

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：学術創成研究費
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17GS0313
 研究課題名（和文） 骨免疫学の創成

研究課題名（英文） Osteoimmunology

研究代表者

高柳 広 (TAKAYANAGI HIROSHI)
 東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授
 研究者番号：20334229

研究成果の概要：骨代謝と免疫学の融合分野である骨免疫学の確立を目指した。特に、骨代謝に関与する細胞と免疫担当細胞の分化・活性化メカニズムならびに相互作用を、網羅的解析手法や新規の遺伝子改変マウスを作成することにより解析し、関節リウマチや骨粗鬆症などの疾患治療に対する分子基盤の確立を行った。

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	97,300,000	29,190,000	126,490,000
2006 年度	115,200,000	34,560,000	149,760,000
2007 年度	116,500,000	34,950,000	151,450,000
2008 年度	109,300,000	32,790,000	142,090,000
2009 年度	102,800,000	30,840,000	133,640,000
総計	541,100,000	162,330,000	703,430,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨免疫学・骨代謝・骨疾患・自己免疫・疾患モデル・破骨細胞・骨芽細胞・リンパ球

1. 研究開始当初の背景

骨代謝学と免疫学は、運動機能と生体防御という全く異なる役割を担う組織を対象とするため、独立した基礎医学系分野として発展してきた。研究代表者らは、関節リウマチ(RA)の骨破壊機序を T 細胞による破骨細胞分化制御の観点から解明し、骨免疫学(osteoimmunology)と呼ばれる新規領域を開拓した。しかし、骨免疫学は極めて広範囲の医生物学的な分野を包括する学際領域であり従来の医生物学の枠組みには相当する分野が存在しない。一方で、医療応用の視点から世界的な競争も激化しており、重点的に研究を進める必要がある。また、これまでの骨免

疫学は、先行する免疫学の知見を骨格系へ応用することで発展してきたが、今後は骨格系細胞から得られたゲノムワイドな知見を利用して新たな骨免疫制御遺伝子の機能を解明する新世代の骨免疫学へと発展すべき時期が到来している。

2. 研究の目的

本研究においては、リンパ球、骨芽細胞、破骨細胞などの細胞間相互作用に関与する液性因子や受容体分子を同定すること、および各細胞が共通に利用する受容体、シグナル伝達分子、転写因子の細胞特異的な機能を解明し、これらが生理的/病的状況においてど

のように変化するかを明らかにすること、遺伝子技術による疾患モデルを作成・解析し、研究成果から得られた知見を用いて新規治療薬の開発基盤を提供することを目的とする。

3. 研究の方法

トランスクリプトーム解析・プロテオーム解析を利用した骨格系細胞発現遺伝子の網羅解析とその制御機構の解明、骨免疫細胞間相互作用(破骨細胞-骨芽細胞、リンパ球-破骨細胞等)に関する膜型蛋白質(リガンド・受容体系・アダプター分子)ならびに下流シグナルを担う分子の同定と相互作用の分子機序の解明、細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスの作成による個体レベルでの機能解析と骨免疫マウスデータベースの構築、骨免疫疾患への応用を視野に入れた治療モデル実験、等により骨免疫学の深化を目指した研究を実施する。

4. 主な研究成果

(1) 骨免疫細胞間相互作用の解明

RA において破骨細胞による骨破壊を誘導する T 細胞サブセットを解明するため、*in vitro* 破骨細胞分化系に各 T 細胞サブセットを共存培養させ、自己免疫応答に重要な Th17 細胞が、RA において骨破壊を誘導する破骨細胞誘導性 T 細胞であることを明らかにした。またヒトの RA 滑膜における破骨細胞分化因子 RANKL の発現量は Th17 細胞が産生するサイトカインの発現量と相関性が高いことを見出した。Th17 細胞は局所炎症を惹起するとともに、滑膜線維芽細胞上の RANKL を誘導することで破骨細胞分化を亢進させる T 細胞であることをつきとめた。

cathepsin K は破骨細胞が特異的に分泌する骨基質分解酵素であり、その阻害は骨量減少性疾患に対する有望な治療戦略とされていることから、経口投与可能な cathepsin K 阻害剤 NC-2300 を開発した。RA を発症したラットに本薬剤を経口投与したところ、関節炎における骨破壊および関節の腫脹が抑制された。免疫系細胞の中で樹状細胞に cathepsinK が発現していることを見出し、cathepsinK は樹状細胞の TLR9 シグナルを制御し、Th17 細胞分化を誘導するサイトカイン産生に重要であることを解明した。これらの成果は、RA 骨破壊における Th17 細胞の重要性を明らかにし、Th17 細胞や Th17 細胞が産生するサイトカイン等を標的とした治療法が RA 骨破壊に有効であることを示したものである。

