以上の結果より，RA 患者の骨・軟骨破壊においては，増殖した活性化 T リンパ球が産生する IL-17 が骨芽細胞に作用して，RANKL の発現を誘導することにより破骨細胞の分化を促進する可能性が示された[17]（図 2）。

Chabaud ら[18]は，IL-17 が RA 患者由来の滑膜線維芽細胞からの IL-6 と LIF の産生を促進することを報告している。また，彼らは，滑膜の器官培養系においては IL-17 が恒常的に産生されており，IL-4 と IL-13 がその産生を抑制することを報告している[19]。さらに，Lubberts[20]らは，コラーゲン誘発関節炎マウスに IL-4 の gene therapy を行うと，滑膜における IL-17 および RANKL の発現を抑制することにより骨吸収を軽減できるとする実験結果を報告している。

一方，Jovanovic ら[21,22]は，IL-17 はヒトマクロファージによる MMP-9 の産生や各種炎症性サイトカイン（IL-1β，IL-6，TGF-β）の産生を亢進させることを報告している。これらの産生促進には，p 38 MAP kinase のリン酸化および NF-κB の活性化が関与しているとしている[21,22]。また，Ziolkowska ら[23]は，RA 関節液中に高濃度の IL-17 と IL-15 が検出されること，両者は強い正の相関を示すことを報告している。また，ヒト末梢血単核細胞において IL-15 は IL-17 の産生を促進すること，この産生亢進はサイクロスポリン A やステロイドにより抑制されることを示している[23]。

以上の結果より，RA における骨破壊に IL-17 が重要な役割を果たしている可能性が示唆される[24]。今後の詳しい解析が期待される。

IV. 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 遺伝子欠損マウスの所見[7]より，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。

最近，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 の発現を解析した実験成績が相次いで報告された[25~29]。われわれも，*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 CD 3 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[30]。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 濃度の比は有意に高値を示した[30]。その結果，OPG に対する RANKL の相対比の上昇が，RA における骨破壊を惹起している可能性が示された。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[25,30,31]。

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[32]。また，Amgen のグループ[25]は，T リンパ球が恒常的に活性化されている ctla 4 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ド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。さらに，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（CD 4$^+$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[33]。

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，IL-17，TNFα，IL-1 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[10,17,34,35]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（後述）[36~40]もあり，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（図 2）。

最近，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[41]。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。

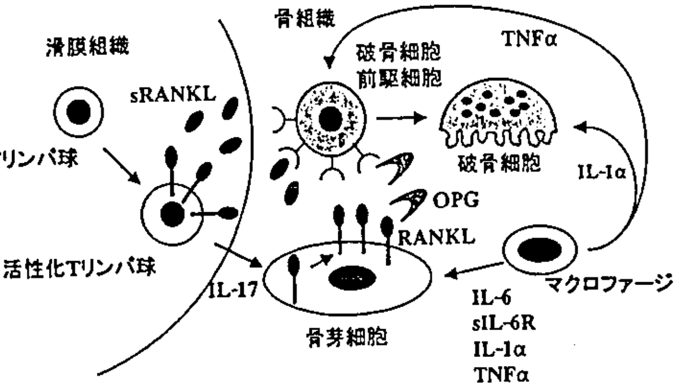


図 2 活性化 T リンパ球の破骨細胞分化への関与
RANKL の発現が強く認められる活性化 T リンパ球は破骨細胞前駆細胞に直接作用し，破骨細胞への分化を促進する。活性化 T リンパ球によって産生される IL-17 は骨芽細胞に作用することにより RANKL の発現を誘導し，間接的に破骨細胞の分化を促進する。活性化 T リンパ球によって産生される RANKL は，骨芽細胞由来の RANKL に較べて膜から離れ易く，可溶性 RANKL（sRANKL）になるという。

V．破骨細胞分化を負に調節する T リンパ球由来の GM-CSF と IFN-γ の役割

われわれは，破骨細胞形成を制御する新しいサイトカインを同定する目的で，骨髄由来の数種類の間質細胞株[42,43]と血液細胞を共存培養することによって，破骨細胞の形成を支持することができる間質細胞と支持することができない細胞の間で発現パターンを異にする分子種を，differential display PCR 法を用いて比較検討した[44]。その結果，破骨細胞形成支持活性のない間質細胞において特異的に発現するバンドを見出し，この遺伝子配列を決定したところ，それはマウスの IL-18（IFN-γ 誘導因子）遺伝子と一致した[44]。

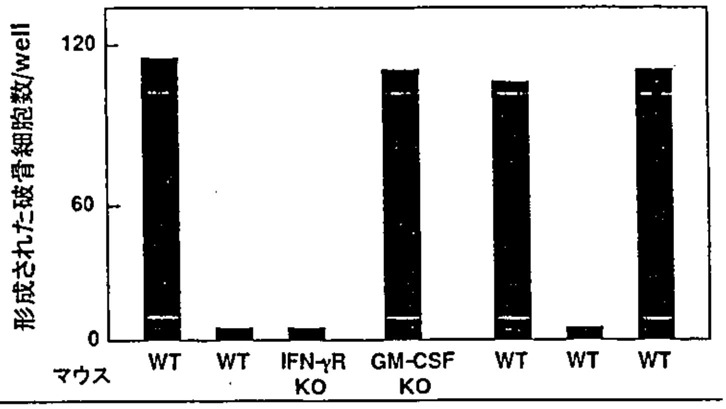
そこで，共存培養系を用いて IL-18 の生物活性の検討を行ったところ，予想どおり IL-18 は各種骨吸収因子によって誘導される破骨細胞形成をすべて強力に抑制した。IL-18 はリンパ球あるいは単球に作用して，IFN-γ と GM-CSF 産生を亢進することが報告されている。よく知られているように，IFN-γ と GM-CSF は強力な破骨細胞形成抑制因子である。そこで，IL-18 による破骨細胞形成の抑制メカニズムを明らかにするため，IFN-γ タイプII受容体遺伝子欠損マウスと GM-CSF 遺伝子欠損マウスからそれぞれ骨芽細胞と血液細胞を調製して共存培養を行い，IL-18 の効果を検討した（図 3）。その結果，IFN-γ の信号が伝達されない IFN-γ 受容体遺伝子欠損マウス由来の細胞の共存培養系においても，IL-18 は破骨細胞形成を正常細胞の共存培養と同様に抑制した。一方，GM-CSF 欠損マウスを用いた共存培養系において誘導される破骨細胞形成に対して IL-18 はまったく抑制作用を示さなかった[44,45]。

さらに，IL-18 刺激による GM-CSF 産生細胞を同定する実験を行った結果，T リンパ球に対する特異抗体を用いて脾臓由来の血液細胞画分から T リンパ球を除去した細胞群を骨芽細胞と共存培養すると，骨吸収因子の刺激により破骨細胞は誘導されるが，この共存培養において IL-18 は破骨細胞の形成をまったく抑制しなかった（図 3）。

この共存培養系に正常マウス脾臓細胞から調製した T リンパ球を添加すると，IL-18 は破骨細胞の形成を抑制した。しかし，GM-CSF 欠損マウス由来の T リンパ球を加えても破骨細胞形成は抑制できなかった（図 3）。

以上の結果より，IL-18 は T リンパ球に作用して GM-CSF の産生を促し，破骨細胞前駆細胞に直接作用することにより，破骨細胞形成を抑制することが明らかとなった（図 4）[44,45]。

最近，Horwood らは，IL-18 と同様に IL-12 が破骨細胞の分化を強力に阻害する成績を報告している[46]。この実験成績によると，IL-12 は T リンパ球に作用し



マウス	WT	WT	IFN-γR KO	GM-CSF KO	WT	WT	WT
共存培養 (D3+PGE2存在下)	←— 血液細胞＋骨芽細胞			—→	←Tリンパ球を除去した血液細胞＋骨芽細胞		→
IL-18		＋	＋	＋	＋	＋	＋
WT由来Tリンパ球						＋	
GM-CSF KO 由来 Tリンパ球							＋

