

機関番号：33920

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591178

研究課題名 (和文) 関節リウマチにおけるサイトカインによる骨芽細胞分化障害の分子機構の解明

研究課題名 (英文) A study on the molecular mechanism of cytokine-mediated inhibition of osteoblast differentiation in rheumatoid arthritis

研究代表者

山村 昌弘 (YAMAMURA MASAHIRO)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：80252956

研究成果の概要 (和文)：関節リウマチ (RA) における骨破壊の進展には、滑膜病変部における炎症性サイトカイン発現による破骨細胞誘導とともに骨形成障害が関与している。本研究では、RA 滑膜のサイトカイン発現に伴う骨形成障害の分子機構を明らかにするため、マウス由来筋芽細胞株 C2C12 細胞の骨芽細胞への分化・活性化を制御する骨形成蛋白質 (bone morphogenetic protein: BMP) のレセプター発現とそのシグナル伝達経路と転写因子の活性化に及ぼす炎症性サイトカインの作用を解析した。BMP 依存性の骨芽細胞分化は主に腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) により阻害された。この TNF- $\alpha$  の骨形成障害には MAP キナーゼの SAPK/JNK 経路が重要な役割を担っており、BMP-Smad シグナル経路の抑制により骨芽細胞の分化阻害が起こる。その下流には阻害性 Smad6 の誘導が関与していた。TNF- $\alpha$  による骨芽細胞分化障害は、RA 患者骨組織から分離した骨芽細胞の分化モデルにおいても起こることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The cellular mechanism for cytokine-mediated inhibition of BMP-induced osteoblastic differentiation was investigated using mouse myoblast C2C12 cells. Osteoblast transformation of BMP-cultured C2C12 cells, and their Runx2/osteocalcin expression, ALP activity, and parathyroid hormone (PTH) responsiveness (cAMP production) were inhibited by TNF- $\alpha$ , but not by IL-1, IL-6, or IL-17. BMP-induced Smad1,5,8 phosphorylation in the cells was suppressed by TNF- $\alpha$  signaling, but inhibitory Smad6 gene activation was increased as determined by cDNA array. MAP kinase analysis showed that ERK1/ERK2 and SAPK/JNK phosphorylation were selectively activated in the cells with TNF- $\alpha$ . BMPs had no effect on TNF type 1 and 2 receptor-expression. Notably, SAPK/JNK inhibitors restored TNF- $\alpha$  inhibition of osteoblast differentiation, as demonstrated by Id-1-promoter activity as well as Runx2/osteocalcin mRNA levels. These results suggest that TNF- $\alpha$  may have a crucial role in BMP-induced osteogenic inhibition in the diseases such as rheumatoid arthritis, through its SAPK/JNK activation and Smad6 induction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：(1) 関節リウマチ (2) 骨芽細胞 (3) 炎症性サイトカイン (4) 骨形成蛋白質 (5) 腫瘍壊死因子 (6) Smad

## 1. 研究開始当初の背景

正常な骨組織では骨リモデリングと呼ばれる、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスにより骨代謝が維持されている。従来、RA に特徴的とされる骨びらん、滑膜組織内に誘導された破骨細胞の骨吸収により形成され、この破骨細胞の誘導には腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) などのサイトカインにより活性化された滑膜線維芽細胞や T 細胞の RANKL 発現が重要であることが明らかにされてきた。実際、TNF 阻害薬は骨破壊進行を強力に防止するが、さらに骨びらの修復も期待できる。このことは、RA の骨破壊進展には、サイトカインによる異所性の破骨細胞誘導による骨吸収亢進とともに骨形成障害が関与することを示唆している。

RA 滑膜には TNF- $\alpha$ 、インターロイキン 1 (IL-1)、IL-6、IL-17 など多くの炎症性サイトカインが発現されており、病態形成に関与する。関節破壊においては直接的あるいは間接的 (RANKL 依存性) に破骨細胞の成熟・活性化を誘導する活性を有し、骨吸収を促進する。しかし、炎症性サイトカインが骨芽細胞を活性化し、サイトカインやプロスタグランジンの産生を増強することは報告されているが、骨形成障害機構については不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、骨芽細胞への機能的分化を制御する BMP レセプター発現およびそのシグナル伝達と転写因子の活性化に及ぼす炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-17) の作用を解析し、RA 滑膜のサイトカイン発現に伴う骨形成障害の分子機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、BMP 依存性に骨芽細胞に分化するマウス由来筋芽細胞株 C2C12 細胞を骨芽細胞分化モデルに使用した (Mukai T, et al. 2007)。この未分化間葉細胞の骨芽細胞分化に対する TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-17 の阻害作用を解析する。

