

## ■ 文 献

- 1) Takahashi N, et al: Cells of Bone: Osteoclast generation. In: Principles of Bone Biology (ed by Bilezikian JP, et al), Chapter 7, p109-126, Academic Press, San Diego, 2002.
- 2) Takami M, et al: Intracellular calcium and protein kinase C mediate expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in osteoblasts. *Endocrinology* 141: 4711-4719, 2000.
- 3) Vignery A: Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int J Exp Pathol* 81: 291-304, 2000.
- 4) Kurachi T, et al: Expression on outer membranes of mannose residues, which are involved in osteoclast formation via cellular fusion events. *J Biol Chem* 269: 17572-17576, 1994.
- 5) Huovila AP, et al: ADAMs and cell fusion. *Curr Opin Cell Biol* 8: 692-699, 1996.
- 6) Yagami HT, et al: A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature* 377: 652-656, 1995.
- 7) Abe E, et al: Meltrin- $\alpha$ , a fusion protein involved in multinucleated giant cell and osteoclast formation. *Calcif Tissue Int* 64: 508-515, 1999.
- 8) Nakamura I, et al: Echistatin inhibits the migration of murine pre-fusion osteoclasts and the formation of multinucleated osteoclast-like cells. *Endocrinology* 139: 5182-5193, 1998.
- 9) Ishida N, et al: Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J Biol Chem* 277: 41147-41156, 2002.
- 10) Takayanagi H, 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.
- 11) Horsley V, et al: IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* 113: 483-494, 2003.
- 12) Duong LT, et al: Integrin and calcitonin receptor signaling in the regulation of the cytoskeleton and function of osteoclasts. In: Principles of Bone Biology (ed by Bilezikian JP, et al), Chapter 9, p141-150, Academic Press, San Diego, 2002.
- 13) Lakkakorpi PT, et al: PYK2 autophosphorylation, but not kinase activity, is necessary for adhesion-induced association with c-Src, osteoclast spreading, and bone resorption. *J Biol Chem* 278: 11502-11512, 2003.
- 14) Biskobing DM, Fan D: Acid pH increases carbonic anhydrase II and calcitonin receptor mRNA expression in mature osteoclasts. *Calcif Tissue Int* 67: 178-183, 2000.
- 15) Teti A, et al: Extracellular protons acidify osteoclasts, reduce cytosolic calcium, and promote expression of cell-matrix attachment structures. *J Clin Invest* 84: 773-780, 1989.
- 16) Arnett TR, Dempster DW: Effect of pH on bone resorption by rat osteoclasts in vitro. *Endocrinology* 119: 119-124, 1986.
- 17) Nakamura I, et al: Lack of vacuolar proton ATPase association with the cytoskeleton in osteoclasts of osteosclerotic (oc/oc) mice. *FEBS Lett* 401: 207-212, 1997.
- 18) Toyomura T, et al: Three subunit  $\alpha$  isoforms of mouse vacuolar H(+)-ATPase. Preferential expression of the  $\alpha 3$  isoform during osteoclast differentiation. *J Biol Chem* 275: 8760-8765, 2000.
- 19) Sahara T, et al: Specific biological functions of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase and lysosomal cysteine proteinase, cathepsin K, in osteoclasts. *Anat Rec* 270: 152-161, 2003.
- 20) Väänänen K, Zhao H: Osteoclast function: Biology and mechanisms. In: Principles of Bone Biology (ed by Bilezikian JP, et al), Chapter 8, p127-140, Academic Press, San Diego, 2002.
- 21) Mulari MT, et al: Osteoclast ruffled border has distinct subdomains for secretion and degraded matrix uptake. *Traffic* 4: 113-125, 2003.

日本臨牀 62 卷 増刊号 2 (2004 年 2 月 28 日発行) 別刷

# 骨粗鬆症学

—基礎・臨床研究の新しいパラダイム—

## 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

宇田川信之<sup>1</sup> 中村美どり<sup>2</sup> 高橋直之<sup>3</sup>

## 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<sup>1</sup> 中村美どり<sup>2</sup> 高橋直之<sup>3</sup>

**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- $\kappa$ 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<sup>1</sup>. 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<sup>1</sup>.

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<sup>2</sup>. 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<sup>2</sup>.

ODFの真の受容体は, 既に報告されていたRANK(receptor activator of NF- $\kappa$ 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<sup>1</sup>(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<sup>1</sup>(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<sup>3</sup>.

#### 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<sup>3</sup>.

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

<sup>1</sup>Nobuyuki Udagawa: Department of Biochemistry, Matsumoto Dental University 松本歯科大学 松本歯科大学 松本歯科大学 松本歯科大学 松本歯科大学 <sup>2</sup>Midori Nakamura: Department of Pediatric Dentistry 同小児歯科学 <sup>3</sup>Naoyuki 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

