

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591932

研究課題名（和文）破骨細胞分化における TGF シグナルと TRAF シグナルのクロストーク

研究課題名（英文）Crosstalk of TGF signal and TRAF signal in osteoclastogenesis

研究代表者

門野 夕峰 (KADONO YUHO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70401065

研究成果の概要（和文）：

マウス個体を用いた実験及びマウスから採取した細胞を用いた実験によって、破骨細胞分化に TGF-beta が必須であることが分かった。TGF-beta 下流のシグナル伝達経路には Smad 経路と non-Smad 経路が知られているが、これらのうち Smad 経路の活性が破骨細胞分化に重要であることが分かった。破骨細胞分化因子 RANKL が破骨細胞前駆細胞上の受容体 RANK に結合すると TRAF6-TAB-TAK コンプレックスが細胞内に形成され下流シグナルが活性化されるが、この TRAF6-TAB-TAK コンプレックス形成に Smad3 が関与している事を示唆する実験結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

We identified that TGF-beta is indispensable in osteoclastogenesis both in vitro and in vivo. We identified that Smad pathways, not non-Smad pathways, mediates the role of TGF-beta on osteoclastogenesis. We obtained the data indicating that Smad3 involves in TRAF6-TAB-TAK complex formation which exists in downstream of osteoclastogenic RANKL/RANK pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：骨・軟骨代謝学、破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

骨の恒常性は破骨細胞による骨吸収と骨

芽細胞による骨形成の巧妙なバランスによって維持される。破骨細胞は骨吸収を中心的

に担う細胞であり、造血幹細胞に由来し、マクロファージや樹状細胞と起源を一にする。1990年代の後半に破骨細胞分化因子 RANKL(receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand)が同定され、破骨細胞の分化が骨芽細胞や滑膜細胞などが発現する RANKLによって制御されていることが明らかになった。RANKL は TNF(tumor necrosis factor)スーパーファミリーに属する分子であり、受容体 RANK(receptor activator of nuclear factor-kappa B)と結合して惹起された分化シグナルは TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) によって伝達され、NF- $\kappa$ B、NFATc1 (Nuclear factor of activated T-cells c1) などの転写因子を活性化して破骨細胞分化を誘導する。これらシグナル分子 RANKL、RANK、TRAF6 あるいは転写因子 NF- $\kappa$ B、NFATc1 のいずれを欠損しても、破骨細胞分化障害を呈する。

RANKL は元来、活性化 T 細胞が発現する樹状細胞生存促進因子として同定された経緯もあり、発見当初より免疫系との関連が注目されてきた。このような流れの中で、関節リウマチ(RA)をはじめとした免疫機能の異常によって生じるさまざまな炎症性疾患において、骨破壊の直接の担い手が破骨細胞であり、破骨細胞の分化が RANKL によって誘導されることが明らかにされた(Takayanagi H et al., *Arthritis Rheum.* 43(2):259-269, 2000; Tanaka S et al., *Immunological Reviews* 208:30-49, 2005)。その一方で、近年の生物学的製剤の華々しい臨床的成功は、RAにおける TNF- $\alpha$ を中心とする炎症性サイトカインの重要性を決定付けた。また TNF 阻害薬の使用によって RA 患者の骨破壊の進行も抑制されることから、骨破壊もまた、TNF- $\alpha$ によって担われているとの認識が高まっている。しかしながら *in vitro* において TNF- $\alpha$  自体の破骨細胞形成能は低く、その作用機序については不明な点が多い。特に RANKL シグナルとの missing link は大きなクエスチョンマークとして残されたままである。

RANKL は受容体 RANK に結合し、下流分子である TRAF6 を介して細胞内へシグナルを伝える。一方で TNF- $\alpha$  が受容体 TNFR (TNF receptor) に結合することで惹起されたシグナルは、TRAF6 のファミリー分子である TRAF2 を介して伝達されるが、申請者らは TGF- $\beta$  の存在下において TNF- $\alpha$  によっても破骨細胞分化が誘導されること、この破骨細胞分化は主要経路とされる RANKL-RANK-TRAF6 経路に依存しないことを報告した。また RANKL による破骨細胞分化過程においても、TGF- $\beta$  が分化促進因子として作用すること、すなわち TGF- $\beta$  が RANKL シグナルと TNF- $\alpha$

シグナルとの missing link である可能性を示した (Kadono Y, et al., *EMBO Rep*, 6(2):171-176, 2005; Kim N, et al., *J Exp Med*, 202(5):589-595, 2005)。本研究は、RANKL シグナルと TNF- $\alpha$  シグナルとを融合させる分子としての TGF- $\beta$  に注目し、その破骨細胞形成促進機序を網羅的かつ詳細に明らかにすることを目的としている。

## 2. 研究の目的

関節リウマチ(RA)をはじめとする炎症性疾患においては著明な骨破壊が特徴的である。骨破壊を中心的に担うのは破骨細胞であり、その分化は RANKL によって制御される。一方で炎症性サイトカインを標的とした生物学的製剤の成功によって、RAの病態における腫瘍壊死因子 TNF- $\alpha$ を中心とした炎症性サイトカインの重要性は今や疑いのないものとなっている。しかしながら *in vitro* において TNF- $\alpha$  自体の破骨細胞誘導能は低く、病的骨破壊における TNF- $\alpha$  の作用機序、その RANKL シグナルとの関連は必ずしも明らかではない。われわれは RANKL シグナルと TNF- $\alpha$  シグナルの2つをリンクさせる物質として腫瘍成長因子 TGF- $\beta$  に注目した。破骨細胞分化における RANKL シグナルと TGF- $\beta$  シグナルとの関係を網羅的かつ詳細に解析することによって、炎症性疾患における骨破壊の分子メカニズムを明らかにするとともに、その治療戦略において新たなアプローチを提示することが本研究の目的である。

