

自己免疫性関節炎における骨破壊の分子機構と制御 — 破骨細胞分化シグナルを中心として —

研究課題名：自己免疫性関節炎における骨破壊の分子機構の解明とその制御法の確立

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 特任教授
高柳 広

● はじめに

関節リウマチに代表される自己免疫性関節炎は全世界の人口の約1%の患者を有する最も頻度の高い自己免疫疾患の一つである。滑膜の炎症に伴い骨破壊を生じるため、患者の運動機能は著しく制限されるが、この骨破壊を防止する治療法は確立されていない。私は、関節炎性骨破壊において破骨細胞が重要な役割を果たし、この破骨細胞の誘導にはTNFファミリーのサイトカインである破骨細胞分化因子（receptor activator of NF- κ B ligand: RANKL）が重要であることを研究してきた（Arthritis Rheum 43, 259, 2000, Nature 408: 600, 2000）。そこで、さきがけ研究においては、このRANKLの細胞内シグナル伝達に注目し、破骨細胞分化を制御する分子メカニズムを解明し、新たな骨破壊治療法への分子基盤を確立することをめざして研究を行った。

従来RANKLの細胞シグナル伝達に関与すると考えられている分子は、NF- κ B, MAP kinase, AP-1などが知られていたが、これらのシグナル分子は多くの他のサイトカイン等によっても活性化されることから、破骨細胞の分化という特殊な現象を説明するには不十分であると考えた。そこで、RANKLの下流には未知の特異的なシグナル伝達分子が存在するはずであると予想して、RANKL誘導遺伝子のトランスクリプトーム解析を行った。この網羅的解析にはマウス全遺伝子をカバーするAffymetrix GeneChipを用いてゲノムワイドでのスクリーニングを行った。ここで得られた知見をもとに、破骨細胞の分化制御に必須の分子を同定し、その機能解析を行った。

● IFN- β のRANKLシグナルの自己制御因子として意義の解明

このトランスクリプトーム解析の結果、RANKLによってインターフェロン(IFN)- α/β 誘導遺伝子として知られる遺伝子が多数誘導されることが明らかになった。これまで、IFN- α/β は抗ウイルス作用をもつ免疫制御分子であると考えられてきたが、IFN- α/β 受容体欠損マウス由来の骨髄細胞からは通常の2倍もの破骨細胞が形成されることから、IFN- α/β が破骨細胞分化を抑制する重要な因子であることが示唆された。IFN- α/β の中でも、破骨細胞前駆細胞においては、RANKLはIFN- β を特異的に誘導することが明らかになり、IFN- β の遺伝子欠損マウスの骨組織を検討したところ、破骨細胞の数が異常に増え、骨粗鬆症様の症状を呈するマウスであることがわかった。以上より、IFN- β はRANKLで誘導されるにもかかわらず破骨細胞分化を負に制御する因子であり、骨代謝に必須の役割を担うことが明らかになった。また、IFN- β によるRANKLシグナルの抑制標的が転写因子c-Fosであることも解明した。さらに、IFN- β を投与することで、*in vivo*においてもマウスの炎症性骨破壊モデルの治療に成功した。これらの結果から、IFN- β やIFN- β 誘導剤あるいは、c-Fos経路の抑制剤の研究開発を進めれば、炎症性骨疾患の治療に新たな道を開く可能性が示された^{1,2}。

● 破骨細胞の分化のマスターレギュレーター転写因子NFATc1の発見

トランスクリプトーム解析による最大の成果は、転写因子NFATc1が、破骨細胞の分化のマスターレギュレーター（分化決定分子）であることを解明した点である³。これは、NFATc1欠損ES細胞が破骨細胞に分化できないこと、骨髄マクロファージ系細胞にレトロウイルスでNFATc1を過剰発現して破骨細胞を誘導可能であったことから証明された。RANKLはNFATc1を大量に誘導することで破骨細胞の分化を促進することが明らかになり、はじめて破骨細胞分化特異的な転写プログラム的一端が解明された。さらに、この破骨細胞分化におけるNFATc1の活性化には細胞内カルシウムシグナルの活性化やカルシウム依存的に活性化されるフォスファターゼであるカルシニューリンが重要であることが明らかになった。また、NFATc1は破骨細胞特異的な遺伝子のプロモーター上で、c-Fosを含むAP-1や他の転写因子と複合体を形成して機能することも明らかになった⁴。これらの新規シグナル経路を詳細に解析することで、破骨細胞分化機構の全貌が明らかになり、それを利用した新規骨疾患治療の可能性が開かれたと言える。