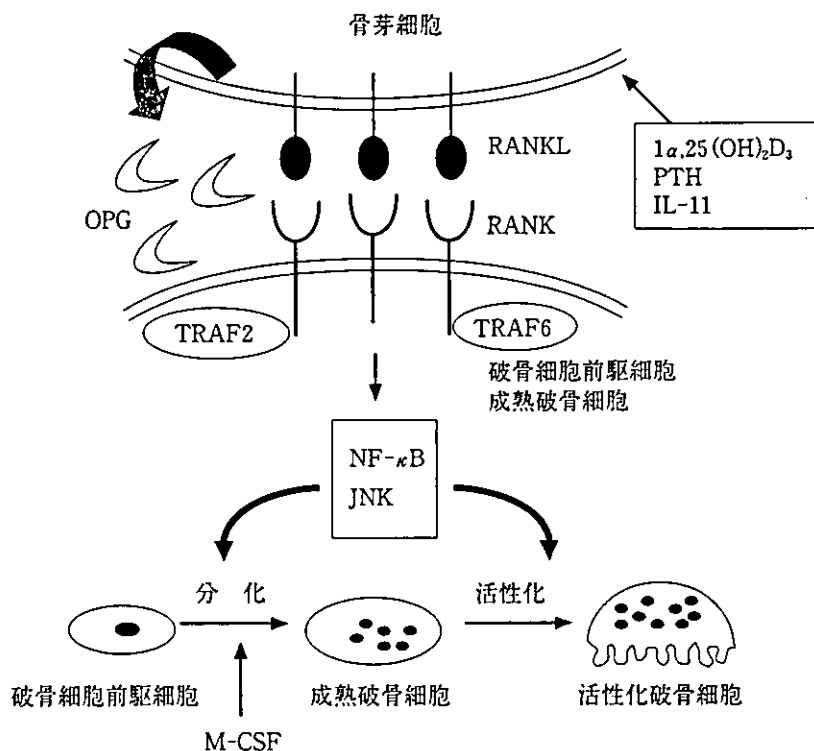


図1 破骨細胞形成の分子機構

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<sup>4)</sup>。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<sup>4)</sup>。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<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>。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<sup>+</sup>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<sup>7)</sup>。

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 $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 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

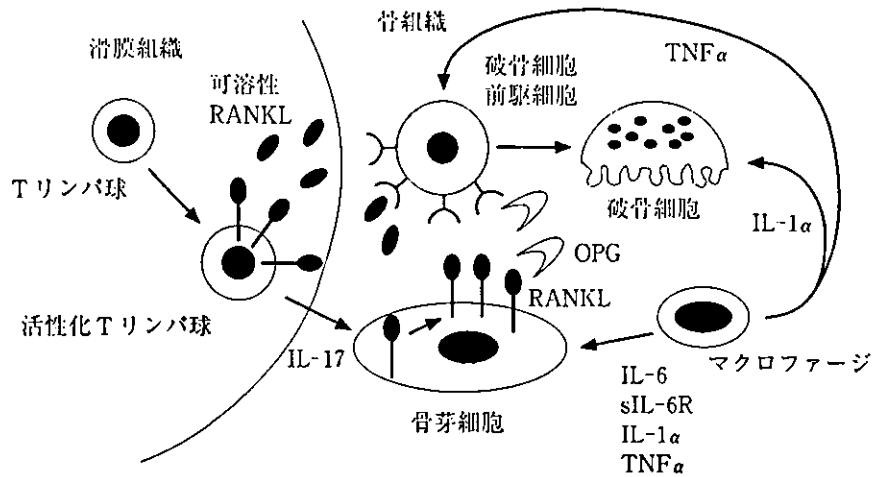


図2 活性化Tリンパ球の破骨細胞分化への関与

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<sup>1)</sup>(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<sup>8)</sup>。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<sup>9)</sup>は、活性化Tリンパ球はIFN- $\gamma$ 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- $\gamma$ 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<sup>9)</sup>。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- $\gamma$ 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

- $\beta$ 発現を促進し、更にIFN- $\beta$ 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<sup>10)</sup>。IFN- $\beta$ 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- $\kappa$ 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の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<sup>11,12)</sup>。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<sup>11)</sup>。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<sup>13)</sup>。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<sup>13)</sup>。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

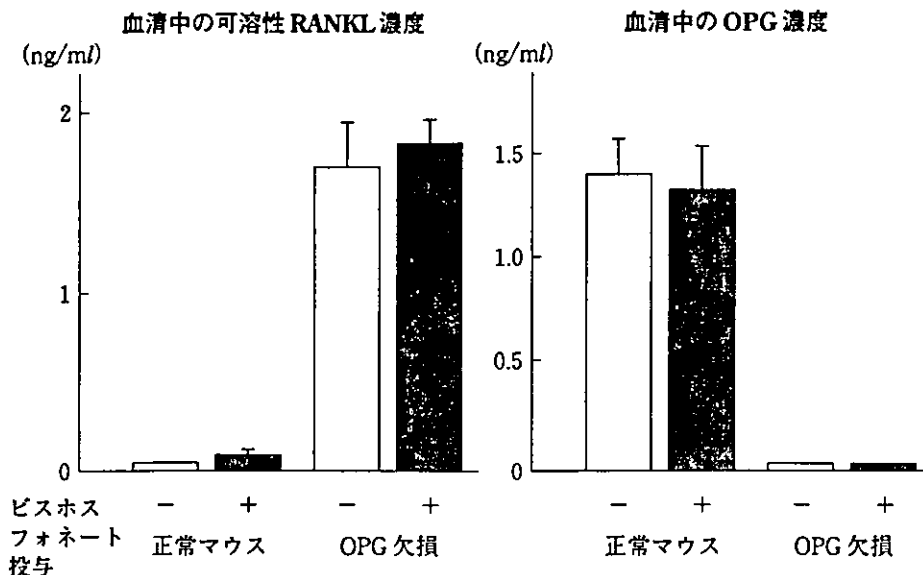


図3 OPG 遺伝子欠損マウスにおける血清中の可溶性 RANKL 産生亢進

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<sup>14)</sup>。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<sup>14)</sup>。

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<sup>15)</sup>。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<sup>15)</sup>。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<sup>15)</sup>(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<sup>15)</sup>。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ベ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- $\gamma$ . *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.