(2) 骨免疫細胞の分化を司る分子メカニズムの解明

(i) Th17 細胞分化メカニズムの解明

Th17 細胞で発現が高い転写因子として

I κ B ζ を見出し、I κ B ζ 欠損マウスを用いた解析を行ったところ、I κ B ζ は Th17 細胞分化のマスター転写因子 ROR と協調的に働いて IL-17 の産生に必須な分子であることを解明した。さらに、I κ B ζ 欠損マウスは自己免疫疾患のひとつである多発性硬化症モデルにおいて抵抗性を示したことを見出し、I κ B ζ を標的とした治療法が RA を含む自己免疫疾患に有効であることを明らかにした。

(ii) 破骨細胞分化メカニズムの解明

破骨細胞分化には RANKL 受容体 RANK からのシグナルのほか、骨芽細胞や破骨細胞前駆細胞が発現するリガンドに対する免疫グロブリン様受容体からの共刺激シグナルが必須である。この細胞間相互作用を担う免疫グロブリン様受容体のシグナル伝達経路を中心に解析を行った。

破骨細胞分化過程で高い発現を示す Tec チロシンキナーゼ Btk と Tec に注目した。両遺伝子欠損マウスを解析したところ、Btk と Tec は破骨細胞分化に必須であった。さらに Tec チロシンキナーゼは免疫グロブリン様受容体からのシグナル依存的に SLP アダプター分子、Ca²⁺シグナルの誘導に重要な PLC γ と複合体形成を介して破骨細胞分化のマスター転写因子 NFATc1 の活性化を担っていることを見出した。また、Ca²⁺シグナルは NFATc1 の活性化を担う一方で、calmodulin kinase (CaMK)-CREB 経路の活性化を介し、破骨細胞分化に必須な c-fos の転写誘導や破骨細胞特異的な遺伝子発現を制御している分子メカニズムを解明した。さらに、Tec チロシンキナーゼや CaMK の阻害剤が関節リウマチ骨破壊や骨粗鬆症等に対して有効であることを示し、新たな骨破壊疾患治療薬の基盤を提供した。

生理的条件下だけでなく、病的環境下における免疫グロブリン様受容体シグナルの重要性についても解析を行った。RA では炎症性サイトカイン TNF α 産生が上昇し、破骨細胞の異常な活性化が認められるが、TNF α は免疫グロブリン様受容体の発現を亢進させることにより共刺激シグナルを増強させ、破骨細胞分化亢進を誘導していることも明らかにした。

この他、転写抑制因子である Blimp-1 が、NFATc1 の発現を負に制御する IRF8 や MafB といった転写因子群の発現抑制を介して破骨細胞分化を制御していることや、MHC クラス I の受容体である NK 受容体が破骨細胞分化を正に制御していることも解明した。

本研究における以上の成果により骨免疫学のパイオニアとして世界の骨免疫学分野を牽引し、Nature Review Immunology や Nature Review Rheumatology をはじめとした総説を著すとともに、国際骨免疫学会の主催や国内外の学会における骨免疫学のセッションを開催するなど、骨免疫

学の創成・発展に大きく貢献した。

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48件)

原著論文

Okamoto K., Iwai Y., Oh-hora M., Yamamoto M., Morio T., Aoki K., Ohya K., Jetten A.M., Akira S., Muta T., and Takayanagi H.: IκBζ regulates T_H17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. **Nature**. 464, 1381-1385 (2010)

Hayashi M., Nakashima T., Kodama T., Makrigiannis A P., Toyama-Sorimachi N., Takayanagi, H.: Ly49Q, an ITIM-bearing NK receptor, positively regulates osteoclast differentiation. **Biochem Biophys Res Commun**. 393, 432-438 (2010)

Nishikawa, K., Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kato, S., Kodama, T., Takahashi S., Calame K., and Takayanagi, H.: Blimp1-mediated repression of negative regulators is required for osteoclast differentiation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 107(7), 3117-22. (2010)

Shinohara, M., Koga, T., Okamoto, K., Sakaguchi, S., Arai, K., Yasuda, H., Takai, T., Kodama, T., Morio, T., Geha, R. S., Kitamura, D., Kurosaki, T., Ellmeier, W. and Takayanagi, H. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. **Cell**. 132, 794-806 (2008)

Asagiri, M., Hirai, T., Kunigami, T., Kamano, S., Gober, H.J., Okamoto, K., Nishikawa, K., Latz, E., Golenbock, D.T., Aoki, K., Ohya, K., Imai, Y., Morishita, Y., Miyazono, K., Kato, S., Saftig, P. and Takayanagi, H. Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. **Science**. 319, 624-627 (2008)

Ochi, S., Shinohara, M., Sato, K., Gober H.J., Koga, T., Kodama, T., Takai T., Miyasaka N. and Takayanagi H. Pathological role of osteoclast costimulation in arthritis-induced bone loss. **Proc Natl Acad Sci USA**. 104, 11394-11399 (2007)

Sato, K., Suematsu, A., Nakashima, T., Takemoto-Kimura, S., Aoki, K., Morishita, Y., Asahara, H., Ohya, K., Yamaguchi, A., Takai, T., Kodama, T., Chatila, T. A., Bito, H. and

Takayanagi, H. Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway. **Nat Med**. 12,1410-1416 (2006)

Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, D. J. and Takayanagi, H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. **J Exp Med**. 203, 2673-2682 (2006)