図 3　各種の遺伝子欠損マウス由来の血液細胞と骨芽細胞を用いた共存培養系における破骨細胞形成に対する IL-18 の効果
正常マウス（wild type：WT），IFN-γ タイプII受容体遺伝子欠損マウス（IFN-γR KO），GM-CSF 遺伝子欠損マウス（GM-CSF KO）からそれぞれ骨芽細胞と血液細胞を調製して共存培養（活性型ビタミンＤと PGE_2 の存在下）を行い，IL-18 の効果を検討した。その結果，IFN-γ 受容体遺伝子欠損マウス由来の細胞の共存培養系においても，IL-18 は破骨細胞形成を正常細胞の共存培養と同様に抑制した。一方，GM-CSF 欠損マウスを用いた共存培養系において誘導される破骨細胞形成に対して IL-18 はまったく抑制作用を示さなかった。また，血液細胞画分からＴリンパ球を除去した細胞群を骨芽細胞と共存培養すると，骨吸収因子の刺激により破骨細胞は誘導されるが，この共存培養において IL-18 は破骨細胞の形成をまったく抑制しなかった。この共存培養系に正常マウス由来のＴリンパ球を添加すると，IL-18 は破骨細胞の形成を抑制した。しかし，GM-CSF 欠損マウス由来のＴリンパ球を加えても破骨細胞形成を抑制できなかった。これらの実験成績は IL-18 の破骨細胞形成抑制作用が IFN-γ でなく，GM-CSF を介して発現されることを強く示唆する。

て可溶性因子の産生を促進し，この因子が直接破骨細胞前駆細胞に作用することにより破骨細胞形成が抑制されるとするものである。この新規阻害因子の同定は今後の課題であり，RA 病変における骨破壊を考えるうえでも興味深い。また，IL-18 は骨芽細胞や骨髄間質細胞における OPG の発現を促進する結果も得られており[47]，RA 患者の関節液中において高濃度存在している IL-18 は破骨細胞による骨吸収の亢進を防御する役割を果たしていることが示唆される[48]。実際，乳癌細胞の移植による骨転移モデルマウスにおける骨吸収の亢進は IL-18 の投与によって抑制されるとする結果[49]も報告されており，病的骨吸収における IL-18 や IL-12 の臨床応用も考えられている。

一方，東京大学医学部の高柳ら[50]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 TRAF 6（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，TRAF 6 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。事実，TRAF 6

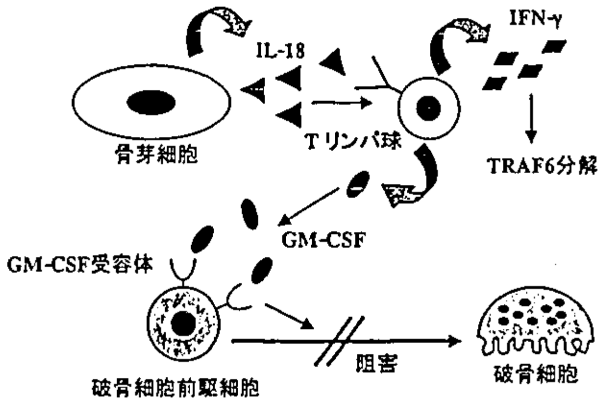


図 4　破骨細胞分化を負に調節するＴリンパ球由来のサイトカインの役割
IL-18 はＴリンパ球に作用して GM-CSF の産生亢進を介して破骨細胞の分化を抑制する。一方，Ｔリンパ球が産生する IFN-γ は，TRAF 6 の分解を促進することによって RANKL シグナルを抑制し，破骨細胞の分化を阻害すると考えられる。IFN-γ は IL-18 の破骨細胞形成抑制作用には関与しない。

遺伝子欠損マウスは重篤な大理石骨病を呈すること[51,52]，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[53]などが報告されている。

VI. RANK-RANKL 系を介さない TNFα の破骨細胞形成促進機構

マウス骨髄細胞を M-CSF の存在下で 4 日間培養して得たマクロファージを RANKL と M-CSF の存在下でさらに 3 日間培養すると，大部分のマクロファージは破骨細胞に分化する[36]。そこでこの培養系を用いて各種サイトカインの作用を調べたところ，マウス TNFα は M-CSF の存在下でマクロファージからの破骨細胞への分化を強力に促進した。一方，ヒト TNFα はわずかな数の単核破骨細胞を誘導するのみであった。

このマクロファージの単独培養系において，IL-1 には破骨細胞の分化を誘導する活性は認められなかった。また，マウス TNFα による破骨細胞形成は OPG の添加によりまったく抑制されなかったが，TNF I 型受容体ならびに TNF II 型受容体に対する中和抗体によって強力に抑制された[36]。

マウス TNFα はマウスの TNF I 型受容体と II 型受容体に結合しシグナルを伝達するのに対し，ヒト TNFα はマウスの TNF I 型受容体にのみ結合する。以上の知見は，TNF I 型受容体および II 型受容体両者からのシグナルが破骨細胞の分化に重要であることを示唆するものである（図 5）。

また，マクロファージの形質を有するマウス株細胞である RAW 264.7 細胞の単独培養においても TNFα 刺激によって破骨細胞の形成が認められた[37,38]。TNFα のシグナル伝達には TRAF 2 が必須であることが報告されており，TNFα 誘導性の破骨細胞形成における TRAF 2 の重要性が示唆される（図 5）。しかし，TRAF 6 遺伝子欠損マウスから得られた破骨細胞前駆細胞に TNFα を処理しても RANKL の場合と同様に破骨細胞はほとんど形成されないことから[39]，TNFα による破骨細胞形成における TRAF 2 と TRAF 6 の関連は今後に残された課題である。

次に，TNFα によって誘導された破骨細胞に骨吸収活性が具備されているか否かを解析した。マウス TNFα と M-CSF の存在下で破骨細胞前駆細胞を象牙切片上で培養すると，破骨細胞は誘導されたが吸収窩は形成されなかった。吸収窩は，TNFα と IL-1 を同時に添加したときのみ象牙切片上に形成された[36]。以上の知見より，マウス TNFα は破骨細胞の分化を促進するが，破骨細胞の活性化を誘導しないこと，一方 IL-1 は，破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を直接促進しないが，形成された破骨細胞の骨吸収活性を誘導することが明らかにされた（図 5）。このことから，