# カレントセラピー

別刷

月刊カレントセラピー [別刷] 2004 VOL.22 NO.3 **3**月号



# 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- $\kappa$ B ligand) が発見され、骨吸収の調節機構が明らかにされた<sup>1)~4)</sup>。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<sup>5), 6)</sup>。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)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (1,25-dihydroxyvitaminD<sub>3</sub>)、PTH (parathyroid hormone)、PGE<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>)、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<sup>7)</sup>。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

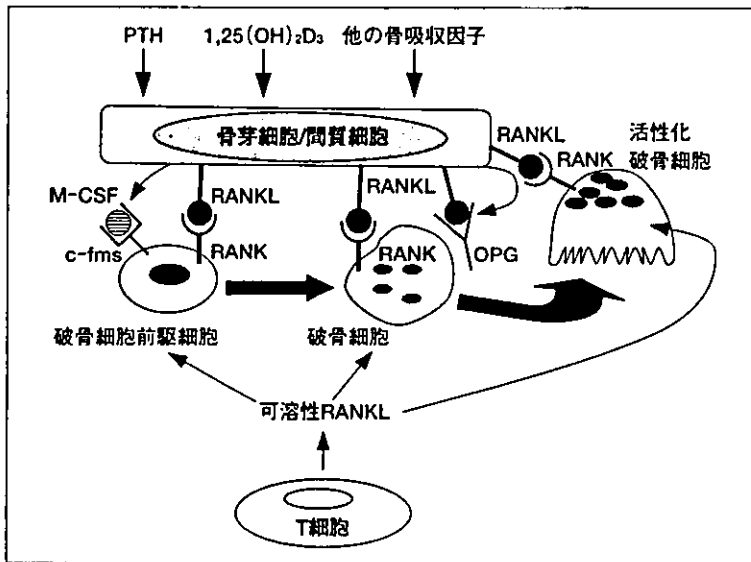


図1 骨吸収を促進する因子

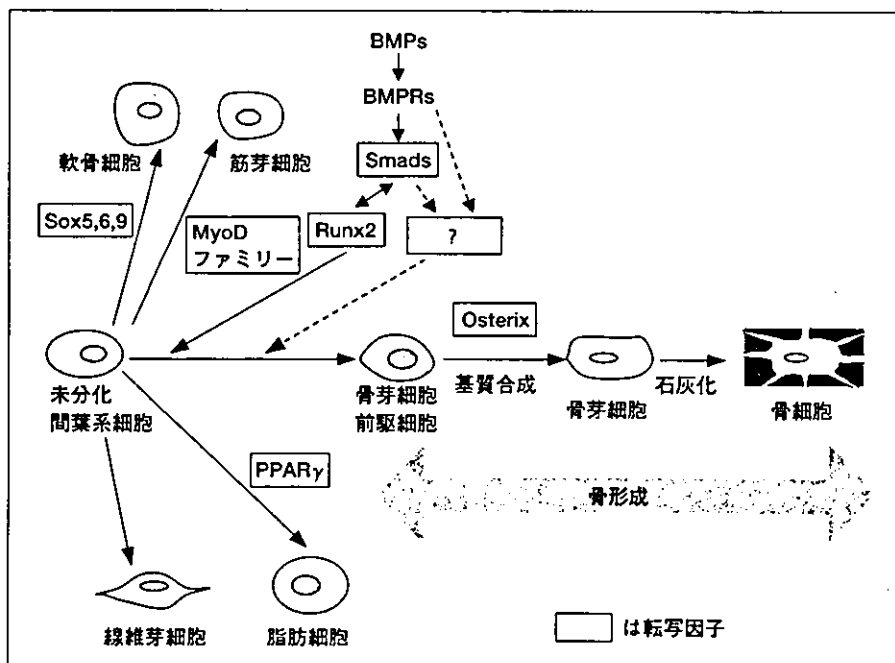


図2 骨芽細胞の分化および機能の調節

一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<sup>81, 91</sup>。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<sup>10)</sup>。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<sup>11)~13)</sup>。一方、ノックアウトマウスの解析より、NF- $\kappa$ 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<sup>14)~17)</sup>。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<sup>18)</sup>。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 $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), 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<sup>5), 6), 19)</sup>。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<sup>20), 21)</sup>。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<sup>22)</sup>。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<sup>23)</sup>。

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<sup>24), 25)</sup>。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<sup>26)</sup>。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<sup>27)</sup>。

### 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<sup>28)</sup>。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り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- $\alpha$ 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<sup>29)~31)</sup>、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: Osf2/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-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappaB 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-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat Med* 3 : 1285~1289, 1997
- 15) Franzoso G, Carlson L, Xing L, et al : Requirement for NF-kappaB 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 beta1 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 *Calpha* 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

最新医学・第58巻・第11号 (2003年11月号 別刷)

