をELISA法によって測定した結果、RA患者の関節液中には、変形性関節症、外傷、痛風患者と比較して、可溶性RANKLが高濃度に含まれていることが明らかとなった。一方、RA患者のOPG濃度は低値を示しており、変形性関節症または痛風患者と比較すると、RA患者の関節液における可溶性RANKLとOPG濃度の比(RANKL/OPG)は有意に高値を示した。その結果、RANKL/OPGの上昇が、RAにおける骨破壊を惹起している可能性が示された⁴⁾。実際、活性化されたTリンパ球がRANKLを発現し、直接破骨細胞の分化を促進する実験結果も得られている(図2)。

以上の*in vitro*の実験結果を支持する*in vivo*の実験結果として、マウスの関節炎モデルにお

ける骨破壊はRANKL遺伝子欠損マウスでは認められないとする実験成績が報告された⁵⁾。また、アムジェンのグループは、Tリンパ球が恒常的に活性化されているctla4遺伝子欠損マウスは骨吸収の亢進が認められ典型的な骨粗鬆症の症状を示すこと、リウマチモデルであるアジュバント誘発関節炎ラットに対するOPGの投与は骨密度の回復作用を示すことを報告した⁶⁾。更に、限局性若年性歯周炎の原因菌である*Actinobacillus actinomycetemcomitans*によって発症させた歯周炎モデルマウスにおける歯槽骨の吸収には活性化Tリンパ球(CD4⁺T cell)が直接関与しており、これらの骨吸収の亢進はOPGの投与によって抑制されるとする興味深い実験結果も報告されている⁷⁾。

また、RAの滑膜組織に存在するTリンパ球やマクロファージが産生するIL-6、可溶性IL-6受容体(sIL-6R)、IL-17、TNF α 、IL-1 α などは骨芽細胞に作用し、RANKLの発現を促すことにより破骨細胞の形成を促進するとする実験結果や、TNFやIL-1がRANKLを介さずに直接破骨細胞の分化や機能を制御するとする報告も

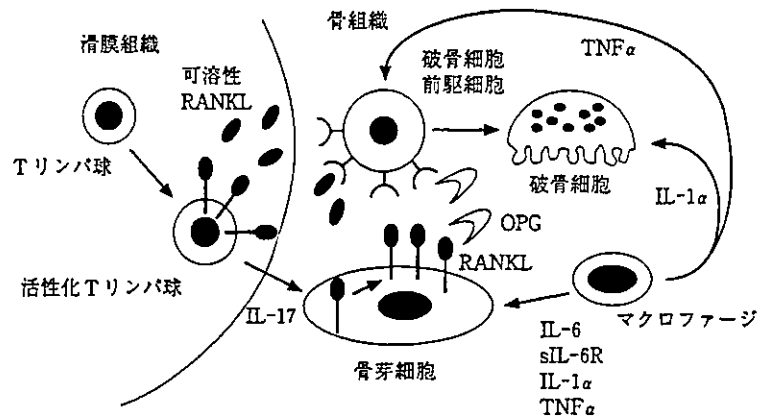


図2 活性化Tリンパ球の破骨細胞分化への関与

あり、RA病変における骨破壊には複数の機構が関与していると考えられる¹¹⁾(図2)。

東京大学医学部整形外科の田中らのグループは、自己RANKLに対する液性免疫誘導によりマウスの関節炎モデルにおける関節破壊を抑制するという新しい治療法を開発した⁹⁾。このワクチン療法はOPGの頻回投与によって引き起こされる中和抗体産生によるOPGの効果減弱という問題点を克服することができ、RAや骨粗鬆症における病的骨吸収に対する有効な治療法として今後の臨床応用が注目される。

一方、高柳ら⁹⁾は、活性化Tリンパ球はIFN- γ の産生を介して破骨細胞の分化を抑制する実験結果を各種の遺伝子欠損マウスを用いて報告している。その実験成績によると、IFN- γ はTリンパ球活性化に伴う骨破壊においてTRAF6 (TNF receptor-associated factor 6: RANKL, IL-1, LPSなどのシグナル伝達因子)を標的分子とし、その分解を介してRANKLのシグナル伝達を抑制する機構を有するとしている。したがって、TRAF6の機能や発現を抑制することによって新たな炎症性骨破壊の治療法の確立に道が開けると提唱している⁹⁾。事実、TRAF6遺伝子欠損マウスは重篤な大理石骨病を呈すること、IFN- γ 受容体遺伝子欠損マウスにおいてはコラーゲン誘発性の関節炎が強く発症することなどが報告されている。更に彼らは、RANKLは破骨細胞前駆細胞におけるc-Fos誘導性のIFN

- β 発現を促進し、更にIFN- β はネガティブフィードバックとしてc-Fosの発現を抑制し、破骨細胞分化を阻害する実験結果を報告した¹⁰⁾。IFN- β のノックアウトマウスは破骨細胞数が増加し骨量が減少するという。このような状況の中、NF- κ B, MAPキナーゼおよびc-FosなどのRANKL誘導性の信号伝達が、果たしてどのように破骨細胞の分化と骨吸収機能発現に関与しているかについてはまだまだ謎が多い。