本研究の特色および独創的な点は、破骨細胞分化因子 RANKL シグナルと炎症性サイトカインシグナルとの missing link として TGF- $\beta$  という骨組織に豊富に存在するサイトカインに着目し、その破骨細胞分化に対する影響を細胞内シグナルという観点から明らかにする、という点である。破骨細胞分化因子 RANKL の同定によって *in vitro* における破骨細胞培養法が確立されて以来、破骨細胞分化メカニズムは急速に解明された。中でも免疫制御と破骨細胞との関連は「骨免疫学」という新しい研究分野として結実した。このような流れの中で免疫調節系と破骨細胞分化活性化調節系は多くの細胞内シグナルを共有していることが次々と報告された。その一方で炎症状態などの病的条件下においては、破骨細胞分化ならびに活性化において生理的条件下とは異なる調節機構も機能している可能性が示唆されている。この点に着目して破骨細胞に関する研究を

行うことは、さまざまな炎症性疾患の病態、その結果としての骨破壊を理解する上で極めて重要である。破骨細胞分化因子RANKLシグナルと炎症性サイトカインシグナルをリンクさせる因子としてのTGF- $\beta$ シグナルに着目することにより炎症性骨破壊の本質に迫ろうという発想は独創的である。こうして得られる結果はより病態に即したものであり、RAなどの炎症性疾患のみならず骨粗鬆症などの骨代謝性疾患、原発性や転移性骨腫瘍、ページェット病などの骨破壊性疾患の治療に結びつくこと期待される。またTGF- $\beta$ シグナルの破骨細胞分化への影響を探ることにより、「なぜ破骨細胞は骨でのみ分化するのか」という命題の解明にアプローチすることは、破骨細胞分化を局所でコントロールすることを通して、不要な骨化組織の除去につながる可能性があると考えられる。

### 3. 研究の方法

マウスの長管骨髄から得た破骨細胞前駆細胞を、生存因子 M-CSF と分化因子 RANKL の共在下で培養することで破骨細胞へと分化させる実験系を用い、TGF- $\beta$ シグナルの必須性と役割を調べる。

(1)TGF- $\beta$  受容体の特異的阻害剤

(SB431542 など) の添加、(2)ドミナントネガティブ型 TGF- $\beta$  II 型受容体の遺伝子導入、(3)Smad6, Smad7, c-Ski 等の TGF- $\beta$  シグナル抑制分子の遺伝子導入によって TGF- $\beta$  シグナルを遮断し、RANKL/RANK 下流の破骨細胞分化シグナル伝達に及ぼす影響を調べる。

また、生体内における TGF- $\beta$  抑制の作用を検討するため、マウス頭部皮下へ RANKL を投与することで破骨細胞分化および頭蓋骨骨吸収を誘導する *in vivo* 実験系を確立し、TGF- $\beta$  阻害剤同時投与でどのような影響が生じるかを調べる。

### 4. 研究成果

マウス個体を用いた実験及びマウスから採取した細胞を用いた実験によって、破骨細胞分化に TGF- $\beta$  が必須であることが分かった。

TGF- $\beta$  下流のシグナル伝達経路には Smad 経路と non-Smad 経路が知られているが、これらのうち Smad 経路の活性が破骨細胞分化に重要であることが分かった。

破骨細胞分化因子 RANKL が破骨細胞前駆細胞上の受容体 RANK に結合すると TRAF6-TAB-TAK コンプレックスが細胞内に形成され下流シグナルが活性化されるが、この TRAF6-TAB-TAK コンプレック

ス形成に Smad3 が関与している事を示唆する実験結果を得た。

### 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) 査読有り

Tetsuro Yasui, Yuho Kadono, Masaki Nakamura, Yasushi Oshima, Takumi Matsumoto, Hironari Masuda, Jun Hirose, Yasunori Omata, Hisataka Yasuda, Takeshi Imamura, Kozo Nakamura, and Sakae Tanaka. Regulation of RANKL-induced osteoclastogenesis by TGF- $\beta$  through molecular interaction between Smad3 and Traf6. J Bone Miner Res. 2011 Jul;26(7):1447-56

[学会発表] (計 2 件)

Tanaka Sakae

Epigenetic regulation of osteoclast. 4<sup>th</sup> New York Skeletal Biology and Medicine. (2011 年 4 月 28 日 New York, USA)

Tetsuro Yasui

Involvement of TGF- $\beta$  in osteoclastogenesis. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会(2010 年 7 月 21 日東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

特になし

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

門野 夕峰 (KADONO YUHO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70401065

(2) 研究分担者

田中 栄 (TANAKA SAKAE)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：50282661

安井 哲郎 (YASUI TETSURO)  
東京大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号：30583108  
(H22-23)

(3) 連携研究者  
特になし