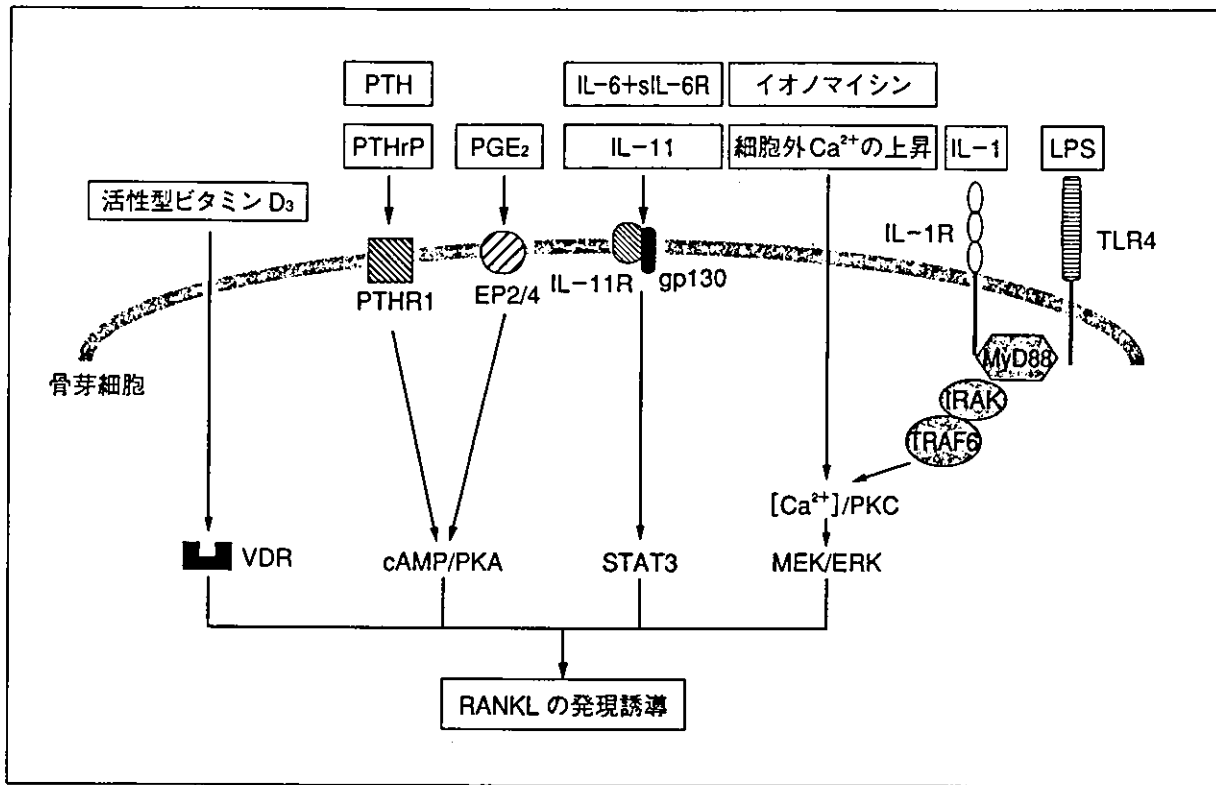
特集 代謝性骨疾患

## 骨吸収調節機構

小林 泰浩      宇田川 信之      高橋 直之

最新医学社

図1 骨芽細胞における RANKL 誘導のシグナル伝達系



骨芽細胞における RANKL 遺伝子の発現は、少なくとも4つの独立したシグナル系を介して調節されている。活性型ビタミン D<sub>3</sub> はVDR を介して、IL-11 や IL-6 は gp130 を介して、PTH や PGE<sub>2</sub> は cAMP/PKA を介して RANKL 遺伝子の発現を誘導する。一方、TLR と IL-1R の細胞内領域は相同性が高く、共通のシグナル伝達因子を介してシグナルを伝える。このシグナル系は [Ca<sup>2+</sup>]/PKC を介し、MEK/ERK 系を活性化して RANKL を誘導する。これらのシグナルは共存培養系で破骨細胞の形成を支持するものである。

略語：巻末の「今月の略語」参照

が亢進される<sup>5)</sup>。活性型ビタミン D<sub>3</sub> は活性型ビタミン D<sub>3</sub> 受容体 (VDR) を介し、IL-11 や IL-6 は gp130 を介して RANKL の発現を上昇させる。また、PTH や PGE<sub>2</sub> の受容体からのシグナルは cAMP/PKA を介して RANKL 発現を上昇させると考えられている<sup>5)</sup>。また、骨芽細胞をイオノホアである A23187 で処理したり、細胞外 Ca 濃度を上昇させたりすると、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化を介して RANKL の発現が誘導される<sup>6)</sup>。このように、骨芽細胞における RANKL 遺伝子の発現は、少なくとも4つの独立したシグナル系 (VDR, gp130, cAMP/PKA, [Ca<sup>2+</sup>]/PKC) により調節されている (図1)。

#### LPS と IL-1 による RANKL 誘導作用

近年、マクロファージや樹状細胞は細菌を構成する抗原性分子 (pathogen-associated molecular patterns: PAMP) を Toll-like receptor (TLR) を介して認識し、さまざまな免疫反応を起こすことが分かってきた<sup>7)</sup>。TLR はショウジョウバエにおいて真菌の感染防御に関与する Toll のホモログであり、ヒトで 10 種類、マウスで9種類知られている。TLR に関する知見をまとめると、① TLR はそれぞれ特異的な細菌細胞成分と結合し、シグナルを細胞内に伝達する。② TLR の細胞内ドメインは IL-1 受容体 (IL-1R) ファミリーの属する受容体のそれと

類似し、ともに MyD88 と IL-1 receptor-associated kinase (IRAK), さらに TRAF6 を介してシグナルが伝達される。③ TRAF6 を介するシグナルは、さらに MAPK の活性化や NF- $\kappa$ B, AP-1 の活性化を誘導する。④ TLR4 からのシグナルは、MyD88 依存性経路とともに Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter protein (TIRAP) を介する MyD88 非依存性経路がある。この MyD88 非依存性経路は、TLR4 以外の他の TLR/IL-1R には認められない<sup>9)</sup>。このように、この数年間で LPS をはじめとする PAMP の受容機構とシグナル経路が急速に明らかにされた<sup>7)</sup>。また、破骨細胞の分化と機能発現に対する PAMP の効果も詳細に解析されつつある。