3. OPG 遺伝子欠損マウスにおける血清中の可溶性RANKL産生亢進

RANKLのdecoy受容体であるOPGの遺伝子欠損マウスは、破骨細胞の形成が促進し骨吸収が亢進することにより、骨粗鬆症の症状を呈する^{11,12)}。更に興味深いことに、OPG欠損マウスは骨吸収の亢進とともに血清中のアルカリホスファターゼ(ALP)活性が上昇し、長管骨において骨形成のパラメーター(骨芽細胞面:ObS%BS)も増加していることが明らかとなった¹³⁾。すなわち、OPG欠損マウスは高い骨代謝共役状態にあることが示唆された。そこで、著者らはOPG欠損マウスに骨吸収阻害薬であるビスホスフォネートを30日間連日投与する実験を行った¹³⁾。その結果、ビスホスフォネート投与は、骨吸収の抑制とともに骨形成も完全に抑制した¹³⁾。この結果は、骨吸収と骨形成が厳格に共役していることを示すものであり、骨代謝共

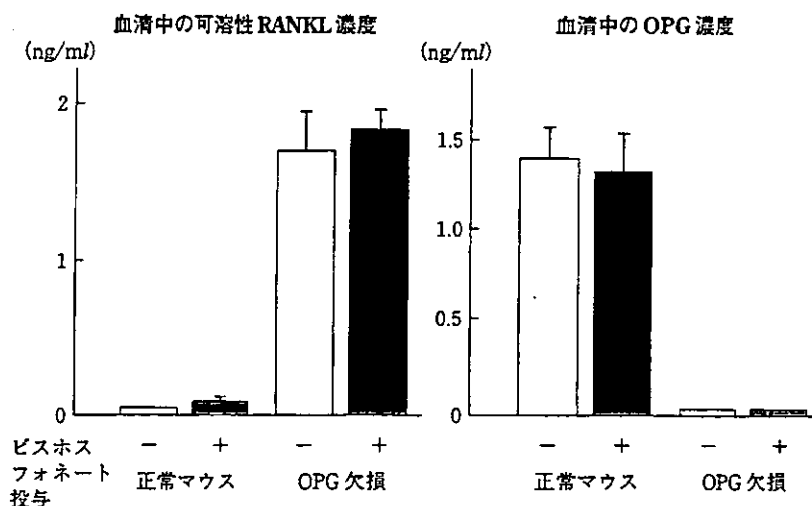


図3 OPG 遺伝子欠損マウスにおける血清中の可溶性 RANKL 産生亢進

役をつかさどる因子(カップリング因子)が実在することを示唆している。

最近、特発性高ホスファターゼ血症(IH)の患者において、OPG 遺伝子の変異が発見された¹⁴⁾。興味深いことに、この患者においては、破骨細胞と同様、骨芽細胞が著しく活性化しており、骨形成と骨吸収が活発に行われている組織所見が認められる。また、血清 ALP 活性(骨形成マーカー)と尿中コラーゲン分解産物である N-テロペプチド量(骨吸収マーカー)がともに IH 患者において高い値を示した¹⁴⁾。

一方、骨 Paget 病は、破骨細胞の機能異常により限局した骨吸収の亢進が生じ、続いて骨形成が促進する疾患として知られている。最近、遺伝性若年性骨 Paget 病の原因として OPG 遺伝子の完全な欠損が報告された¹⁵⁾。この OPG 欠損患者の血清中には OPG は検知できないが、興味深いことに可溶性 RANKL が高濃度で認められた¹⁵⁾。この実験結果は、高回転型の骨代謝病態に可溶性 RANKL の血清レベルでの亢進が関与している可能性を示している。そこで、著者らは OPG 欠損マウスにおける血清中の可溶性 RANKL 濃度を測定した。その結果、正常マウスではほとんど認められない可溶性 RANKL が OPG 欠損マウスでは高値を呈しており、ビスホスフォネート投与は可溶性 RANKL レベルに

は全く影響を与えなかった¹⁵⁾(図3)。また、正常マウス血清中に OPG は認められたが、その値はビスホスフォネート投与によって変化しなかった(図3)。以上の結果から、可溶性 RANKL の産生亢進が、OPG 欠損マウスにおける骨形成促進に関与している可能性は否定された。

血清中の OPG は可溶性 RANKL と複合体を作ることにより、正常状態では血清中の可溶性 RANKL を検知できない可能性が考えられる。そこで、OPG および RANKL に対する抗体を用いた ELISA 法を用いて、OPG と RANKL の複合体を測定した。その結果、OPG-RANKL 複合体は正常マウスの血清中には認められなかった¹⁵⁾。この結果は、OPG が欠如することが RANKL の膜型から可溶性への促進(shedding)に作用している可能性を示唆している。以上の実験結果から、OPG 欠損マウスの骨組織は高回転型の代謝を呈しており、骨粗鬆症というよりも骨 Paget 病の病態を示すことが考えられた。可溶性 RANKL の存在意義とその由来および遊離メカニズムについては今後の大きな研究課題である。

おわりに

RANKL 遺伝子のクローニングにより、破骨細胞の形成を調節する骨芽細胞の役割の詳細が明らかになってきた。更に、RA や歯周疾患の

発症に関与する様々な炎症性サイトカインと RANKLとのシグナル伝達の複雑なクロストークのバールも剥がされつつある。今後、破骨細胞の分化と骨吸収とサイトカインとの関連を証明する更なる研究の発展が期待される。

■ 文 献

- 1) Suda T, et al: Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20: 345-357, 1999.
- 2) Yasuda H, et al: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3597-3602, 1998.
- 3) Kong YY, et al: OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397: 315-323, 1997.
- 4) Kotake S, et al: Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 44: 1003-1012, 2001.
- 5) Pettit AR, et al: TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol* 159: 1689-1699, 2001.
- 6) Kong YY, et al: Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402: 304-309, 1999.
- 7) Teng YT, et al: Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 106: R59-67, 2000.
- 8) Juji T, et al: A novel therapeutic vaccine that prevents pathological bone destruction in models of osteoporosis and RA. *J Bone Miner Metab* 20: 266-268, 2002.
- 9) Takayanagi H, et al: T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature* 408: 600-605, 2000.
- 10) Takayanagi H, et al: RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature* 416: 744-749, 2002.
- 11) Bucay N, et al: Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12: 1260-1268, 1998.
- 12) Mizuno A, et al: Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 610-615, 1998.
- 13) Nakamura M, et al: Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology*, 2003. (in press)
- 14) Hughes AE, et al: Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat Genet* 24: 45-48, 2000.
- 15) Whyte MP, et al: Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med* 347: 175-184, 2002.