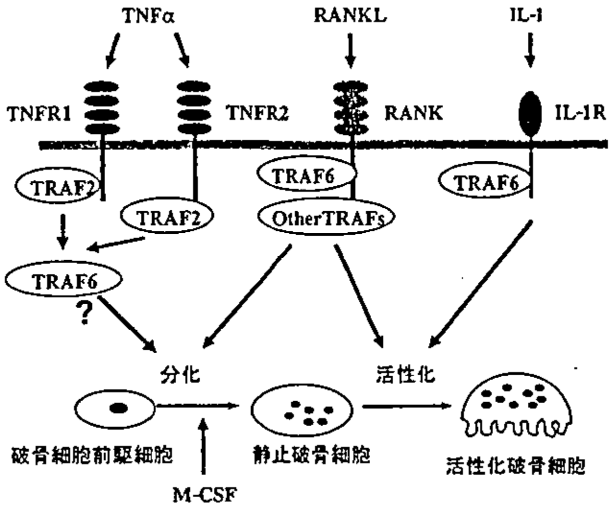


図 5 破骨細胞の分化と機能を調節する TNFα, RANKL および IL-1 の受容体とそれらのシグナル伝達

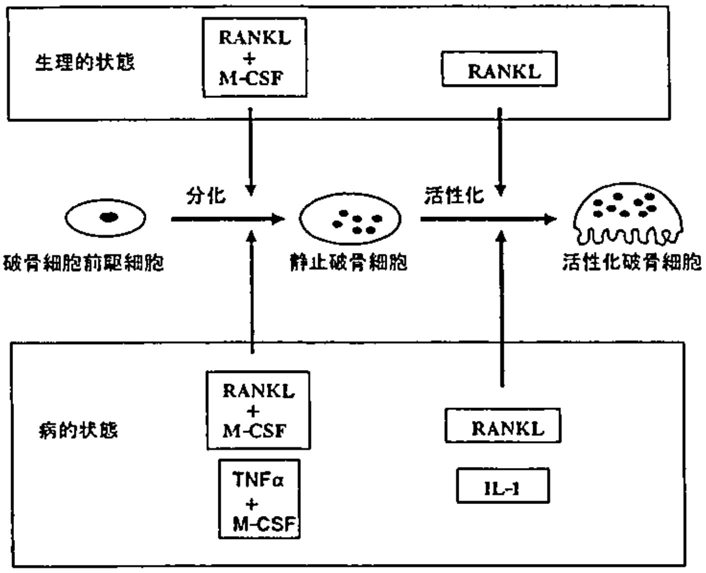


図 6 生理的骨吸収と病的骨吸収に関与するサイトカイン
生理的状態における破骨細胞の分化と活性化には RANKL を介した経路が主役を演ずるが，病的状態では RANKL を介した経路と，RANKL を介さない TNFα による破骨細胞の分化の促進と IL-1 による活性化の促進の関与が考えられる。病的骨吸収における RANKL を介した経路と介さない経路の寄与率は現在のところ不明である。

破骨細胞の機能発現には TRAF 6 が必須であることがわかる。

Pacifici らは，閉経後のエストロゲン欠乏は T リンパ球による TNFα の産生亢進を介して骨吸収亢進を惹起するという実験結果を報告した[54,55]。すなわち，卵巣摘出術を行ったマウス骨髄においては TNF を産生する T リンパ球の数が有意に増加すること，T リンパ球が欠如しているヌードマウスあるいは TNF I 型受

容体遺伝子欠損マウスにおいては卵巣摘出術による骨量減少が認められないという興味深い結果である。以上の結果は，エストロゲン欠乏による骨破壊にもTリンパ球による TNF 産生が密接に関与している可能性を示している。

VII. おわりに

1997年のOPGの発見とそれに続く1998年の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りつつある。さらに，RA や歯周疾患の発症に関与するさまざま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ベールも剝がされつつある。また，RANKL と RANK の遺伝子欠損マウスが作製され，これらのマウスがともに大理石骨病を呈することが示され，少なくとも生理的骨吸収では RANK を介するシグナル伝達系が主要な役割を果たすことが示唆されている（図6)。

一方，炎症性サイトカインである TNFα と IL-1 は RANKL 系を介さずにそれぞれ破骨細胞の分化と機能を促進する。とくに，TNFα については，リウマチ患者に対する TNF 抗体の投与が関節破壊を著明に改善したという臨床知見が欧米と日本で相次いで報告されている。したがって，RA をはじめとする炎症性骨吸収の亢進には TNF をはじめとする炎症性サイトカインの関与が示唆される（図6)。

さらに，国立相模原病院臨床研究センターの越智ら[56,57]は，RA 患者の滑膜組織由来の線維芽細胞であるナース細胞が細胞間接触によってBリンパ球の生存を支持する活性を有し，破骨細胞の分化を促進することを報告している。これらの実験成績は，骨芽細胞と同様に RA 由来のナース細胞も破骨細胞の形成に関与している可能性を示唆する。

この数年にわたる骨吸収機構に及ぼす各種新規サイトカインの発見は，破骨細胞による骨吸収のしくみの分子レベルでの理解に大きく貢献した。これらの研究の発展が RA の新しい治療方針の確立や治療薬の開発につながることを期待したい。

文　献

1) Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N et al : Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. Endocrinology 123 : 2600-2602, 1988
2) Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T et al : Origin of osteoclasts : mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. Proc Natl Acad Sci USA 87 : 7260-7264, 1990
3) Suda T, Takahashi N, Martin TJ : Modulation of osteoclast differentiation. Endocr Rev 13 : 66-80, 1992
4) 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
5) Wong BR, Rho J, Arron J et al : TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. J Biol Chem 272 : 25190-25194, 1997
6) 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
7) 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, 1997
8) 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
9) Kotake S, Higaki M, Sato K et al : Detection of myeloid precursors (granulocyte/macrophage colony forming units) in the bone marrow adjacent to rheumatoid arthritis joints. J Rheumatol 19 : 1511-1516, 1992
10) Kotake S, Sato K, Kim KJ et al : Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. J Bone Miner Res 11 : 88-95, 1996
11) The American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature : Proposed standard nomenclature for new tumor necrosisi factor family members involved in the regulation of bone resorption. J Bone Miner Res 15 : 2293-2296, 2000
12) Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N et al : Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. Biochem Biophys Res Commun 246 : 199-204, 1998
13) Quinn JM, Elliott J, Gillespie MT et al : A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast for-

mation in vitro. Endocrinology 139 : 4424-4427, 1998

14) Broxmeyer HE : Is interleukin 17, an inducible cytokine that stimulates production of other cytokines, merely a redundant player in a sea of other biomolecules? J Exp Med 183 : 2411-2415, 1996
15) Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG et al : CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. J Immunol 150 : 5445-5456, 1993
16) Kennedy J, Rossi DL, Zurawski SM et al : Mouse IL-17 : a cytokine preferentially expressed by $\alpha\beta$TCR$^+$ CD4$^-$CD8$^-$ T cells. J Interferon Cytokine Res 16 : 611-617, 1996
17) Kotake S, Udagawa N, Takahashi N et al : IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. J Clin Invest 103 : 1345-1352, 1999
18) Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL et al : Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th 2 cytokines. J Immunol 161 : 409-414, 1998
19) Chabaud M, Durand JM, Buchs N et al : Human interleukin-17 : A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. Arthritis Rheum 42 : 963-970, 1999
20) Lubberts E, Joosten LA, Chabaud M et al : IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion. J Clin Invest 105 : 1697-1710, 2000
21) Jovanovic DV, Martel-Pelletier J, Di Battista JA et al : Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages : a possible role in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 43 : 1134-1144, 2000
22) Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J et al : IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-β and TNF-α, by human macrophages. J Immunol 160 : 3513-3521, 1998
23) Ziolkowska M, Koc A, Luszczykiewicz G et al : High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients : IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. J Immunol 164 : 2832-2838, 2000
24) 小竹 茂, 鎌谷直之：慢性関節リウマチにおける IL-17. 炎症・再生 21 : 185-192, 2001
25) Kong YY, Feige U, Sarosi I et al : Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. Nature 402 : 304-309, 1999
26) Gravallese EM, Manning C, Tsay A et al : Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. Arthritis Rheum 43 : 250-258, 2000
27) Takayanagi H, Iizuka H, Juji T et al : Involvement of receptor activator of nuclear factorκB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 43 : 259-269, 2000
28) Romas E, Bakharevski O, Hards DK et al : Expression of osteoclast differentiation factor at sites of bone erosion in collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum 43 : 821-826, 2000
29) Shigeyama Y, Pap T, Kunzler P et al : Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 43 : 2523-2530, 2000
30) Kotake S, Udagawa N, Hakoda M 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
31) Horwood NJ, Kartsogiannis V, Quinn JM et al : Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. Biochem Biophys Res Commun 265 : 144-150, 1999
32) Pettit AR, Ji H, von Stechow D 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
33) Teng YT, Nguyen H, Gao X et al : Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. J Clin Invest 106 : R 59-67, 2000
34) Tamura T, Udagawa N, Takahashi N et al : Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. Proc Natl Acad Sci USA 90 : 11924-11928, 1993
35) Udagawa N, Takahashi N, Katagiri T et al : Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. J Exp Med 182 : 1461-1468, 1995
36) Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E et al : Tumor necrosis factorα stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. J Exp Med 191 : 275-86, 2000
37) Matsumoto M, Sudo T, Maruyama M et al : Activation of p 38 mitogen-activated protein kinase is crucial in osteoclastogenesis induced by tumor necrosis factor. FEBS Lett 486 : 23-28,