LPS と IL-1 は骨芽細胞の RANKL mRNA の発現を亢進するが、この発現誘導はシクロオキシゲナーゼ 2 (Cox2, 誘導型プロスタグランジン合成酵素) の阻害剤である NS398 では抑制されず、PKC の阻害剤である RO-31-8220 と ERK の阻害剤である PD98059 で特異的に阻害される<sup>10)</sup>。また、A23187 や PKC の賦活剤である PMA は ERK/MEK の活性化 (リン酸化) を誘導し、PD98059 はこの誘導を阻害する。これらの知見は、① 細胞内 Ca の上昇による PKC の活性化によって誘導される RANKL の発現は、MEK/ERK 系シグナルを介すること、② TLR/IL-1R からのシグナルは PKC の活性化とそれに続く MEK/ERK を介したシグナル伝達を介して RANKL を誘導することを示唆するものである (図 2)。最近、シグナル伝達分子である Tpl2/cot が、LPS による TNF $\alpha$  産生に必要であることが明らかとなった<sup>11)</sup>。この Tpl2 遺伝子欠損マウスの骨芽細胞では、LPS 刺激により p38MAPK, JNK, NF- $\kappa$ B, Raf-1 の活性化は正常に起こる。しかし ERK のリン酸化は起こらず、

RANKL の発現誘導も起こらないことが報告された<sup>12)</sup>。この知見は、LPS による RANKL 発現に TPL2 の活性化に続く ERK の活性化が必須であることを示している。さらに我々は、MyD88 遺伝子欠損マウスの骨芽細胞では、LPS, IL-1 による ERK の活性化に続く RANKL の発現誘導が欠如し、破骨細胞の形成支持活性も認められないことを報告している<sup>13)</sup>。この所見は、RANKL 発現における LPS のシグナル経路は MyD88 依存性経路であり、TIRAP などの MyD88 非依存性経路ではないことを示している。MyD88 からのシグナルがどのように TPL2 へ伝達されるかは、今後の研究の進展を期待したい。

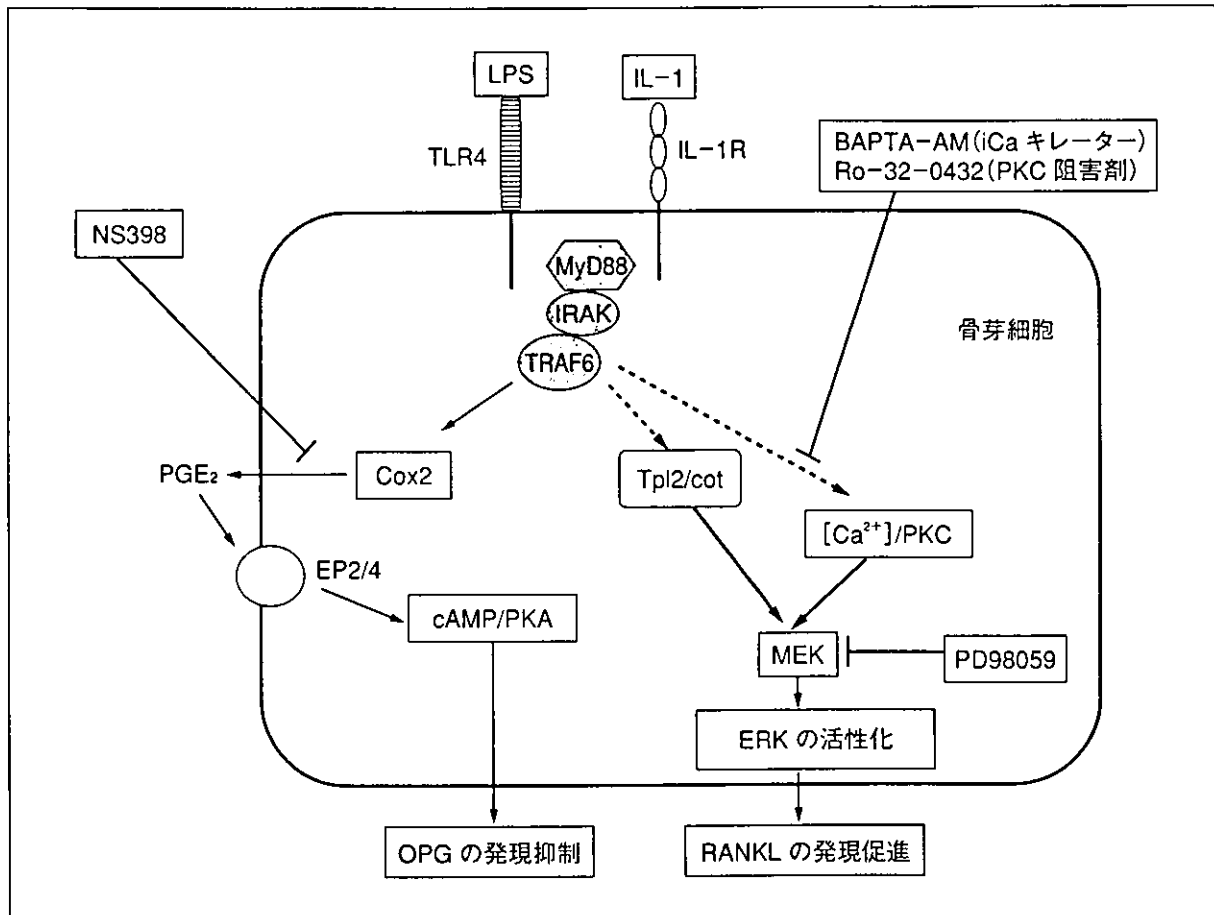
#### LPS, IL-1 による OPG 発現抑制機構

マウス骨髄細胞と骨芽細胞の共存培養系において、破骨細胞形成に及ぼす LPS ならびに IL-1 の作用を検討したところ、LPS と IL-1 は破骨細胞形成を促進した。このときに、骨芽細胞において LPS と IL-1 は RANKL の発現を促進し、OPG の発現を抑制した<sup>14)</sup>。また、NS398 は活性型ビタミン D<sub>3</sub> が誘導する破骨細胞形成は抑制しなかったが、LPS と IL-1 による破骨細胞の形成を完全に阻害した。このことから、LPS と IL-1 は PGE<sub>2</sub> の産生を介して RANKL の発現亢進と OPG の発現抑制を惹起するものと推測された。そこで、OPG 遺伝子欠損マウス由来の骨芽細胞と骨髄細胞を用いた共存培養系における LPS と IL-1 による破骨細胞形成が解析された。興味深いことに、OPG 遺伝子欠損マウス由来の細胞を用いた共存培養系において、NS398 は LPS と IL-1 による破骨細胞形成を全く抑制しなかった<sup>15)</sup>。しかし、この共存培養系に OPG を添加すると、LPS による分化が完全に抑制された。