骨のリモデリングと骨粗鬆症

中道裕子*・高橋直之**

abstract

骨組織は吸収と形成を繰り返し、形態と骨量を生涯維持する。この骨リモデリングの制御は、骨吸収を担う破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞との間のコミュニケーションを正と負に調節することで行われる。骨吸収と骨形成は厳格に共役（カップリング）しており、破骨細胞が吸収した部位に骨芽細胞は正確に骨をつくる。骨粗鬆症はこの骨代謝共役が破綻した疾患であり、平衡状態が骨吸収へ偏るために骨量が減少する。骨粗鬆症の病態を理解し治療指針を確立するためには、破骨細胞と骨芽細胞の分化と機能の調節機構および骨代謝共役機構を理解することが重要であろう。

I はじめに

骨吸収を司る破骨細胞は、骨芽細胞（あるいは骨髄間質細胞）の調節機構のもとで単球・マクロファージ系前駆細胞より分化する。近年、破骨細胞の分化および活性化を誘導する因子RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) が発見され、骨吸収の調節機構が明らかにされた^{1)~4)}。一方、骨形成を司る骨芽細胞は、未分化間葉系細胞から分化する。骨芽細胞の分化は種々のホルモンやサイトカインで制御されるが、そのなかで、BMPs (bone morphogenetic proteins) は最も強力な分化誘導因子である。また、骨芽細胞の分化に必須な転写因子としてRunx2 (runt-related gene 2 (Cbfa1)) が発見された^{5)・6)}。破骨細胞が吸収した部位に骨芽細胞は正確に骨をつくる。最近の研究より、骨吸収と骨形成は厳格に共役（カップリング）していることが示された。本稿では、破骨細胞と骨芽細胞の分化と機能の調節機構

および骨代謝共役機構を紹介し、骨リモデリング不全としての骨粗鬆症の病態に迫りたい。

II 骨吸収の調節機構

破骨細胞は単球・マクロファージ系前駆細胞より分化、融合して形成される多核細胞である。破骨細胞の分化は、骨芽細胞により厳格に調節されている。骨芽細胞は破骨細胞の分化を誘導する2つのサイトカイン、M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) とRANKLを産生する。一方、破骨細胞前駆細胞はM-CSF受容体c-fmsとRANKL受容体RANKを発現する。骨芽細胞によるM-CSFの発現が構成的であるのに対し、RANKLの発現は誘導的である。1,25(OH)₂D₃ (1,25-dihydroxyvitaminD₃), PTH (parathyroid hormone), PGE₂ (prostaglandin E₂), IL-11 (interleukin-11) などすべての骨吸収促進因子は骨芽細胞のRANKL発現を誘導する⁷⁾。RANKLはTNF (tumor necrosis factor) ファミリ