まず、これらサイトカインの BMP レセプター発現に対する作用を検討した。次に、BMP 依存性の骨芽細胞分化に対する作用は、必須転写因子である Runx2 と Osterix の誘導、骨形成機能マーカーである I 型コラーゲン、オステオポンチン、オステオカルシンの産生、アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性、副甲状腺ホルモン (PTH) 反応性により評価した。さらに、サイトカインの BMP シグナルに対する影響は、その細胞内シグナル伝達を担う Smad (Smad1/5/8) 活性化と MAP キナーゼ (ERK / SAPK-JNK / p38 キナーゼ) 活性

化により検討し、マイクロアレイ法による発現遺伝子群の変化とプロテオーム解析から骨芽細胞分化阻害に寄与する細胞内因子を同定し、推定因子の制御効果を siRNA (short interfering RNA) により発現抑制することにより確認した。

C2C12 細胞より得られた知見は、RA 患者の手術時に得られた骨組織から分離した骨芽細胞を用いて、骨芽細胞の成熟過程におけるサイトカイン反応性 BMP レセプター発現とシグナル伝達を検討した。

## 4. 研究成果

C2C12 細胞は機能的 BMP レセプターを発現し、ALK-6 以外の Smad シグナル分子を有し、BMP 存在下で骨芽細胞に分化した。この C2C12 細胞の分化には転写因子 Runx2 とオステオカルシン分子の誘導を伴い、ALP 活性と PTH 反応性 cAMP 産生を認めた。TNF- $\alpha$  は C2C12 細胞の骨芽細胞への細胞形態変化、Runx2/オステオカルシン発現、ALP 活性/PTH 反応性などを阻害した。このような阻害活性は、IL-1、IL-6、IL-17 などには認めなかった。なお、TNF- $\alpha$  は C2C12 細胞の機能的 BMP レセプターの発現には影響しなかった。

TNF- $\alpha$  による C2C12 細胞の骨芽細胞分化の阻害には、BMP-2 による Smad1,5,8 のリン酸化の抑制が関連し、cDNA アレイによる解析では阻害性 Smad6 の誘導が関与していた。BMP-2 刺激された C2C12 細胞において、TNF- $\alpha$  は MAP キナーゼの ERK1/ERK2 と SAPK/JNK のリン酸化を誘導した。さらに、SAPK/JNK 経路特異的な活性化阻害化合物の添加により、C2C12 細胞の BMP-2 依存性骨芽細胞分化に対する TNF- $\alpha$  の阻害活性は消失した。

BMP 依存性の骨芽細胞分化において、TNF- $\alpha$  は BMP-Smad シグナル経路を抑制することにより、分化阻害を起こす主要な炎症性サイトカインであることが明らかになった。この TNF- $\alpha$  の骨形成障害の誘導には、MAP キナーゼの SAPK/JNK 経路が重要な役割を担っており、その下流には阻害性 Smad6 の関与が推定された。

また、TNF- $\alpha$  による骨芽細胞分化障害は、RA 患者骨組織から分離した骨芽細胞の分化モデルにおいても起こることが示唆された。

本研究により、RA 関節炎の骨びらん形成において重要な役割を担う TNF- $\alpha$  が、破骨細胞の誘導・活性化とともに骨芽細胞分化を阻害することが明らかになり、その分子機構の一端が明らかにされた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Yamashita M, Otsuka F, Mukai T, Otani H, Inagaki K, Miyoshi T, Goto J, Yamamura M, Makino H. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor-alpha inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. J Endocrinol. 2008;196(3): 601-613.
2. Li H, Yoneda M, Takeyama M, Sugita I, Tsunekawa H, Yamada H, Watanabe D, Mukai T, Yamamura M, Iwaki M, Zako M. Effect of infliximab on tumor necrosis factor-alpha-induced alterations in retinal microvascular endothelial cells and retinal pigment epithelial cells. J Ocul Pharmacol Ther 2010; 26(6): 549-556.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 向井知之、大塚文男、山村昌弘：ヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に及ぼす炎症性サイトカインの作用 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2009 年 4 月 25 日 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山村 昌弘 (YAMAMURA MASAHIRO)  
愛知医科大学・腎臓・リウマチ膠原病内科・  
教授  
研究者番号：80252956

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：