そこで、正常マウスの骨芽細胞培養系で OPG の発現を検討した。恒常的に発現して



図2 LPS, IL-1によるRANKL誘導機構およびOPG発現抑制機構



LPSのシグナルは、JNK, p38, NF-κBを活性化する。しかし、LPSによるRANKL遺伝子発現には、Tpl2の活性化に続くERKの活性化が必須である。Tpl2遺伝子欠損マウス由来の骨芽細胞では、LPSによるRANKL発現が認められない。また、MyD88遺伝子欠損マウスの骨芽細胞では、LPS, IL-1刺激によるRANKL発現が認められない。iCaキレーターやPKC阻害剤、MEK1の阻害剤であるPD98059は、LPSによるRANKL誘導を阻害する。また、LPSやIL-1は骨芽細胞において、OPGの発現を抑制する。Cox2の阻害剤であるNS398はRANKLの発現は抑制しないが、OPGの発現抑制のみ解除する。正常マウス由来細胞の共存培養において、NS398はLPSによる破骨細胞形成を完全に抑制する。しかし、OPG遺伝子欠損由来マウスの共存培養系にNS398を添加しても、破骨細胞形成は抑制されない。この知見は、LPSで誘導されるPGE<sub>2</sub>によるOPGの発現抑制が、破骨細胞形成に重要であることを示唆している。

略語：巻末の「今月の略語」参照

いるOPG mRNAは、活性型ビタミンD<sub>3</sub>、LPSあるいはIL-1処理によって減少した。NS398をさらに添加すると、LPSあるいはIL-1によって引き起こされるOPGの発現抑制のみが解除された。これらの知見は、LPSとIL-1はPGE<sub>2</sub>の産生亢進を介してOPGの発現を抑制することを示している。このOPGの発現抑制は、LPSとIL-1による破骨細胞形成にとって極めて重要である。

以上の知見より、LPSとIL-1は骨芽細胞に作用し直接RANKLの発現を誘導するとともに、PGE<sub>2</sub>の産生を介してOPG産生を抑制し破骨細胞の分化を誘導するものと考えられた(図2)。

破骨細胞の分化と機能発現におけるLPSの直接作用

破骨細胞の前駆細胞である骨髄マクロファ

ージは、TLR1 から TLR9 まですべての TLR を発現している<sup>14)</sup>。骨髄マクロファージは RANKL と M-CSF の存在下で培養すると破骨細胞に分化する。Takami ら<sup>15)</sup> は、LPS (TLR4 のリガンド)、ペプチドグリカン (TLR2 のリガンド)、2本鎖 RNA [Poly (I:C)] (TLR3 のリガンド)、CpG DNA (TLR9 のリガンド) など PAMP は破骨細胞前駆細胞に作用し、RANKL と M-CSF が誘導する破骨細胞分化を著しく抑制することを報告した。この知見は、菌体成分はマクロファージから破骨細胞への分化を抑制し、骨組織への細菌侵入の防御に働いている可能性を示している。一方、IL-1 は骨髄マクロファージの p38MAPK を活性化するにもかかわらず (IL-1R は機能するにもかかわらず)<sup>15)</sup>、RANKL 誘導性の破骨細胞形成を全く抑制しない<sup>14)</sup>。IL-1R と TLR のシグナル伝達系の類似性を考えると、破骨細胞分化に対する IL-1 と PAMP の作用の違いは大変興味深い。