* 松本歯科大学総合歯科医学研究所硬組織疾患制御再建学部門

** 同 教授

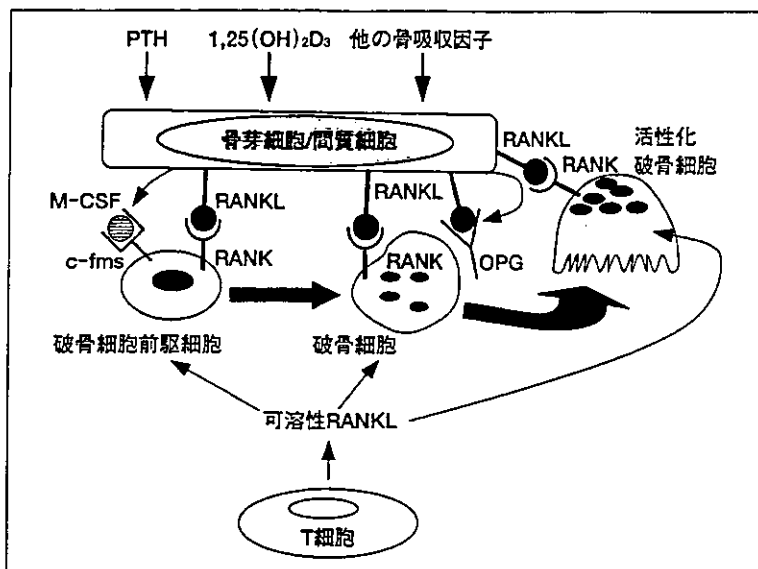


図1
骨吸収を促進する因子

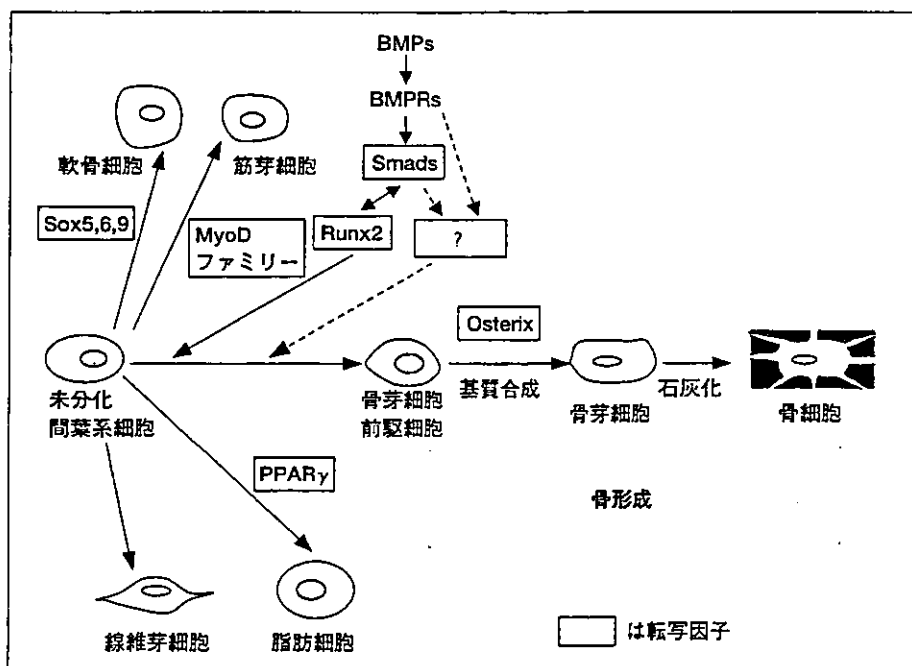


図2
骨芽細胞の分化および機能の調節

ーに属するサイトカインで、骨芽細胞はRANKLを膜結合因子として発現する。破骨細胞前駆細胞は骨芽細胞との細胞間接触を介してRANKLを認識し、M-CSFの存在下で破骨細胞に分化する(図1)。さらに、成熟破骨細胞もRANKを発現しており、RANKシグナルは破骨細胞の骨吸収活性を促進する。興味深いことに、骨芽細胞は破骨細胞の形成を阻害するOPG(osteoprotegerin)を分泌する。OPGはTNF受容体ファミリーに属するが、膜貫通

ドメインをもたず細胞外に分泌されるタンパクである。OPGはRANKLに特異的に結合しRANKL/RANKのシグナルを遮断することで骨吸収を抑制する^{8), 9)}。このように、骨芽細胞は破骨細胞に対する正と負のメディエーターを自ら発現し、骨吸収を制御する。一方、活性化されたT細胞もRANKLを遊離型として産生・分泌する。そのため、炎症性骨吸収にはT細胞由来のRANKLも関与すると考えられている。

c-fmsはチロシンキナーゼドメインをもつ受容体である。一方、RANKにはTRAFs (TNF receptor associated factors) が結合する¹⁰⁾。TRAFsを介したシグナルは、さらにJNK (c-jun N-terminal kinase), p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) およびERK (extracellular signal regulated kinase)などを活性化する。これらのシグナルが破骨細胞の分化を誘導する^{11)~13)}。一方、ノックアウトマウスの解析より、NF- κ Bとc-Fosは破骨細胞の分化に必須な転写因子であることが示された^{14)~17)}。最近、NFAT2 (nuclear factor of activated T cells, NFATc1)も破骨細胞の分化に重要な転写因子であることが報告された¹⁸⁾。破骨細胞の分化と機能を調節する転写因子の研究は、今後さらに活発に展開されるであろう。

III 骨形成の調節機構

骨形成を担う骨芽細胞は、軟骨細胞、線維芽細胞、筋芽細胞、脂肪細胞と同様に未分化間葉系細胞を起源とする(図2)。骨形成を調節する因子としては、PTHやエストロゲンなどのホルモンとTGF β (transforming growth factor β), FGF (fibroblast growth factor), IGF (insulin-like growth factor), BMPなどのサイトカインが知られる。それらのなかで、BMPは骨芽細胞の分化を最も強力に誘導する因子である。BMPは骨基質中に多量に存在し、骨折や骨吸収時に放出されパラクリン的に作用すると考えられている。BMPはセリン・スレオニンキナーゼ活性をもつI型およびII型受容体から成るヘテロ二量体と結合する。BMPシグナルは転写因子Smadにより伝達される。BMPが受容体に結合すると、リガンド特異型転写因子Smad1/5/8がリン酸化される。リン酸化されたSmad1/5/8は、共通型SmadであるSmad4とヘテロ三量体を形成し、核内に移行し標的遺伝子の転写を促進する。一方、Smad6/7は抑制型Smadで、I型受容体に結合してリガンド特異型Smadのリン酸化を阻害する。BMPは抑制型Smad6の発現を誘導する。このように、BMPはSmadシグナルのオン/オフをこまめに制御

しながら骨形成を促進する因子である。

Runx2は骨芽細胞の分化に必須な転写因子として発見された。Runx2遺伝子欠損マウスは骨芽細胞の分化に障害があり、骨が形成されない。また、頭蓋・肩甲骨の低形成を特徴としたヒトのCleidocranial dysplasia症候群は、Runx2ヘテロ欠損遺伝病であることが知られている^{5), 6), 19)}。BMPはRunx2の発現を誘導し、Smad5はRunx2と相互作用して、骨芽細胞の分化を促進することが報告された^{20), 21)}。一方、Runx2欠損マウスより得た間葉系細胞の骨芽細胞への分化も誘導できる。そのため、BMPはRunx2依存のおよび非依存的に骨芽細胞の分化を誘導すると考えられる²²⁾。実際に、Osterixは、BMP刺激により骨芽細胞前駆細胞が発現する転写因子として発見された。Osterixノックアウトマウスは軟骨形成とRunx2の発現に異常はないが、Runx2ノックアウトマウスと同様に骨芽細胞が全く存在しない。一方、Runx2ノックアウトマウスはOsterixも発現しない。そのため、骨芽細胞の分化において、OsterixはRunx2の下流で働く転写因子と考えられている²³⁾。