2000
38) Quinn JM, Itoh K, Udagawa N et al : Transforming growth factor β affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. J Bone Miner Res 16 : 1787-1794, 2001
39) Kaji K, Katogi R, Azuma Y et al : Tumor necrosis factorα-induced osteoclastogenesis requires tumor necrosis factor receptor-associated factor 6. J Bone Miner Res 16 : 1593-1599, 2001
40) Jimi E, Nakamura I, Duong LT et al : Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. Exp Cell Res 247 : 84-93, 1999
41) Juji T, Aoki K, Horie D et al : A novel therapeutic vaccine that prevents pathological bone destruction in models of osteoporosis and RA. J Bone Miner Res 16(suppl 1) : S 150, 2001
42) Chambers TJ, Owens JM, Hattersley G et al : Generation of osteoclast-inductive and osteoclastogenic cell lines from the H-2 KbtsA 58 transgenic mouse. Proc Natl Acad Sci USA 90 : 5578-5582, 1993
43) Owens JM, Gallagher AC, Chambers TJ : Bone cells required for osteoclastic resorption but not for osteoclastic differentiation. Biochem Biophys Res Commun 222 : 225-229, 1996
44) Udagawa N, Horwood NJ, Elliott J et al : Interleukin-18 (interferon-γ-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. J Exp Med 185 : 1005-1012, 1997
45) Horwood NJ, Udagawa N, Elliott J et al : Interleukin 18 inhibits osteoclast formation via T cell production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor. J Clin Invest, 101 : 595-603, 1998
46) Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ et al : IL-12 alone and in synergy with IL-18 inhibits osteoclast formation in vitro. J Immunol 166 : 4915-4921, 2001
47) Makiishi-Shimobayashi C, Tsujimura T, Iwasaki T et al : Interleukin-18 up-regulates osteoprotegerin expression in stromal/osteoblastic cells. Biochem Biophys Res Commun 281 : 361-366, 2001
48) Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL et al : A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. J Clin Invest 104 : 1393-1401, 1999
49) Nakata A, Tsujimura T, Sugihara A et al : Inhibition by interleukin 18 of osteolytic bone metastasis by human breast cancer cells. Anticancer Res 19 : 4131-4138, 1999
50) Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S et al : T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-γ. Nature 408 : 600-605, 2000
51) Naito A, Azuma S, Tanaka S et al : Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. Genes Cells 4 : 353-362, 1999
52) Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I et al : TRAF 6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD 40, and LPS signaling. Genes Dev 13 : 1015-1024, 1999
53) Vermeire K, Heremans H, Vandeputte M et al : Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. J Immunol 158 : 5507-5513, 1997
54) Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C et al : Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-α. J Clin Invest 106 : 1229-1237, 2000
55) Roggia C, Gao Y, Cenci S et al : Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow : A key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 98 : 13960-1395, 2001
56) Takeuchi E, Tomita T, Toyosaki-Maeda T et al : Establishment and characterization of nurse cell-like stromal cell lines from synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 42 : 221-228, 1999
57) Toyosaki-Maeda T, Takano H, Tomita T et al : Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells : two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines. Arthritis Res 3 : 306-310, 2001

著者紹介：宇田川信之教授
1987 年　松本歯科大学歯学部卒業
1987 年　同大歯科病院第 2 口腔外科学　前期助手
1992 年　昭和大学大学院歯学研究科口腔生化学修了
1992 年　同大歯学部生化学教室　助手
1994 年　メルボルン大セントビンセント医学研究所　CR Roper Research Fellew
1996 年　昭和大学歯学部生化学教室　講師
2001 年　松本歯科大学生化学教室　教授
主要研究テーマ：破骨細胞の起源，破骨細胞の分化を制御するサイトカインの役割

XV

特　　論

破骨細胞の分化と機能発現におけるRANKL (receptor activator of NF-κB ligand)の役割

Possible role of receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) in osteoclast differentiation and function

宇田川信之[1]　高橋直之[2]

Key words: 破骨細胞，骨芽細胞，マクロファージ，慢性関節リウマチ，歯周疾患

はじめに

近年，世界的規模で高齢化社会への移行が進んでいる．我が国でも高齢化社会への移行につれて，骨粗鬆症を含めた老人性疾患の急増が社会的な問題になりつつある．そのため，本疾患の発症機構の解明と治療薬の開発が社会的に強く要望されている．骨粗鬆症は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスが負に傾くために骨量が減少する疾患として知られている．一方，歯周疾患や慢性関節リウマチをはじめとする炎症性骨吸収の原因とされているのは，局所における破骨細胞による骨吸収の亢進である．

1998年のRANKLの発見により，破骨細胞による骨吸収のしくみの分子レベルでの解明は著しく発展した[1]．本稿では，RANKLに関する最近の知見について著者らの研究成果を中心に概説したい．

1. 骨芽細胞とTリンパ球における破骨細胞分化因子(RANKL/ODF)の発現様式の違い

造血細胞から破骨細胞への分化過程には，各種骨吸収因子によって骨芽細胞の細胞膜上に誘導されるRANKLと骨芽細胞によって分泌されるM-CSFの関与が必須であることが明らかにされた．一方，骨芽細胞が産生するOPGはRANKLに直接結合することにより，RANKLのデコイ受容体としてRANKLの作用をブロックすることも明らかとなった．また，OPGの発現は多くの組織において強く認められ，OPGの血清レベルは加齢とともに上昇することも報告されている．

まず初めに，骨芽細胞由来のRANKLが可溶性となり破骨細胞形成に関与している可能性を検討する実験を行った．OPGが可溶性RANKLの作用を中和している可能性が考えられるので，OPG遺伝子欠損マウスから骨芽細胞を採取して，OPG欠損マウスの骨髄細胞と共存培養を行い破骨細胞の分化を観察した．dishの一部分にOPG欠損マウス由来の骨芽細胞を培養し，同一dish上で血液細胞が骨芽細胞と接する部分と接しない部分における破骨細胞分化をビタミンDとM-CSFの存在下で検討した．その結果，TRAP陽性の破骨細胞は骨芽細胞に接触する部分でのみ形成され，その外側の部分ではマクロファージの増殖のみが認められ，破骨細胞は全く誘導されなかった(図1)[2]．また，ELISA法を用いて骨芽細胞の培養上清中における可溶

[1]Nobuyuki Udagawa: Department of Biochemistry, Matsumoto Dental University 松本歯科大学生化学 [2]Naoyuki Takahashi: Division of Molecular Cell Biology, Institute for Dental Science 同総合歯科医学研究所機能解析学

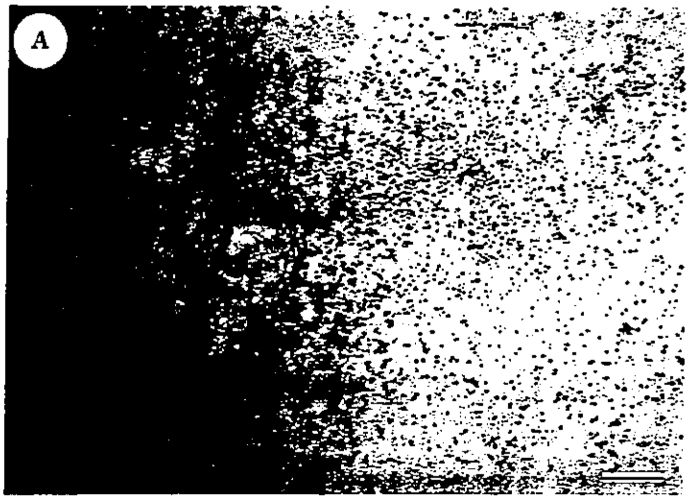


図1　骨芽細胞が支持する破骨細胞の分化(文献[3])
培養dishの一部分にOPG欠損マウス由来の骨芽細胞を培養し，同一dish上で血液細胞が骨芽細胞と接する部分(inside)と接しない部分(outside)における破骨細胞分化をビタミンDとM-CSFの存在下で検討した．1週間後，TRAP陽性の破骨細胞は骨芽細胞に接触する部分でのみ形成され，その外側の部分ではマクロファージの増殖のみが認められた．