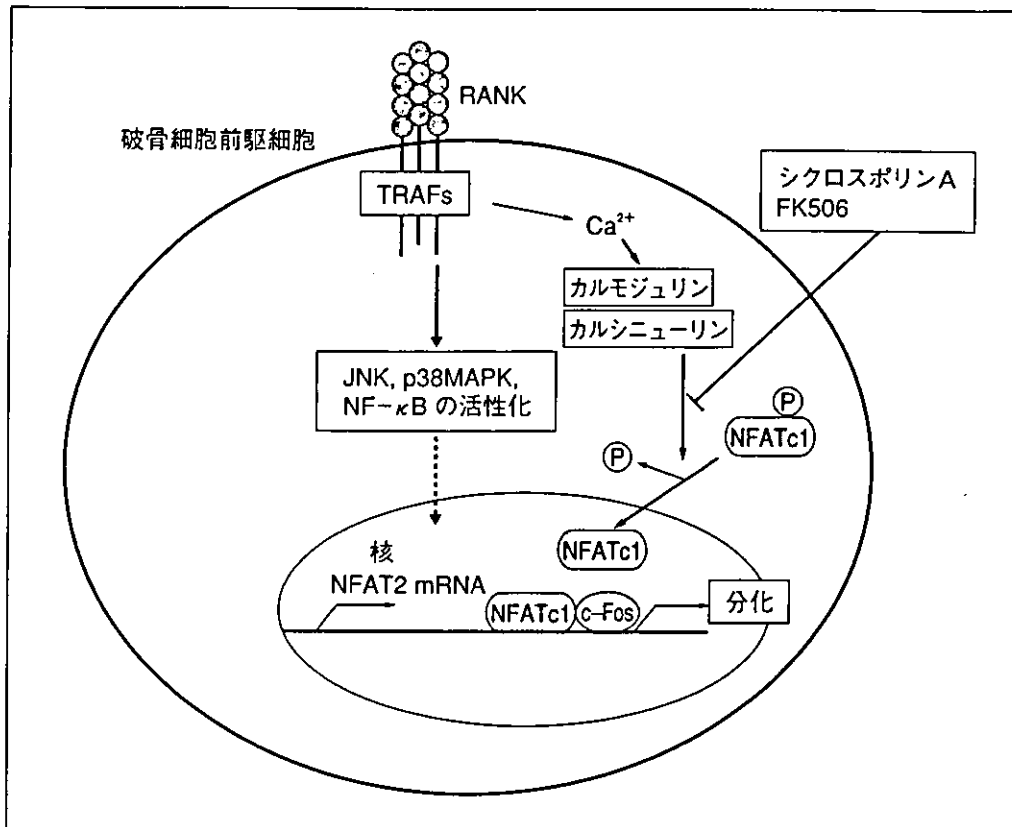
成熟破骨細胞に対する PAMP の作用も解析された<sup>14)16)</sup>。成熟破骨細胞は TLR2 と TLR4 の mRNA を発現しているが、他の TLR は発現していない<sup>14)</sup>。実際に、LPS とペプチドグリカンは、IL-1 と同様に破骨細胞の延命を促進した<sup>14)16)</sup>。また、LPS は IL-1 と同様に破骨細胞の骨吸収活性を促進した。LPS による破骨細胞延命効果は、TLR4 遺伝子に異常のある C3H/HeJ マウス由来の細胞では起こらないことから、LPS による破骨細胞の延命促進作用は TLR4 を介するものと推察される。Itoh ら<sup>17)</sup> は、成熟破骨細胞のサイトカイン産生に対する LPS の作用を検討している。破骨細胞の前駆細胞である骨髄マクロファージは LPS に反応し、IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  の炎症性サイトカインを産生する。しかし成熟破骨細胞では、NF- $\kappa$ B の活性化が起こっているにもかかわらず、LPS

によるサイトカイン産生は認められない<sup>17)</sup>。この現象は、マクロファージと破骨細胞におけるシグナル伝達の違いを明確化できる可能性があり、今後の研究の進展が期待される。

#### 破骨細胞の分化と機能を調節するシグナル伝達系

RANKL が破骨細胞前駆細胞上の RANK に結合すると、TNF 受容体ファミリーメンバーのシグナル伝達因子である TRAFs が活性化される。RANK の細胞内ドメインには、TRAF1, 2, 3, 5, 6 が会合する。中でも TRAF6 遺伝子欠損マウスは典型的な大理石骨病を呈することから、骨吸収のシグナル伝達に重要な分子であると考えられている。RANK からのシグナルは、これらの TRAF を介して NF- $\kappa$ B, JNK, p38MAPK, ERKなどを活性化する。また、c-Src と TRAF6 が RANK の細胞内ドメインに結合し、Akt/PKB を活性化する機序も提唱されている<sup>18)</sup>。さらに RANK からのシグナルによって、破骨細胞分化の初期に転写因子 nuclear factor of activated T cell (NFATc1) の発現が上昇することが、2つの研究グループによって報告された<sup>19)20)</sup> (図3)。NFAT は、活性化 T細胞においてサイトカイン産生を調節するなど、さまざまな生命現象を調節している。NFAT が核内へ移行し転写因子として働くためには、細胞内 Ca の上昇によって活性化されたカルシニューリンによって脱リン酸化を受けることが必要である。Takayanagi ら<sup>19)</sup> は、免疫抑制薬として知られるカルシニューリン阻害薬である FK506 が破骨細胞分化を強力に抑制すること、骨髄マクロファージを RANKL で刺激すると NFAT の活性化に必要な細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇が起こること、NFATc1 欠損 ES 細胞は破骨細胞に分化しないことを示した。一方 Ishida ら<sup>20)</sup> は、カルシニューリン阻害薬であるシク

図3 破骨細胞前駆細胞における RANK シグナル系



RANKL が RANK に結合すると、TRAF が RANK の細胞内ドメインに会合し、その下流の JNK, p38MAPK, NF- $\kappa$ B, ERK シグナル系を活性化する。また、RANK のシグナルによって、NFATc1 の発現は破骨細胞分化の早期に上昇する。NFATc1 は通常リン酸化されており、その分子内の核外移行シグナルが露出しているため、核内に移行できない。しかしカルシニューリンによって脱リン酸化を受けると、代わりに核内移行シグナルが露出するため、核内へ移行し転写因子として働く。NFATc1 の発現と機能が、RANK からのシグナルのどの系によって調節されているか、非常に興味深い。