最近、Wntの受容体Frizzledとともにそのシグナルを伝達するLRP5 (low density lipoprotein receptor-related protein 5)の欠損が骨粗鬆症をもたらすことが示された^{24), 25)}。さらに、骨密度に影響を及ぼす遺伝因子を同定する連鎖解析が行われ、LRP5遺伝子上に1アミノ酸置換(G171V)が見いだされた²⁶⁾。このように、Wntシグナルも骨形成を調節していると考えられ、その詳細な解明が期待される²⁷⁾。

IV 骨リモデリング

動物にPTHや1,25(OH) $_2$ D $_3$ を投与して骨吸収を促進させると、血中の骨形成マーカーも亢進する。また、卵巣摘出術を施した動物では、骨吸収と骨形成が同時に亢進される。このように、骨吸収と骨形成が共役していることは知られているが、どれほど厳格に共役しているか明らかではなかった。最近、OPG欠損マウスを用いて、骨吸収と骨形成がきわめて厳格に共役していることが示された。OPG欠損マウスは、骨吸収が著しく亢進するため重篤な骨粗鬆

症を呈する。骨形態計測を行ったところ、OPG欠損マウスは骨吸収の亢進とともに、骨形成も著しく亢進していることが判明した。実際に、OPG欠損マウスにおいて、骨形成の指標である血中のアルカリホスファターゼ活性とオステオカルシン値は正常マウスよりも4倍も高値を示す。OPG欠損マウスは骨吸収と骨形成がともに亢進しているが、平衡状態が骨吸収に偏るために骨量が減少する。そこで、OPG欠損マウスに骨吸収抑制薬であるビスフォスフォネートを投与し、骨吸収を抑制したとき、骨形成がどのように制御されるか解析された。OPG欠損マウスにビスフォスフォネートを投与すると骨吸収が著しく抑制され、骨量は増加した。興味深いことに、骨吸収の抑制に伴い、亢進していた骨芽細胞の機能も強力に抑制された。ビスフォスフォネート投与により、OPG欠損マウスの血中のアルカリホスファターゼ活性とオステオカルシン値も正常値に回復した。これらの実験結果は、破骨細胞と骨芽細胞の機能が厳格に共役していることを示すものである。一方、BMPベレットの皮下移植実験より、BMPが誘導する異所性骨形成はOPG欠損マウスと正常マウスの間に差異が認められなかった。この知見は、骨代謝共役を司る因子は液性ではなく局所で作用する因子である可能性を示唆する²⁰⁾。これまでに骨代謝異常を示す遺伝子欠損あるいは遺伝子導入された多くのマウスが解析されてきたが、そのほとんどが骨形成と骨吸収がともに増加するか、あるいはともに低下するという傾向が認められる。今後の研究で、骨代謝共役の分子機構の解明が望まれる。

V 骨リモデリング異常としての骨粗鬆症

骨粗鬆症は、骨吸収と骨形成の共役の破綻がもたらした病態と考えられる。老人性の骨粗鬆症は、骨吸収と骨形成がともに低下したリモデリング速度の遅い低回転型骨粗鬆症である。長期的には骨形成の低下が骨吸収の低下よりも大きいため骨量が減少する。骨形成低下の一因に、BMP/Runx2シグナル系やWntシグナル系の活性化低下が関与しているかもしれない。一方、エストロゲン欠乏に起因する閉経

後骨粗鬆症は、骨吸収と骨形成がともに亢進したりモデリング速度の速い高回転型骨粗鬆症である。高回転型骨粗鬆症では、RANKLの誘導が引き金になると考えられる。卵巣摘出動物において、骨局所でIL-1, IL-6, TNF- α などの骨吸収を促進するサイトカインの産生亢進が認められ^{29)~31)}、これらのサイトカインは骨芽細胞のRANKLの発現を誘導する。一方、破骨細胞の機能の亢進は、局所で骨芽細胞の機能を促進する。高回転型骨粗鬆症に認められる骨形成の促進は、この骨代謝共役機構によると考えられる。骨代謝共役の分子機構は解明されていないが、骨吸収抑制薬は、骨形成も同時に抑制することを常に念頭に処方されることが必要であろう。

VI おわりに

骨リモデリングは骨形成と骨吸収の巧みなバランスにより制御される。各種の実験より、骨吸収と骨形成を結ぶ骨代謝共役機構が骨リモデリングの制御の本体であると考えられる。この数年で、破骨細胞と骨芽細胞の分化と機能を調節する因子やシグナルが次々と解明されてきた。今後の研究で、骨代謝共役機構が解明されることが期待される。骨代謝共役の分子機構の解明は、リモデリング速度の遅い低回転型骨粗鬆症とリモデリング速度の早い高回転型骨粗鬆症に適したそれぞれの治療指針の確立にも大いに寄与するであろう。

参考文献

- 1) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al : Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci USA 95 : 3597~3602, 1998
- 2) Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al : Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 93 : 165~176, 1998
- 3) Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al : A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature 390 : 175~179, 1997
- 4) Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al : OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature 397 : 315~323, 1999
- 5) Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al : Os2/Cbfa1 : a transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell 89 : 747~754, 1997