性RANKL濃度を測定したが，検出することはできなかった．

以上の結果より，骨芽細胞においてはRANKLは細胞膜に結合した様式で発現し，破骨細胞の分化に関与している可能性が示された．一方，CD3およびCD28抗体で刺激した活性化Tリンパ球を骨髄細胞とともにM-CSFの存在下で培養すると，メンブランフィルターを用いて両者の細胞の直接接触を阻止した条件下で，少数ながらTRAP陽性の単核破骨細胞が誘導された．以上の結果は，活性化Tリンパ球は可溶性のRANKLを産生し，直接破骨細胞の分化を促進する可能性を示している．

2. 慢性関節リウマチ(RA)患者の関節滑膜組織におけるRANKLの発現

RA患者の関節滑膜組織におけるRANKL mRNA発現を *in situ* hybridization法を用いて観察した．その結果，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 mRNAおよび蛋白の発現が認められた．また，RA患者の関節液中の可溶性RANKL濃度をELISA法を用いて測定(東京女子医大　小竹　茂博士および愛知学院大　茂木真希雄博士との共同研究)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濃度の比は高値を示した(図2)[3]．このようなRANKLとOPGの相対比の上昇が，慢性関節リウマチにおける骨破壊を惹起している可能性が示された．

以上の結果を支持する *in vivo* の実験結果として，Amgen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骨病変を示すことを報告した[4]．また，リウマ

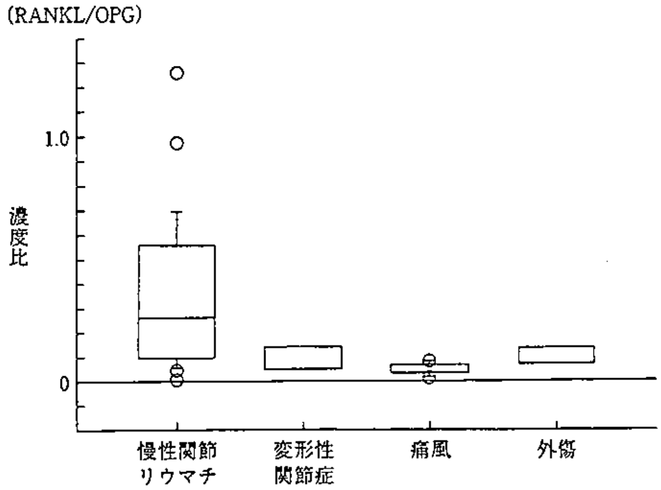


図2 各種関節疾患患者の関節液におけるRANKL濃度のOPG濃度に対する比(文献[3])

慢性関節リウマチ患者の関節液では，RANKL濃度のOPG濃度に対する比が変形性関節症(p=0.048)あるいは痛風患者(p=0.0026)と比較して有意に高値であった．

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が明らかとなった．彼らは，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の歯槽骨吸収には，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を発表した[5]．

また，慢性関節リウマチ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，IL-17，TNFα，IL-1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[6]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[7,8]もあり，リウマチ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．

一方，東京大学医学部の高柳らは，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た[9]．その結果によると，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)の分解を介してRANKLシグナルを抑制する機構を有するとしている．したがって，TRAF6の機能や発現の抑制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．

3. p38 MAP kinaseシグナルの破骨細胞分化における重要性

RANKLはマクロファージ系の破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化を誘導するとともに，成熟破骨細胞の骨吸収活性にも必須である．そこで，破骨細胞の分化と骨吸収機能発現におけるp38 MAP kinaseの役割を検討することを目的に実験を行った[10]．p38 MAP kinaseは，JNKやERKとともにMAP kinaseに分類されるセリンスレオニンキナーゼで，胚発生や細胞周期の制御そして細胞の増殖と分化といった生体の基本現象において重要な役割を果たしている．まず初めに，破骨細胞の分化におけるp38 MAP kinaseの特異的阻害剤(SB203580)の効果を検討した．マウスの骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系において活性型ビタミンDによって誘導

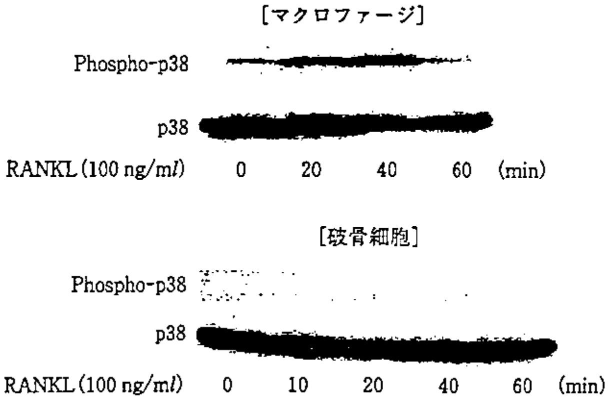


図3 骨髄マクロファージおよび破骨細胞におけるRANKL誘導性のp38 MAP kinaseのリン酸化(文献[10])

される破骨細胞の分化は，SBコンパウンドの添加によって強力に阻害された．しかし，骨芽細胞においてビタミンDによって促進されるRANKL mRNA発現に対してはSBコンパウンドは何ら影響を与えなかった．以上の結果から，p38 MAP kinase阻害剤は破骨細胞前駆細胞に直接作用することにより破骨細胞の分化を抑制することが明らかとなった[10]．

次に，成熟破骨細胞の生存に対するSBコンパウンドの効果を検討した．純化した破骨細胞は，骨芽細胞が存在しない条件では急速に死に至る．RANKLまたはM-CSFはこれらの破骨細胞の生存を維持する活性を有しているが，SBコンパウンドはRANKLまたはM-CSFによって誘導される破骨細胞の生存を阻害しなかった．同様に，破骨細胞による吸収窩形成はカルシトニン処理によって強力に阻害されたが，SBコンパウンドの添加によっては全く抑制されなかった．また，マウス長管骨においてPTHで促進される骨吸収活性に対しても，SBコンパウンドは全く効果を示さなかった[10]．

前述したように，破骨細胞の分化と成熟破骨細胞の機能発現は共にRANKLを介して行われている．しかしながら，p38 MAP kinaseの特異的阻害剤は成熟破骨細胞の機能発現に対しては何ら効果を示さなかった．そこで，破骨細胞前駆細胞と純化した破骨細胞におけるp38 MAP kinaseのリン酸化をリン酸化特異的抗体を用いたWestern blotting法で検討した．破骨細胞前駆細胞としてはマウス骨髄細胞をM-CSFで3日間処理した骨髄マクロファージを用いた．その結果，骨髄マクロファージにRANKL処理を行うことによりp38 MAP kinaseのリン酸化は強力に促進され，40分でMax.を示した．一方，破骨細胞においてはRANKL誘導性のp38 MAP kinaseのリン酸化は全く認められなかった(図3)．

更に，各種サイトカインの純化破骨細胞の生存とp38 MAP kinaseのリン酸化に対する効果を検討した．RANKLと同様に，TNFα，IL-1，LPSは破骨細胞の生存を促進する活性を有しているが，これらの因子による破骨細胞の生存に対してはSBコンパウンドは何ら効果を示さなかった．また，骨髄マクロファージにおいては，RANKL，TNFα，IL-1，LPSはp38 MAP kinaseのリン酸化を強く促進したが，純化破骨細胞においてはこれらの因子を処理しても，p38 MAP kinaseのリン酸化は全く誘導されなかった[10]．

