

## 研究課題別 事後評価結果

1. 研究課題名： 破骨細胞分化シグナルに基づく自己免疫性関節炎の制御

2. 研究代表者： 高柳 広（東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授）

### 3. 研究内容及び成果

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未だ確立されていない。本研究では、関節炎における破骨細胞分化の分子メカニズムの全貌を解明するために、転写因子NFATc1(nuclear factor activated T-cells, cytoplasmic 1)を中心とした制御機構の解析を行い、この過程で明らかになった分子機構を利用して骨破壊性疾患の治療の検討を行った。特に、T細胞活性化が破骨細胞分化を誘導するメカニズムの解析、RANKL(receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B ligand)シグナルの下流に關与する転写因子の解析、免疫グロブリン様受容体とカルシウムシグナル活性化メカニズムの解析等を行った。

本研究の成果を以下に示す。

- 1) NFATc1遺伝子が破骨細胞分化にとって必須であるかどうかを個体レベルで証明するため、破骨細胞を欠損するFos(FBJ osteosarcoma oncogene)ノックアウトマウスに対してNFATc1遺伝子欠損マウスの胎児肝臓細胞に含まれる造血幹細胞を移植して作用を調べた。さらに、Fosノックアウトマウスの胚盤胞胚にNFATc1遺伝子欠損ES細胞を注入して作製したキメラマウスを解析した。どちらの方法においても大理石骨病が観察され、NFATc1欠損細胞が破骨細胞に分化出来ないことが生体レベルで証明された。この結果により、破骨細胞を制御するためにはNFATc1を標的とすることが極めて有効な方法であることが示された。
- 2) 破骨細胞分化過程におけるNFATc1およびNFATc2のmRNA発現を調べた結果、NFATc1のみが激しく増加し、NFATの核移行を抑制するカルシニューリン阻害剤FK506によって発現増強の抑制が強く見られたことから、NFATc1の発現増強はNFAT自身の作用に依存していることが示唆された。また、NFATc1は破骨細胞分化過程においてエピジェネティックな制御によって自分自身のプロモーターに結合して選択的な自己増幅機構にスイッチを入れることにより、破骨細胞分化において必要不可欠な役割を果たす因子であることが解明され、不可逆的な細胞分化のプロセスを理解するための重要な手がかりを提供する成果となった。

- 3) カルシニューリン阻害剤が骨粗鬆症の治療に応用可能かどうかを検討した結果、カルシニューリン阻害剤FK506を正常なマウスに投与すると、破骨細胞数が減るにもかかわらず骨量が減少し骨粗鬆症を呈することが明らかになった。そこで、破骨細胞以外の骨代謝細胞である骨芽細胞への影響を詳細に解析した結果、骨芽細胞による骨形成が低下したことが骨粗鬆症の原因であったことが示された。このように、NFATを介した転写制御機構は免疫細胞だけではなく、破骨細胞と骨芽細胞といった骨代謝制御細胞においても非常に重要な役割を担うことが明らかとなり、破骨細胞による骨吸収を特異的に抑制するためには、細胞特異的なdrug delivery systemの開発等が必要であることが判明した。
- 4) Th1、Th2、Treg(Regulatory T Cell)に加え、最近自己免疫疾患での重要性が注目されるTh17細胞を培養系で分化させ、破骨細胞分化への作用を詳細に検討した結果、Th1およびTh2細胞はそれぞれIFN- $\gamma$ およびIL-4の産生を介して破骨細胞分化を強く抑制し、Treg細胞は破骨細胞分化に対して顕著な作用を示さず、Th17細胞は主に破骨細胞分化支持細胞におけるRANKL誘導を介して破骨細胞形成を促進することが明らかになった。これらにより、さきがけ研究を開始するきっかけとなったT細胞による破骨細胞制御における疑問の多くが解決され、炎症性骨破壊の病態がほぼ完全に解明された。Th17細胞の分化や増殖を担うIL-6、IL-23、IL-17等のエフェクター分子が今後関節炎の重要な治療標的となる可能性が高いことが明らかになった。
- 5) カルシウムシグナルを媒介するカルモジュリン結合タンパク質としてカルシニューリンと並んで重要なタンパク質であるCaMK (calcium/calmodulin-dependent protein kinase) と転写因子CREB(cAMP responsive element binding protein)の、骨代謝における意義と骨破壊の治療標的としての可能性を検討した。その結果、RANKL刺激はCaMKIV(CaMK type IV)によるCREBのリン酸化を引き起こし、CREBは破骨細胞分化の必須転写因子であるc-Fosの誘導を介して分化を制御する一方、NFATc1と協調して破骨細胞特異的遺伝子の転写誘導にも関わり、二つの面から破骨細胞性骨吸収を制御することが明らかとなった。また、CaMK阻害剤は卵巣摘出骨粗鬆症モデル動物や炎症性骨破壊モデル動物の骨破壊を抑制する効果を持ち、今後の新たな治療法開発の可能性が示唆された。

このように、自己免疫性関節炎における破骨細胞の活性化機構をT細胞免疫系との関係から解明し、さらに分化過程におけるシグナル伝達機構の詳細を解析した。これにより関節炎性骨破壊病態の全貌が明らかになり、今後の新たな治療法開発に道を開く成果を上げた。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

短期間で研究目標の達成に向けて着実に研究を推進し、その研究成果をインパクトのある雑誌に多数発表している。また、口頭発表数についても特筆できる。新しい治療標的を提示したことから、今後は研究成果が特許等の知財につながることを期待される。

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

自己免疫性関節炎において破骨細胞分化を誘導する細胞が、従来考えられていたTh1型T細胞ではなくTh17型T細胞であることを解明し、さらに転写因子NFATc1が破骨細胞分化のマスター遺伝子であることを明らかにしたことは疾患の理解に貢献するだけでなく、今後疾患対策を考える上で重要な分子的基礎を築いたものとして高く評価される。NFATの上流に位置するカルモジュリン結合タンパクとCREB転写因子の検討は、新たな治療標的の可能性を示唆している。本成果は、破骨細胞分化に関わるシグナル分子についての分子生物学的な基礎研究として、医学的応用面への貢献が極めて大きい。

##### 4-3. その他の特記事項(受賞歴等)

研究成果が数多くの新聞発表として取り上げられ、日本学士院学術奨励賞をはじめ若手研究者に対する多くの賞を得ていることは特筆出来る。

###### 【受賞歴】

第1回(平成16年度)日本学術振興会賞 2005.3.22

第1回(平成16年度)日本学士院学術奨励賞 2005.3.22

科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞受賞 2005.4.20

文部科学省・科学技術政策研究所が選ぶ科学技術への顕著な貢献 in 2005 [ナイスステップな研究者] 2005.12.27

東京テクノ・フォーラム 21 ゴールド・メダル賞 2006.4.12

オーストリア骨代謝学会 Austrian Society for Bone and Mineral Research(AuSBMR) and Ludwig Boltzmann Institute of Osteology、2006 International Research Prize 2006.11.17