- 6) Komori T, Yagi H, Nomura S, et al : Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89 : 755~764, 1997
- 7) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, et al : Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20 : 345~357, 1999
- 8) Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al : Osteoprotegerin : a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89 : 309~319, 1997
- 9) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al : Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG) : a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. *Endocrinology* 139 : 1329~1337, 1998
- 10) Darnay BG, Haridas V, Ni J, et al : Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF- κ B (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF- κ B and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 273 : 20551~20555, 1998
- 11) Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL : Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423 : 337~342, 2003
- 12) Teitelbaum SL, Ross FP : Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4 : 638~649, 2003
- 13) Li X, Udagawa N, Itoh K, et al : p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function. *Endocrinology* 143 : 3105~3113, 2002
- 14) Iotsova V, Caamano J, Loy J, et al : Osteopetrosis in mice lacking NF- κ B1 and NF- κ B2. *Nat Med* 3 : 1285~1289, 1997
- 15) Franzoso G, Carlson L, Xing L, et al : Requirement for NF- κ B in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev* 11 : 3482~3496, 1997
- 16) Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, et al : Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* 360 : 741~745, 1992
- 17) Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, et al : c-Fos : a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 266 : 443~448, 1994
- 18) Takayanagi H, Kim S, Koga T, et al : Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3 : 889~901, 2002
- 19) Otto F, Thornell AP, Crompton T, et al : *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89 : 765~771, 1997
- 20) Lee KS, Kim HJ, Li QL, et al : Runx2 is a common target of transforming growth factor β 1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 20 : 8783~8792, 2000
- 21) Hanai J, Chen LF, Kanno T, et al : Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline $\text{C}\alpha$ promoter. *J Biol Chem* 274 : 31577~31582, 1999
- 22) Lee MH, Kwon TG, Park HS, et al : 2003 BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun* 309 : 689~694, 2003
- 23) Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al : The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108 : 17~29, 2002
- 24) Kato M, Patel MS, Levasseur R, et al : *Cbfa1*-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in *Lrp5*, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 157 : 303~314, 2002
- 25) Gong Y, Slee RB, Fukui N, et al : LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107 : 513~523, 2001
- 26) Boyden LM, Mao J, Belsky J, et al : High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 346 : 1513~1521, 2002
- 27) Harada S, Rodan GA : Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423 : 349~355, 2003
- 28) Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, et al : Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology* 144 : 5441~5449, 2003
- 29) Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, et al : Increased osteoclast development after estrogen loss : mediation by interleukin-6. *Science* 257 : 88~91, 1992
- 30) Miyaura C, Kusano K, Masuzawa T, et al : Endogenous bone-resorbing factors in estrogen deficiency : cooperative effects of IL-1 and IL-6. *J Bone Miner Res* 10 : 1365~1373, 1995
- 31) Pacifici R, Rifas L, McCracken R, et al : Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 2398~2402, 1989

抗 RANKL 抗体 AMG 162 による 骨粗鬆症の治療

高橋 直之* 小澤 英浩**

RANKL (receptor activator of NF- κ B) は、破骨細胞の分化を誘導するサイトカインである。Amgen 社は RANKL に対するヒト RANKL 抗体 AMG 162 を作製し、骨粗鬆症治療薬としての臨床試験を進めている。49 人の閉経後の女性を対象としたフェーズ I 試験では、AMG 162 単回皮下投与によって、長期間 (6 カ月以上) の骨吸収の抑制が持続すること、また重篤の副作用のないことが報告された。さらに、骨量低下を示す閉経後の女性 411 人を対象としたフェーズ II 試験では、AMG 162 単回皮下投与によって 1 カ月以内に骨量が増加することが示された。

A new treatment for osteoporosis using fully human monoclonal antibody to RANKL, AMG 162

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Science Course, Matsumoto Dental University

Naoyuki Takahashi, Hidehiro Ozawa

RANKL is an essential factor for osteoclastogenesis. Amgen research group has developed AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL. The bone antiresorptive activity and safety of AMG 162 were evaluated in 49 healthy postmenopausal women (Phase I study). The effect of increasing amounts of AMG 162 on bone mineral density (BMD) was studied in 411 postmenopausal women with low BMD (Phase II study). A single subcutaneous dose of AMG 162 (1 mg/kg or 60 mg) suppressed bone resorption for more than 6 month without critical side effects (Phase I study), and increased BMD within 1 month in postmenopausal women (Phase II study).

はじめに
骨芽細胞は、破骨細胞の分化に必要不可欠な 2

つのサイトカインである、macrophage colony-stimulating factor (以下 M-CSF と略す) と recep-

* Naoyuki Takahashi 松本歯科大学大学院硬組織疾患制御再建学講座・教授

** Hidehiro Ozawa 松本歯科大学長 / 松本歯科大学大学院硬組織疾患制御再建学講座・主任教授

tor activator of NF- κ B ligand(以下 RANKL と略す)を発現する¹⁾²⁾。骨芽細胞は、構成的に M-CSF を発現するのに対し、RANKL を誘導的に発現する。すべての骨吸収を促進するホルモンやサイトカインは、骨芽細胞の RANKL の発現を誘導して骨吸収を促進する。RANKL は、tumor necrosis factor (以下 TNF と略す)ファミリーに属する膜結合型サイトカインである。さらに、骨芽細胞は、RANKL のデコイ受容体で、破骨細胞の形成を抑制する分泌性タンパク質 osteoprotegerin (以下 OPG と略す)も産生する。骨粗鬆症では、破骨細胞による骨吸収が、骨芽細胞による骨形成を凌駕するため骨量の低下が起こる。そのため、ビスホスホネートを始め多くの骨粗鬆症の治療薬は、骨吸収を抑制することを目的に開発されている。Amgen 社は、骨粗鬆症治療薬として OPG (AMGN-0007)とともに RANKL に対する完全なヒト抗体 AMG 162 の作製に成功した。米国で、AMG 162 を用いた臨床試験も進められている^{3)~5)}。閉経後の女性を対象としたフェーズ I 試験では、AMG 162 単回皮下注射によって、長期間(6 カ月以上)の骨吸収の抑制が持続することが報告された³⁾⁴⁾。さらに、フェーズ II 試験では、骨量増加作用があることが示された⁵⁾。