RANKL，TNFα，IL-1，LPSなどの刺激は，JNK，ERK，p38という3種類のMAP kinaseのリン酸化を促進することが知られている．また，p38のリン酸化はMKK3/6を介して行われ，その下流では核内転写因子であるATF2のリン酸化が認められる．一方，MAP kinaseのシグナルとは独立してNF-κBの活性化経路が存在す

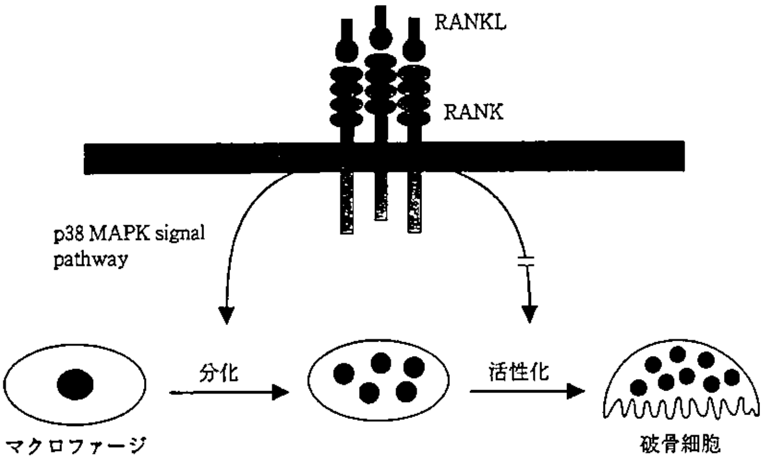


図4 p38 MAP kinaseシグナルの破骨細胞分化における重要性(文献[10])

る．骨髄マクロファージにおいて，LPSはp38 MAP kinaseのリン酸化と同様に，MKK3/6とATF2のリン酸化を促進した．これらのリン酸化誘導は破骨細胞においては全く認められなかった．また，ERKのリン酸化はマクロファージと同様に破骨細胞においても強く認められた．更に，LPSはマクロファージと同様に破骨細胞におけるNF-κBの活性化を誘導した．

以上の実験結果から，p38 MAP kinaseのリン酸化は破骨細胞の分化に必須のシグナルであるが，分化した破骨細胞においてはp38のシグナル伝達系が作動しないように調節されていることが示された(図4)[10]．

4. LPS(リポ多糖)の破骨細胞分化と機能発現に対する作用

LPS(リポ多糖)はグラム陰性菌外膜の構成成分で歯周病の原因の一つと考えられている．LPSは血清中のLPS結合蛋白と結合した後，血清中のCD14と結合することが確認された．しかしながら，CD14は細胞内ドメインをもたないため，LPSのシグナルを細胞内に伝達することはできない．そのためLPSのシグナルを伝達するLPSの受容体の解明が待たれていた．近年，LPSの受容体としてToll-like receptor 4(TLR4)が同定された．LPSはマクロファージに作用して各種の炎症性サイトカイン産生を促すことが知られている．一方，血球系単核マクロファージから分化してくる破骨細胞へのLPSの効果についてはいまだ不明である．

破骨細胞におけるLPSの受容体の発現について検討した．その結果，TLR4およびCD14 mRNAの発現は骨芽細胞，骨髄マクロファージのみならず，破骨細胞においても確認できた．そこでまず初めに，LPSの破骨細胞分化に対する効果を検討した．LPSは共存培養系における破骨細胞形成を促進し，それはOPGの添加により完全に抑制された．また，LPSは骨芽細胞におけるRANKL mRNA発現を時間依存的に上昇させた．この発現上昇はNS398(COX2阻害剤)により抑制され，共存培養における破骨細胞分化も完全に阻害された[11]．

前述のように，LPSは破骨細胞に直接作用することにより，成熟破骨細胞の延命を促進する．このLPSによる破骨細胞の延命効果がTLR4を介しているかを検討するために，TLR4に点変異を有するLPS低反応性のC3H/HeJマウスを用いて実験を行った．C3H/HeJマウスおよびコントロールマウスとしてC3H/HeNマウス由来の骨髄細胞から誘導した各々の破骨細胞におけるIL-1，LPSの延命効果について検討した．その結果，IL-1処理による延命効果はHeJ，

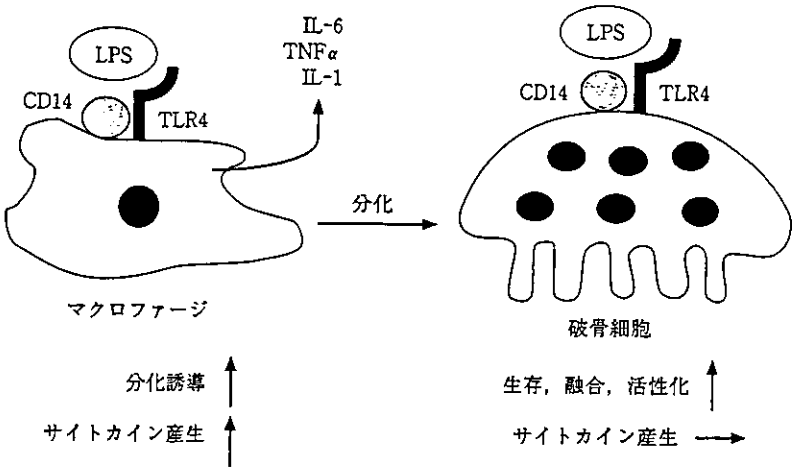


図5 LPS(リポ多糖)の破骨細胞分化と機能発現に対する作用(文献[12])

HeN両マウスにおいて認められたが，LPSの延命効果はHeJマウスでは全く認められなかった．また，LPSによる破骨細胞の延命効果は，OPGまたはIL-1中和抗体の添加によっても抑制されず，TNF受容体欠損マウスから誘導した破骨細胞を用いた実験でもLPSはRANKL同様延命効果を示さなかった[12]．

LPSのマクロファージに対する作用として各種炎症性サイトカインの産生がある．そこで，単核マクロファージから分化する破骨細胞におけるサイトカインの産生を検討した．破骨細胞を含む細胞群にLPSを24時間処理した後，IL-1βの特異抗体を用いた免疫染色を行ったところ，単核マクロファージはIL-1βの発現が認められたが，多核破骨細胞においてはIL-1βの産生は全く認められなかった．更に，それぞれの細胞の培養上清中におけるIL-1β，TNFおよびIL-6の分泌についてELISA法を用いて検討した．その結果，IL-1βとTNFの両サイトカインは，腹腔マクロファージと骨髄マクロファージにおいてLPSの処理後に産生誘導が認められたが，破骨細胞による産生は全く認められなかった．破骨細胞においては，IL-6の産生促進は恒常的に認められ，マクロファージにみられるLPSによる産生誘導は認められなかった[12]．

以上まとめると，破骨細胞の分化に対して，LPSはRANKL発現を介する促進作用を示すことが明らかとなった．また，成熟破骨細胞においてもLPS受容体が認められ，LPSが破骨細胞のTLR4を介して直接その延命を促進していることが示された(図5)[12]．一方，マクロファージにみられるLPS刺激によるサイトカイン産生誘導は破骨細胞では全く認められなかった．このように破骨細胞はマクロファージ由来の細胞でありながら，サイトカイン産生能をもたない非炎症性細胞に分類されると考えられる．このLPSに対する両細胞の反応性の差異は，p38 MAP kinaseのシグナル伝達の差異に起因する可能性も考えられる．

おわりに

1997年のOPGの発見とそれに続く1998年のRANKLの発見により，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りつつある．更に，慢性関節リウマチ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ベールも剥がされてきた．今後の発展が楽しみである．

■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) Udagawa N, et al: Osteoprotegerin(OPG) produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. Endocrinology 141: 3478-3484, 2000.
3) Kotake S, et al: Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes. Arthritis Rheum 44: 1003-1012, 2001.
4) Kong Y-Y, et al: OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature 397: 315-323, 1999.
5) Teng Y-TA, et al: Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. J Clin Invest 106: R59-R67, 2000.
6) Kotake S, et al: IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. J Clin Invest 103: 1345-1352, 1999.
7) Jimi E, et al: Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. J Immunol 163: 434-442, 1999.
8) Kobayashi K, et al: Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. J Exp Med 191: 275-286, 2000.
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) 李 小丹ほか：破骨細胞の分化と機能を調節するp38 MAP kinaseシグナル系. 日骨代謝誌 19(抄録): 46, 2001.
11) 須田幸治ほか：C3H/HeJマウス由来細胞の共存培養においてLPSは破骨細胞形成を誘導する. 日骨代謝誌 19(抄録): 100, 2001.
12) 伊藤雅波ほか：破骨細胞とその前駆細胞に対するLPSの作用は極めて異なる. 日骨代謝誌 19(抄録): 74, 2001.