● RANKLの共刺激分子であるDAP12/FcR γ 会合免疫グロブリン様受容体群の同定

NFATc1の研究から、破骨細胞分化におけるカルシウムシグナルの重要性が明らかになったが、NFATc1活性化に必要なカルシウムシグナルの活性化がどのようなメカニズムで誘導されるのかは不明であった。RANKのようなTNFファミリーの受容体が直接カルシウムシグナルを活性化することは考えにくかったからである。われわれは、ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)をもつアダプター分子であるDAP12 (DNAX activating protein 12) の欠損細胞において破骨細胞分化の異常があることから、免疫細胞でカルシウムシグナルを活性化するITAM が破骨細胞分化においても重要な役割をもつ可能性があるのではないかと考えた。

DAP12欠損マウスの骨髄細胞は*in vitro*では破骨細胞分化が障害されているが、骨芽細胞との共存培養では分化がレスキューされ、マウスの生体レベルでも正常数の破骨細胞が観察されることから、*in vivo*においてはDAP12の機能は他の分子によって代償されていることが予想された。われわれは、以下の理由からFc receptor common γ subunit (FcR γ)が代償分子と予想した。①レスキューする受容体の候補となるosteoclast-associated receptor (OSCAR)がFcR γ 会合性受容体であったこと。②破骨細胞前駆細胞のDNAチップを用いた発現解析から、ITAMをもつアダプター分子の中で、DAP12の次に高発現するのはFcR γ であること。そこで、東北大学の高井俊行教授らと共同で、DAP12とFcR γ のダブル欠損マウス(DKO)を作成し解析した。DKOは、*in vitro*でも*in vivo*でもほぼ完全に破骨細胞分化が障害され、骨髄腔が形成されない重篤な大理石骨病を呈した。DKO由来の破骨細胞前駆細胞にレトロウイルスでDAP12を発現させると、野生型(WT)のDAP12では効率よくレスキューされるが、ITAMのリン酸化部位に変異を入れたDAP12においては、レスキューされないことから、破骨細胞分化においてITAMを介したシグナルが重要な意義をもつことが示された。

DAP12とFcR γ は、単独では細胞膜上に発現できない免疫受容体と会合することで、その受容体の膜上での発現を誘導するとともに、受容体からのシグナルをITAMを介して下流に伝えるアダプター分子である。それでは、破骨細胞前駆細胞においてFcR γ 及びDAP12に会合する受容体は何なのであろうか？われわれはOSCAR、paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-A、及びtriggering receptor expressed by myeloid cells (TREM)-2、signal-regulatory protein (SIRP) β 1といった免疫グロブリン様受容体がそれぞれFcR γ 及びDAP12と会合することを同定し、それらの受容体を抗体により架橋刺激すると破骨細胞分化が促進することを明らかにした。FcR γ およびDAP12のITAMは免疫受容体とRANKLの両方に依存してリン酸化され、phospholipase C (PLC) γ を介してCa²⁺シグナルを活性化することでNFATc1を誘導する。このように、免疫受容体がDAP12またはFcR γ のITAMを介して伝えるシグナルは、RANKLの共刺激シグナルとして破骨細胞分化に必須であることが解明された⁵。

● 関節リウマチの病態におけるNFATc1の関与と治療標的としての重要性

NFATc1の関節リウマチの病態への関与についても検討を行った。関節リウマチの病理組織学的検討を行うと、骨破壊部に見られる破骨細胞においてNFATc1は非常に高く発現しており、治療標的として有望であることが示唆された。そこで、既存の抗リウマチ薬の破骨細胞分化系への作用を指標にしてスクリーニングを行い、骨破壊抑制効果をもつ抗リウマチ薬レフルノミドがNFATc1を標的として破骨細胞分化を抑制すること、またこの抑制作用が生体レベルにおける骨破壊抑制作用にも重要であることを明らかにした⁶。NFATc1の活性化機構の解析が臨床的にも応用可能であることを示唆する重要な成果と言える。