RANK/RANKL 系による破骨細胞制御機構

1998 年、骨芽細胞が発現する破骨細胞分化因子がクローニングされ、TNF ファミリーに属する膜結合型タンパク質 RANKL であることが明らかとなった⁶⁾⁷⁾。この発見により、骨吸収調節機構の一端が分子レベルで解明されるに至った¹⁾²⁾。すなわち、骨芽細胞は、破骨細胞の分化に必須な 2 つの因子 M-CSF と RANKL を発現することで、破骨細胞の形成を支持する(図 1)。破骨細胞前駆細胞は、単球・マクロファージ系細胞で、M-CSF 受容体と RANKL 受容体である receptor activator of NF- κ B(以下 RANK と略す)を発現して

いる。破骨細胞前駆細胞は、細胞間接触機構で骨芽細胞が発現する RANKL を認識し、M-CSF の存在下で破骨細胞に分化する。また、成熟破骨細胞も RANK を発現しており、RANKL は破骨細胞の骨吸収活性を誘導する。活性型ビタミン D₃、副甲状腺ホルモン(以下 PTH と略す)、プロスタグランジン E₂、インターロイキン 11 など、すべての骨吸収促進因子は、骨芽細胞における RANKL の発現を誘導する¹⁾²⁾。興味深いことに、骨芽細胞は、RANKL のデコイ受容体である分泌性タンパク質 OPG も産生し分泌する¹⁾²⁾。OPG は RANKL-RANK 相互作用を阻害し、骨吸収を強力に抑制する。RANKL 遺伝子と RANK 遺伝子の欠損マウスがそれぞれ作製された。これら欠損マウスは、ともに骨組織に破骨細胞が存在せず、重篤な大理石骨病を発症した⁸⁾⁹⁾。これらの所見より、RANKL-RANK 相互作用は、破骨細胞の分化に必須であることが証明された。

RANKL の構造と抗 RANKL ヒト抗体 AMG 162

RANKL は、316 個のアミノ酸からなる細胞膜貫通領域を持つ TNF ファミリーに属するサイトカインである¹⁾²⁾。Amgen 社は、ヒト RANKL に対する完全ヒトモノクローナ抗体 AMG 162 を作製した。AMG 162 の RANKL への結合は、Kd (解離定数) = 3×10^{-12} M と強く、RANKL-RANK 相互作用を強力に抑制する⁴⁾。また、AMG 162 は TNF α 、や TNF-related apoptosis-inducing ligand (以下 TRAIL と略す)などほかの TNF ファミリーメンバーとは結合しない。この抗体 AMG 162 を用いたフェーズ I 試験とフェーズ II 試験が米国で行われた。

AMG 162 フェーズ I 試験

AMG 162 を用いたフェーズ I 試験では、49 人の閉経後の健康女性を対象に、その安全性と骨吸収抑制作用が検討された³⁾⁴⁾。49 人を 7 グループ

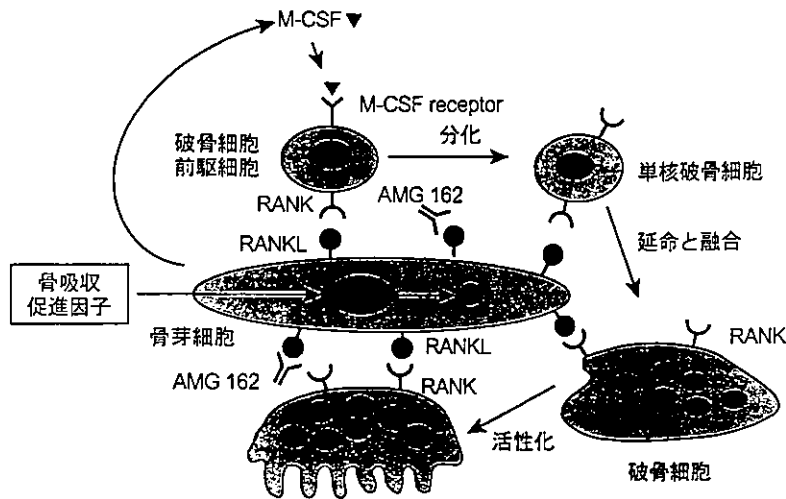


図1 破骨細胞の形成と機能を誘導する RANKL と AMG 162 の作用

破骨細胞前駆細胞は、細胞間接触機構で骨芽細胞が発現する RANKL を認識し、M-CSF の存在下で破骨細胞に分化する。また、成熟破骨細胞も RANK を発現しており、RANKL は破骨細胞の骨吸収活性を誘導する。すべての骨吸収を促進する因子は、骨芽細胞の RANKL 発現を誘導する。RANKL に対する完全ヒトモノクローナ抗体 AMG 162 は、RANKL に結合し、RANKL-RANK 相互作用を抑制する。

RANK : receptor activator of NF-κB
 RANKL : receptor activator of NF-κB ligand
 M-CSF : macrophage colony-stimulating factor

(筆者ら作成)

に分け、AMG 162 (0.01 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1.0 mg/kg, 3.0 mg/kg) あるいはプラセボを1回皮下投与し、骨代謝マーカーとして尿中 NTX(N-telopeptide/creatinine)、血中 NTX、血中 bone alkaline phosphatase(以下 BALP と略す)を経時的に測定した。さらに、血清カルシウムと PTH を測定し、以下の結果を得た。