Asagiri, M., Sato, K., Usami, T., Ochi, S., Nishina, H., Yoshida, H., Morita, I., Wagner, E. F., Mak, T. W., Serfling, E., and Takayanagi, H.: Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. **J Exp Med** 202, 1261-1269 (2005)

Koga, T., Matsui, Y., Asagiri, M., Kodama, T., de Crombrughe, B., Nakashima K. and Takayanagi, H.: NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. **Nat Med** 11, 880-885 (2005)

英文総説

Takayanagi, H.: Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone. **Nat Rev Rheumatol**. 5(12),667-76 (2009)

Negishi-Koga, T. and Takayanagi, H.: Ca²⁺-NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation. **Immunological Reviews**. 231, 241-256 (2009)

Takayanagi, H. Osteoimmunology : shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. **Nat Rev Immunol**. 7, 292-304 (2007)

[学会発表](計114件)

高柳 広 : Rheumatology Association, R.O.C.(Taiwan), 2009.12.6, Yilan, Taiwan

高柳 広 : ACR/ARHP Scientific Meeting, 2009.10.18, Philadelphia, U.S.A.

高柳広: The Bone & Teeth Gordon Research Conference, 2009.7.15, Maine, U.S.A.

高柳 広 : The 9th World Congress on Inflammation, 2009.7.8-10, Tokyo

高柳 広 : The 3rd Global COE International Symposium, Tokyo Medical and Dental University, 2009.6.10, Tokyo

高柳広: The 66th KSBMB Annual Meeting, World Trade Center, 2009.5.13, Seoul, Korea

高柳広: The 3rd New York Skeletal Biology and Medicine Conference, Mount Sinai School of Medicine, 2009.4.30, New York, U.S.A.

高柳広: Annual Meeting of Korean Endocrine Society 2008.11.8 Jeju, Korea

高柳広: 2008 ACR Basic Research conference, 2008.10.24, San Francisco

高柳広: The 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology 2008.9.23, Yokohama

高柳広: 2nd International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems, 2008.6.11, Rhodes, Greece

高柳広: International Bone & Mineral Society Davos Workshops, 2008.3.10, Davos, Switzerland

高柳広: Meet-the-Professor Session, The 29th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2007.9.19, Honolulu, U.S.A.

高柳広: 2nd Conference on Skeletal Biology and Medicine, 2007.4.26, New York, U.S.A.

Hiroshi Takayanagi: INSERM The 2nd Annual Meeting of PRO-A, Institut Curie. 2007.1.25, Paris, France

高柳広: International Conference on Progress in Bone and Mineral Research on the occasion of the Awarding of the 2006 International Research Prize, 2006.11.17, Vienna, Austria

高柳広: 3rd IOF Asia-Pacific Regional Conference on Osteoporosis and 16th Annual Meeting of the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society, 2006.10.23, Port Douglas, Australia

高柳広: The 28th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2006.9.15, Philadelphia, U.S.A.

高柳広: 1st International Conference on Osteoimmunology, 2006.5.31, Crete, Greece

高柳広: International Symposium on Osteoporosis, Korean Society of Osteoporosis,

2006.4.8, Seoul, Korea

高柳広: 5th Global Arthritis Research Network (GARN), 2005.9.16, Vienna, Austria

高柳広: The 2005 Gordon Conference on Bones and Teeth, 2006.7.11, University of New England, U.S.A.

高柳広: European Calcified Tissue Society and International Bone and Mineral Society (ECTS, IBMS), 2005.6.26, Geneva, Switzerland

高柳広: Annual European Congress of Rheumatology "EULAR 2005", 2005.6.8, Vienna

〔図書〕(計7件)

高柳広: 5.骨・関節 - b.破骨細胞、炎症・再生医学事典、247-250、2009

Takayanagi, H.: Cytokine and growth factor regulation of osteoclastogenesis, The Skeletal System, 263-275 (2009) ---Review, Book

高柳広: Osteoimmunology と破骨細胞 医学部のあゆみ 別冊 骨粗鬆症-臨床と研究の最新動向 37-45、2008

高柳広: 骨免疫学と疾患、免疫応答と免疫病態の統合的分子理解 (編者: 谷口維紹、山本一彦 南光堂) 217-228、2007

篠原正浩、高柳広: NFATc1 による破骨細胞分化のメカニズム、Annual Review 免疫 2007、317-325、2006、中外医学社 編集: 奥村康、平野俊夫、佐藤昇志

高柳広: RA 関節破壊における破骨細胞の役割、リウマチ・膠原病最新トピックス 49-54、2005、診断と治療社 (東京)、竹原和彦、佐藤伸一、桑名正隆 編著

高柳広 <編集> 骨研究がわかる、実験医学 羊土社 (東京)、2005年8月1日発行

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.osteimmunology.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高柳 広 (TAKAYANAGI HIROSHI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 20334229

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

篠原 正浩 (SHINOHARA MASAHIRO)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60345733

中島 友紀 (NAKASHIMA TOMOKI)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00346959