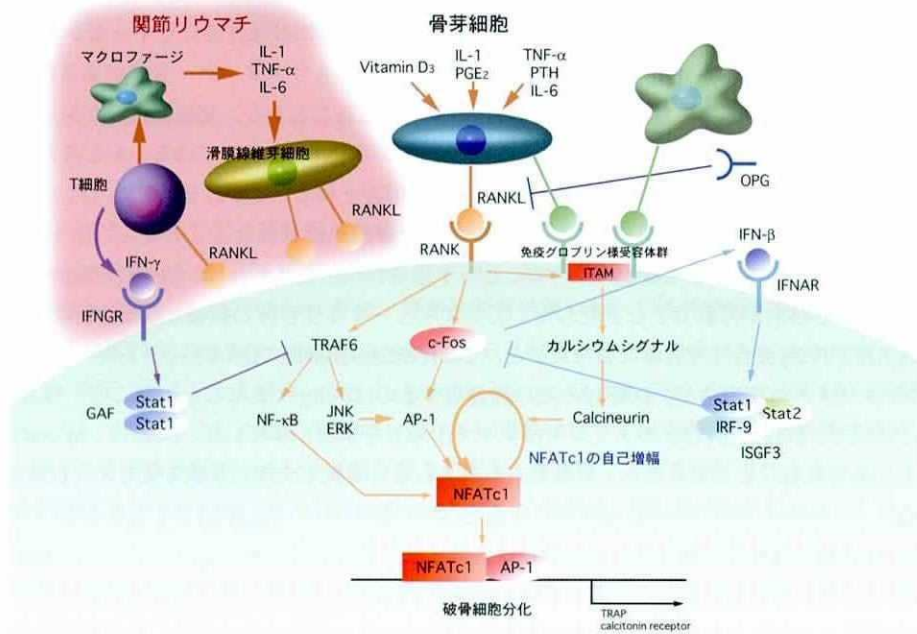
● Stat1の骨形成抑制機能の発見とその分子メカニズムの解析

骨破壊を効率良く制御するには、骨吸収抑制だけではなく、骨形成を促進することも重要な側面である。すでに述べたようにIFN- β が意外にも骨代謝制御の必須分子であったことから、IFN- β 下流で活性化される転写因子複合体の構成分子の骨代謝における意義を遺伝子欠損マウスを用いて解析した。そして、転写因子Stat1が骨芽細胞分化を制御する転写因子Runx2の抑制因子であることを見いだした。Stat1による抑制を解除することで、人為的に骨形成を促進する方法が開発できる可能性が示された⁷。

● 骨免疫学の創成

このように、免疫系の制御分子による骨代謝制御という視点から、サイトカインや転写因子などの関与を分子レベルで解明した一連の報告は、osteimmunology (骨免疫学)と呼ばれる分野を開拓したとして、国際的にも高く評価され、Nature 408: 535, 2000, Nature 416: 686, 2002, Nat Med 10: 458, 2004などにて論評された。また、

近年の骨免疫学の進歩については、筆者が著した文献8-10を参照されたい。



主要業績リスト

1. Takayanagi, H., Kim, S. & Taniguchi, T. Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. *Arthritis Res 4 Suppl 3*, S227-232 (2002).
2. Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., Suzuki, H., Suzuki, T., Sato, K., Yokochi, T., Oda, H., Nakamura, K., Ida, N., Wagner, E. F. & Taniguchi, T. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of *interferon-β*. *Nature* 416, 744-749 (2002).
3. Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E. F., Mak, T. W., Kodama, T. & Taniguchi, T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling for terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3, 889-901 (2002).
4. Matsumoto, M., Kogawa, M., Wada, S., Takayanagi, H., Tsujimoto, M., Katayama, S., Hisatake, K. & Nogi, Y. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J Biol Chem* 279, 45969-45979 (2004).
5. Koga, T., Inui, M., Inoue, K., Kim, S., Suematsu, A., Kobayashi, E., Iwata, T., Ohnishi, H., Matozaki, T., Kodama, T., Taniguchi, T., Takayanagi, H.* & Takai, T.* Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 428, 758-763 (2004). *corresponding authors
6. Urushibara, M.*, Takayanagi, H.*, Koga, T., Kim, S., Isobe, M., Morishita, Y., Nakagawa, T., Loeffler, M., Kodama, T., Kurosawa, H. & Taniguchi, T. The antirheumatic drug leflunomide inhibits osteoclastogenesis by interfering with receptor activator of NF-κ B ligand-stimulated induction of nuclear factor of activated T cells c1. *Arthritis Rheum* 50, 794-804 (2004). *equal contributors
7. Kim, S., Koga, T., Isobe, M., Kern, B. E., Yokochi, T., Chin, Y. E., Karsenty, G., Taniguchi, T. & Takayanagi, H. Stat1 functions as a cytoplasmic attenuator of Runx2 in the transcriptional program of osteoblast differentiation. *Genes Dev* 17, 1979-1991 (2003).
8. Takayanagi, H. How does the immune system break and protect bone? *Science* <http://www.sciencemag.org/feature/data/pharmacia/2002/takayanagi.sh1> (on line version)
9. Takayanagi, H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* (in press).
10. Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T. & Taniguchi, T. Stat1-mediated cytoplasmic attenuation in osteoimmunology. *J Cell Biochem* (in press).