破骨細胞の分化と骨吸収のメカニズム —歯周病における骨吸収機構の解明をめざして—

宇田川信之*　高橋直之**

RANKL遺伝子のクローニングにより，破骨細胞の分化と骨吸収機構の分子メカニズムが明らかになった．一方，炎症性サイトカインであるTNFとIL-1はRANKL系を介さずにそれぞれ破骨細胞の分化と機能を制御している．歯周疾患や慢性関節リウマチにおいて認められる局所的な骨吸収の亢進には，これらの炎症性サイトカインおよびRANKLのシグナル伝達が複雑に関与していることが明らかになってきた．

はじめに

近年，世界的規模で高齢化社会への移行が進んでいる．わが国でも高齢化社会への移行につれて，骨粗鬆症を含めた老人性疾患の急増が社会的な問題になりつつある．そのため，本疾患の発症機構の解明と治療薬の開発が社会的に強く要望されている．骨粗鬆症は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスが負に傾くために骨量が減少する疾患として知られている．一方，歯周疾患や慢性関節リウマチ(rheumatoid arthritis：RA)をはじめとする炎症性骨吸収の原因とされているのは，局所における破骨細胞による骨吸収の亢進である．

われわれは，これまでにマウスを用いた破骨細胞の分化・融合・活性化(機能発現)を解析する各種の細胞培養系を確立し，その解析をおこなってきた．その結果，破骨細胞の分化と機能は，骨芽細胞あるいは骨髄間質細胞の細胞膜上に発現する破骨細胞分化因子(osteoclast differentiation factor：ODF)によって厳格に調節されていることを提唱してきた[1)~3)]．ODFの同定は20世紀中には無理であると思われていたが，1997年に思いもよらない方向からその解明が進み，1998年破骨細胞分化因子(ODF/RANKL)の同定とその遺伝子クローニングという劇的な結末を迎えた[4)~8)]．

本稿では，破骨細胞の分化と骨吸収メカニズムに関する最近の知見について，われわれの研究成果を中心に概説したい．

〔キーワード〕
破骨細胞
炎症性骨吸収
LPS(リポ多糖)
p 38 MAP キナーゼ
活性化 T リンパ球

* UDAGAWA Nobuyuki/松本歯科大学生化学講座
* * TAKAHASHI Naoyuki/松本歯科大学総合歯科医学研究所機能解析学講座

1．RANKLの発見

1997年，世界の三つの研究グループ(雪印乳業，Amgen，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が発見され，そのcDNAがクローニングされた．この新規物質はtumor necrosis factor(TNF)レセプターに共通した構造を有していたが，膜貫通領域をもたない分泌性の蛋白質であった[8)]．この新規レセプター

は osteoclastogenesis inhibitory factor(OCIF), TNF レセプター1(TR 1)などともよばれていたが, その後, 骨を防御する因子として命名された osteoprotegerin(OPG)という名称を使用しようという提案が米国骨代謝学会で採択された.

つづいて 1998 年, 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型蛋白質の cDNA がクローニングされた. この分子こそ, われわれが 10 年以上追い求めてきた破骨細胞分化因子(ODF)そのものであった[4)8)]. ODF は 316 個のアミノ酸からなる膜貫通領域を有する TNF ファミリーに属する蛋白質であった. 骨芽細胞における ODF 遺伝子の発現は, 破骨細胞の分化を促進する因子である活性型ビタミン D, 副甲状腺ホルモン, インターロイキン(IL)-11 などの刺激によって著しく増強された. また, 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造血細胞だけ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[4)7)9)10)].

ODF の真のレセプターは, すでに報告されていた receptor activator of NF-κB(RANK)とよばれる TNF レセプターファミリーに属する膜結合型蛋白質であることが種々の実験により明らかになった(**図 1**). 現在, ODF は RANK リガンド(receptor activator of NF-κB ligand: RANKL)という名称で統一されつつある.

一方, OPG は RANK と構造が類似していることから"おとり受容体"(decoy receptor)としてはたらき, RANK よりもはるかに高い親和性をもって RANKL に結合することにより, RANKL の活性を強く抑制することが明らかになった[8)] (**図 1**).

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 遺伝子欠損マウスの所見[7)]より, 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明らかになり, 免疫系における RANKL の重要性が注目されている.

最近, 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 の発現を解析した実験成績があいついで報告された[11)~15)]. われわれも, *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 CD 3 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[16)]. 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になった. 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 濃度の比は有意に高値を示した[16)]. その結果, OPG に対する RANKL の相対比の上昇が, RA における骨破壊を惹起している可能性が示された. 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[11)16)17)].

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[18)]. また, Amgen のグループ[11)]は, T リンパ球が恒常的に活性化されている ctla 4 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

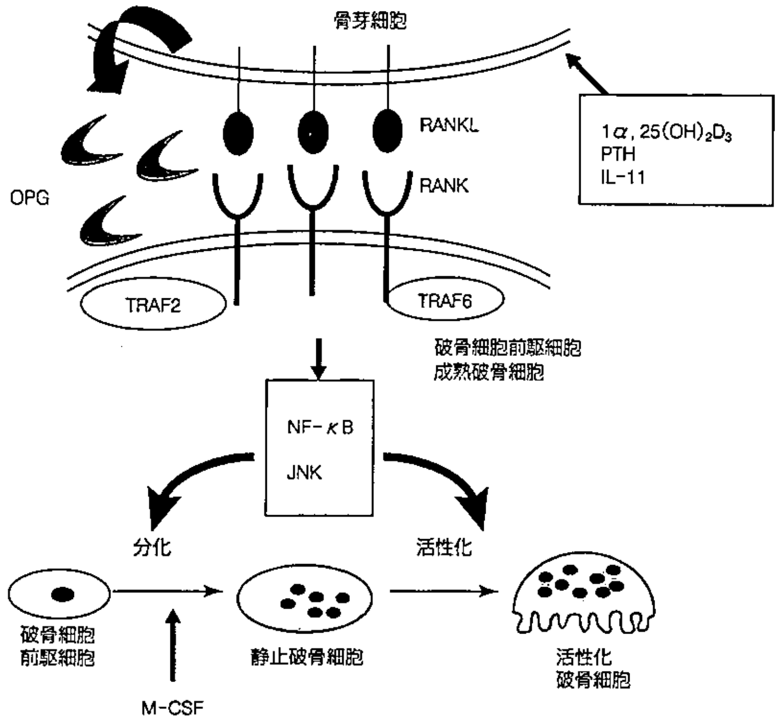


図 1. 破骨細胞形成の分子機構
活性型ビタミンD〔1α, $25(OH)_2D_3$〕, 副甲状腺ホルモン(PTH), IL-11などの骨吸収促進因子の刺激により骨芽細胞の細胞膜上に発現誘導されるRANKLを, 破骨細胞前駆細胞または破骨細胞のRANKが認識することによって, TRAFを介したシグナル伝達により破骨細胞の分化と活性化がおこなわれる. TRAFを介したシグナル伝達にはNF-κBとJNKが関与する. OPGはRANKLの"おとり受容体"としてRANK以降のシグナル伝達を遮断する.