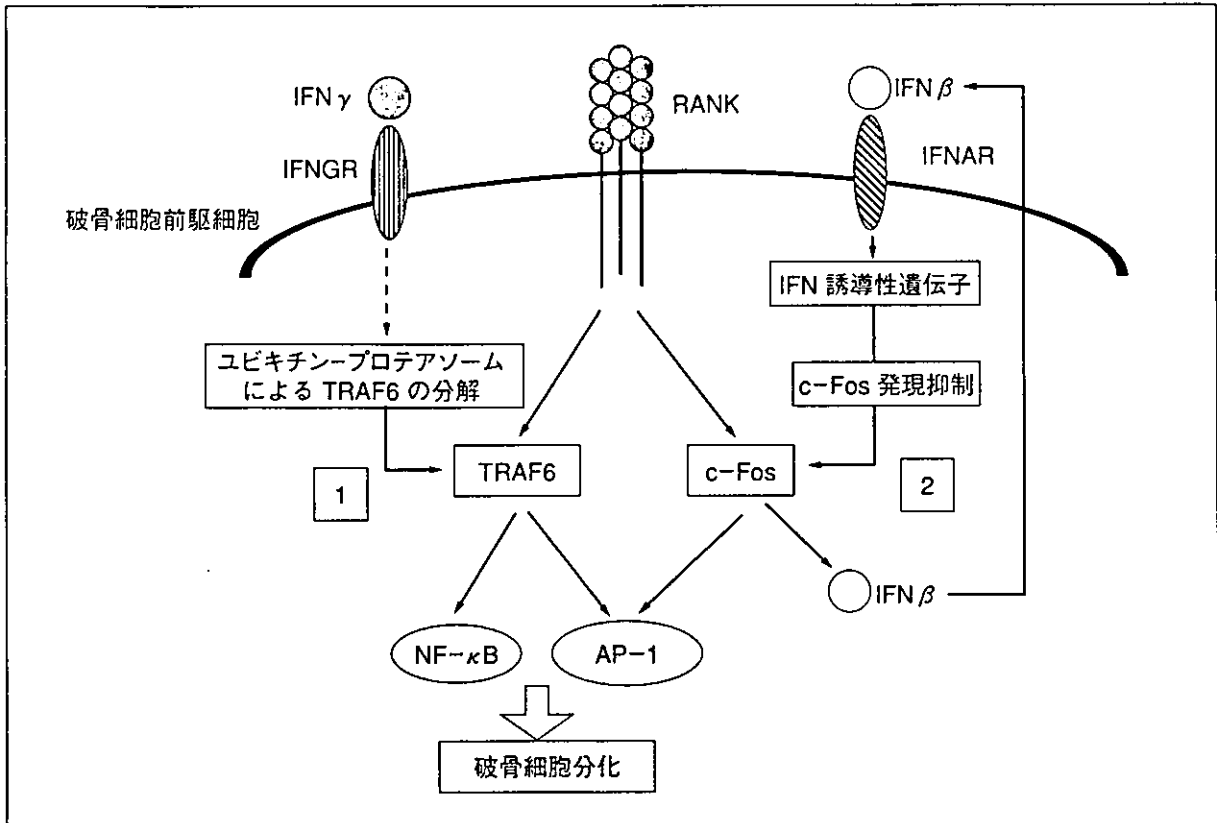
略語：巻末の「今月の略語」参照

ロスボリン A や NFATc1 のアンチセンスは、多核の TRAP 陽性細胞の出現を抑制することを示した。また、NFATc2 は骨格筋細胞の細胞融合に関与するとの報告もある<sup>21)</sup>。これらの知見は、NFAT は破骨細胞の分化のみならず、破骨細胞の融合過程に関与している可能性も示唆している。NFATc1 がどのような分子を調節して破骨細胞分化を調節しているのか、また、RANKL によって活性化されるどのようなシグナルが細胞内 Ca を上昇させるのか、今後の課題である。

#### 破骨細胞分化と機能の抑制機構

骨吸収は免疫系の細胞によっても制御されている。実際、RANKL の発現は骨組織のほかにも多くの組織で認められる<sup>22)</sup>。胸腺もその1つである。活性化 T 細胞は RANKL を発現しており、歯周炎や関節リウマチなどの病態における骨吸収に関与している。一方、活性化 T 細胞は、強力な破骨細胞分化阻害サイトカインである IFN $\gamma$  を産生する。Takayanagi ら<sup>23)</sup> は遺伝子欠損マウスを用いて、IFN $\gamma$  による破骨細胞分化抑制機構を調べた。その結果 IFN $\gamma$  は、ユビキチン-プロ

図4 IFNによる破骨細胞分化抑制機構



活性化T細胞によって産生されるIFN $\gamma$ は、前駆細胞のIFN $\gamma$ 受容体(IFNGR)を介し、破骨細胞分化に重要なシグナル伝達分子であるTRAF6の分解を促進し、破骨細胞分化を抑制する(経路1)。またIFN $\beta$ は、IFN $\alpha$ 受容体(IFNAR)を介し、転写因子であるc-Fosの発現を抑制することで、破骨細胞分化を抑制する(経路2)。IFN $\beta$ の発現は、RANKからのシグナル伝達によって活性化されたc-Fosによって調節されている。  
略語：巻末の「今月の略語」参照

ロテアソーム系を介して RANKL-RANK のシグナル伝達において重要な因子である TRAF6 の分解を促進することで、破骨細胞分化を抑制することを報告した。また IFN $\beta$  は、RANKL-RANK シグナル伝達により c-Fos の発現を介して誘導される。この誘導された IFN $\beta$  が、c-Fos の発現をダウンレギュレーションすることによって破骨細胞形成を抑制することが示された<sup>21)</sup> (図4)。このように、T細胞は骨吸収を促進する一方でネガティブフィードバック機構も有しており、炎症性骨吸収を巧妙に調節しているものと考えられる。

おわりに

1997年のOPGの発見と、それに続くRANKLのクローニングにより、破骨細胞の形成を調節するシグナル伝達が分子レベルで明らかにされつつある。また、関節リウマチや炎症時に産生されるサイトカインが、骨芽細胞におけるRANKL発現を促進するのみならず、破骨細胞前駆細胞や成熟破骨細胞へ直接作用し、活性化や延命を調節する機構も分かってきた。これらの基礎研究が、骨代謝疾患への臨床応用や創薬への応用などに発展することを期待したい。