① AMG 162 投与により、尿中 NTX 値は急激に(12時間以内)そして容量依存的に低下した(図2)。高濃度投与群においては、この低下作用は6カ月以上も持続した。血中 NTX も同様に低下した。

② BALP は緩やかに低下したが、6カ月以降に回復した(図3)。

③ 血清カルシウム値と PTH 値は、有意な変動を示さなかった。

④ 血中の AMG 162 濃度は、投与後徐々に減少

したが、9カ月後も 3.0 mg/kg 投与群において数十 ng/mL 見いだされた。AMG 162 は、消失されにくいことが明らかとなった(図4)。

これらの結果から、AMG 162 の骨吸収抑制効果はきわめて強く、6カ月以上骨吸収を抑制できることが判明した。AMG 162 の 3.0 mg/kg の単回投与でも、6カ月後の骨吸収抑制効果は、骨吸収抑制薬アレンドロネート(70 mg/週, 10 mg/日)の投与よりも強かった(図5)。また、このフェーズ I 試験では、AMG 162 投与と関連のない腹痛1人と胆嚢炎1人を認めたほか、AMG 162 投与に起因する副作用は認められなかった。

AMG 162 フェーズ II 試験

AMG 162 を用いたフェーズ II 試験が、腰椎の骨量が低い411人の閉経後の女性を対象に行われ

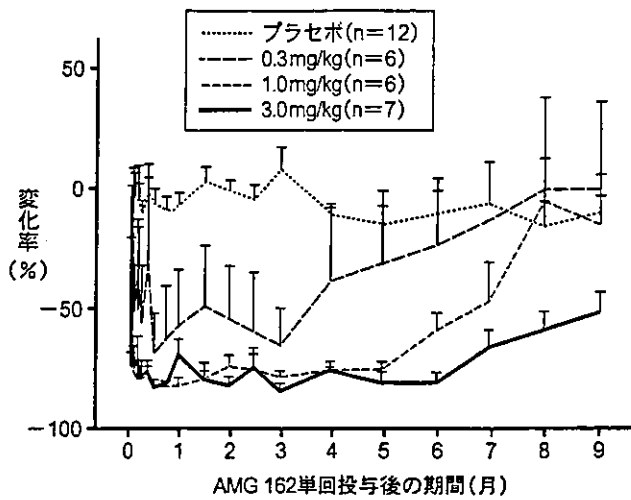


図2 AMG 162単回投与後の尿中NTX値の経時変化 (フェーズI試験)

49人の閉経後の健常女性を7群に分け、AMG 162 (0.01 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1.0 mg/kg, 3.0 mg/kg)あるいはプラセボを1回皮下投与し、尿中NTX(N-telopeptide/creatinine)を経時的に測定した。データは変化率%で表示した(平均値 ± SE)。プラセボ、AMG 162 (0.3 mg/kg, 1.0 mg/kg, 3.0 mg/kg)投与群の結果のみを記した。

(文献3, 4より改変)

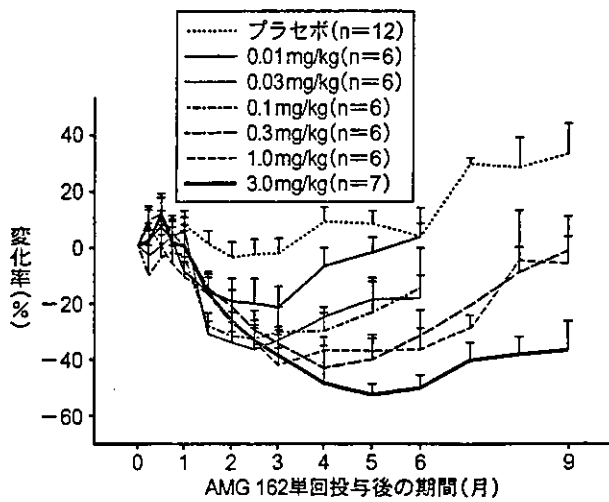


図3 AMG 162単回投与後の血中BALP (bone-specific alkaline phosphatase)の経時変化 (フェーズI試験)

49人の閉経後の健常女性に、AMG 162 (0.01 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1.0 mg/kg, 3.0 mg/kg)あるいはプラセボを1回皮下投与し、血中BALPを経時的に測定した。低容量投与群(0.01 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg)は6カ月以降BALPの測定はしていない。データは変化率%で表示した(平均値 ± SE)。

(文献3, 4より改変)

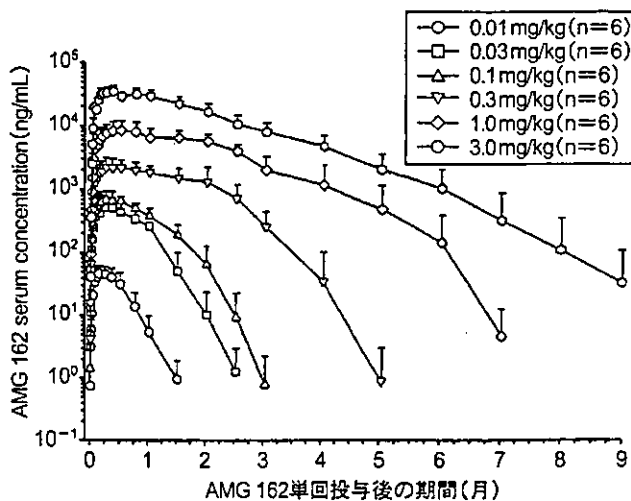


図4 AMG 162単回投与における血中濃度の推移 (フェーズI試験)

データは6人の閉経後の健常女性の値を示す(平均値 ± SE)。

(文献3, 4より改変)