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. さらに, 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(CD 4⁺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[19].

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レセプター, IL-17, TNFα, IL-1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[8)20)~22)]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(後述)[23)24)]もあり, 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(図2).

最近, 東京大学医学部整形外科のTanakaら[25)]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. 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

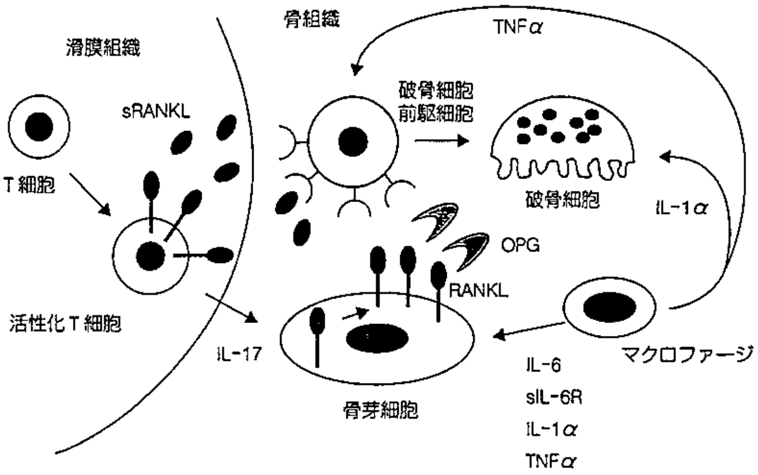


図 2. 活性化 T リンパ球の破骨細胞分化への関与
RANKL の発現が強く認められる活性化 T リンパ球は破骨細胞前駆細胞に直接作用し，破骨細胞への分化を促進する．活性化 T リンパ球によって産生される IL-17 は骨芽細胞に作用することにより RANKL の発現を誘導し，間接的に破骨細胞の分化を促進する．活性化 T リンパ球によって産生される RANKL は，骨芽細胞由来の RANKL にくらべて膜から離れやすく，可溶性 RANKL (sRANKL) になるという．

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．

3．p 38 MAP キナーゼシグナルの破骨細胞分化における重要性

RANKL はマクロファージ系の破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化を誘導するとともに，成熟破骨細胞の骨吸収活性にも必須である[8]．そこで，破骨細胞の分化と骨吸収機能発現における p 38 MAP キナーゼの役割を検討することを目的に実験をおこなった[26]．p 38 MAP キナーゼは，JNK や ERK とともに MAP キナーゼに分類されるセリンスレオニンキナーゼで，胚発生や細胞周期の制御そして細胞の増殖と分化といった生体の基本現象において重要な役割を果たしている．はじめに，破骨細胞の分化における p 38 MAP キナーゼの特異的阻害剤 (SB 203580) の効果を検討した．マウスの骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系において活性型ビタミン D によって誘導される破骨細胞の分化は，SB コンパウンドの添加によって強力に阻害された．しかし，骨芽細胞においてビタミン D によって促進される RANKL mRNA 発現に対して SB コンパウンドは何ら影響を与えなかった．以上の結果から，p 38 MAP キナーゼ阻害剤は破骨細胞前駆細胞に直接作用することにより破骨細胞の分化を抑制することが明らかになった[26]．

つぎに，成熟破骨細胞の生存に対する SB コンパウンドの効果を検討した．純化した破骨細胞は，骨芽細胞が存在しない条件では急速に死に至る．RANKL または M-CSF はこれらの破骨細胞の生存を維持する活性を有しているが，SB コンパウンドは RANKL または M-CSF によって誘導される破骨細胞の生存を阻害しなかった．同様に，破骨細胞による吸収窩形成はカルシトニン処理によって強力に阻害されたが，SB コンパウンドの添加によってはまったく抑制されなかった．また，

マウス長管骨においてPTHで促進される骨吸収活性に対しても，SBコンパウンドはまったく効果を示さなかった．

前述したように，破骨細胞の分化と成熟破骨細胞の機能発現はともにRANKLを介しておこなわれている．しかしながら，p38 MAPキナーゼの特異的阻害剤は成熟破骨細胞の機能発現に対しては何ら効果を示さなかった．そこで，破骨細胞前駆細胞と純化した破骨細胞におけるp38 MAPキナーゼのリン酸化をリン酸化特異的抗体を用いたwestern blotting法で検討した．破骨細胞前駆細胞としてはマウス骨髄細胞をM-CSFで3日間処理した骨髄マクロファージを用いた．その結果，骨髄マクロファージにRANKL処理をおこなうことによりp38 MAPキナーゼのリン酸化は強力に促進され，40分でマックスを示した．一方，破骨細胞においてはRANKL誘導性のp38 MAPキナーゼのリン酸化はまったく認められなかった[26]．

さらに，各種サイトカインの純化破骨細胞の生存とp38 MAPキナーゼのリン酸化に対する効果を検討した．RANKLと同様に，TNFα，IL-1，LPS(リポ多糖)は破骨細胞の生存を促進する活性を有しているが，これらの因子による破骨細胞の生存に対してSBコンパウンドは何ら効果を示さなかった．また，骨髄マクロファージにおいては，RANKL, TNFα, IL-1, LPSはp38 MAPキナーゼのリン酸化を強く促進したが，純化破骨細胞においてはこれらの因子を処理しても，p38 MAPキナーゼのリン酸化はまったく誘導されなかった．

RANKL, TNFα, IL-1, LPSなどの刺激は，JNK, ERK, p38という3種類のMAPキナーゼのリン酸化を促進することが知られている．また，p38のリン酸化はMKK 3/6を介しておこなわれ，その下流では核内転写因子であるATF 2のリン酸化が認められる．一方，MAPキナーゼのシグナルとは独立してNF-κBの活性化経路が存在する．骨髄マクロファージにおいて，LPSはp38 MAPキナーゼのリン酸化と同様に，MKK 3/6とATF 2のリン酸化を促進した．これらのリン酸化誘導は破骨細胞においてはまったく認められなかった．また，ERKのリン酸化はマクロファージと同様に破骨細胞においても強く認められた．さらに，LPSはマクロファージと同様に破骨細胞におけるNF-κBの活性化を誘導した[26]．

以上の実験結果から，p38 MAPキナーゼのリン酸化は破骨細胞の分化の必須シグナルであるが，分化した破骨細胞においてはp38のシグナル伝達系が作動しないように調節されていることが示された(図3)．

4．LPSの破骨細胞分化と機能発現に対する作用

LPSはグラム陰性菌外膜の構成成分で歯周病の原因の一つと考えられている．LPSは血清中のLPS結合蛋白と結合した後，血清中のCD 14と結合することが確認されてきた．しかしながら，CD 14は細胞内ドメインをもたないため，LPSのシグナルを細胞内に伝達することはできない．そのためLPSのシグナルを伝達するLPSのレセプターの解明が待たれていた．近年，LPSのレセプターとしてToll like receptor 4(TLR 4)が同定された．LPSはマクロファージに作用して各種のサイトカイン産生を促すことが知られている．一方，血球系単核マクロファージから分化してくる破骨細胞へのLPSの効果についてはいまだ不明である．

破骨細胞におけるLPSのレセプターの発現について検討した．その結果，TLR 4およびCD 14 mRNAの発現は骨芽細胞，骨髄マクロファージのみならず，破骨細胞においても確認できた．そこではじめに，LPSの破骨細胞分化に対する効果を検討した．LPSは共存培養系における破骨細胞形成を促進し，それはOPGの添加により完全に抑制された．また，LPSは骨芽細胞における