

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究終了報告書

研究課題
「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」

研究期間：平成16年12月 1日～
平成19年 3月31日

高柳 広
(東京医科歯科大学、教授)

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. 研究実施の概要

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。これまでの研究で、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見いだした。PRESTOにおいて、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析した。その結果、転写因子 NFATc1 が破骨細胞分化のマスターレギュレーターであること、NFATc1 の活性化には免疫グロブリン様受容体が必須であることを解明した。そこで SORST では、PRESTO の成果を発展させ、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 を中心とした制御機構の解明を行い、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応用を視野に入れた検討を行った。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 シグナルの下流で活性化される種々の転写因子が、いかに NFATc1 の誘導や転写活性化機構に関与しているのか、また、免疫グロブリン様受容体とカルシウムシグナル活性化のメカニズムの解析などを行い、関節炎を増悪させる破骨細胞の分化シグナル研究において画期的な成果をあげること成功した。

PRESTO における細胞レベルでの研究で、NFATc1 が破骨細胞分化において鍵となる転写因子であることを明らかにしていたが、NFATc1 遺伝子欠損マウスは、胎性致死であるため、個体レベルでの骨の解析が不可能である。そこで、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ことは我々に残された大きな課題であった。胎生致死となる遺伝子改変マウスにおいてリンパ球の解析を行う場合、Rag 欠損マウスに造血幹細胞移植を行ってリンパ球の解析を行う手法が確立されている。この方法を破骨細胞に応用し、破骨細胞を欠損する Fos 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その作用を検討した。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 細胞を注入しキメラマウスを解析した。どちらの方法においても、NFATc1 遺伝子欠損キメラマウスは大理石骨病を呈し、NFATc1 欠損細胞が破骨細胞に分化でき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、NFATc1 を標的とすることがきわめて有効な方法であることが示された。

NFATc1 の破骨細胞分化における必須性の証明によって、「構造のよく似た類縁分子である NFATc2 が破骨細胞分化における NFATc1 の機能をなぜ代替できないのか」という新たな疑問が提示された。T 細胞のサイトカイン遺伝子の制御においては NFATc1 と NFATc2 は相補的な機能をもつからである。破骨細胞分化過程における NFATc1, NFATc2 の mRNA 発現を調べると、前者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 によって強く発現増強の抑制がみられた。このことから、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。実際に、破骨細胞分化過程における NFATc1 プロモーターと NFATc2 プロモーターに結合する因子をクロマチン IP にて解析すると前者のみに NFATc1 が動員され、その選択的動員にはヒストンアセチルtransferase 活性をもつ転写 cofactor である CBP の関与が見いだされた。NFATc1 は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って、必須性を決めていることが解明され、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。

NFATc1 の破骨細胞での重要性が明らかになったことから、カルシニューリン阻害剤が骨粗鬆症の治療に応用が可能かどうかを検討した。意外なことに、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、骨量が減少し骨粗鬆症が増悪することが明らかに

なった。この時、破骨細胞の数は減少しており、骨吸収は低下していたため、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検討した。その結果、カルシニューリン阻害剤によって骨芽細胞における NFAT 活性が低下したため、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解明された。骨芽細胞においては、NFATc1, NFATc2 が同じレベル発現しており、骨形成に重要な転写因子 Osterix と協調して骨形成を制御することを明らかにした。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になり、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 を開発したり、破骨細胞特異的な NFATc1 自己増幅経路などを標的とする必要があることがわかった。

関節リウマチでは、炎症滑膜にヘルパーT 細胞が集積することは知られていたが、なぜこのような T 細胞活性化が骨吸収細胞である破骨細胞を誘導するのか、真の骨破壊性 T 細胞サブセットはどのような性格のものかは長らく不明であった。従来関節リウマチは Th1 型の疾患であると考えられてきたにも関わらず、IFN- γ の強い破骨細胞分化抑制作用を考えると骨破壊を引き起こす T 細胞が Th1 細胞であるとは考えにくかった。そこで、Th1, Th2, Treg に加え、最近自己免疫疾患での重要性が注目される Th17 細胞を培養系で厳密に分化させて、破骨細胞分化への作用を詳細に検討した。その結果、Th1, Th2 細胞はそれぞれ IFN- γ , IL-4 を介して破骨細胞分化を強く抑制することが見いだされた。一方、Treg 細胞は破骨細胞分化に対する作用があまり顕著でなかった。IL-23 によって誘導される Th17 細胞は、破骨細胞分化に促進的であり、特に骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系を用いると、リコンビナントの RANKL がなくても破骨細胞分化を誘導することができたことから、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。IL-17 や IL-23 の遺伝子欠損マウスにおいては炎症性骨破壊に伴う破骨細胞形成が著しく低下しており、Th17 細胞が、炎症と骨破壊を結びつける破骨細胞誘導性 T 細胞サブセットであることが解明された。本研究により、PRESTO 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という研究領域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, Th17 細胞が産生する IL-17 など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。

破骨細胞分化における NFAT の重要性は、その上流に位置するカルシウムシグナルの重要性にも光をあてた。そこで、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としてカルシニューリンと並んで重要なタンパクである、Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase (CaMK) とその下流で活性化される転写因子 CREB 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。CaMKIV ノックアウトマウスの骨組織を調べたところ、WT マウスと比べて破骨細胞数が減少しており、それに伴って骨量が増加していることが明らかになった。さらに詳細な解析により、RANKL 刺激は、CaMKIV 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で、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相性に破骨細胞性骨吸収を制御することが明らかになった。また、CaMKIV 阻害剤は卵巣摘出骨粗鬆症モデルや炎症性骨破壊モデルに治療効果をもち、今後の新たな治療標的として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明したことにより、関節炎性骨破壊病態の全貌を解明し、今後の新たな治療法開発にさまざまな道を開く成果をあげた。

3. 研究構想

【破骨細胞内シグナル伝達経路の網羅解析と NFATc1 転写複合体の構成分子の同定】破骨細胞分化因子 RANKL で刺激した細胞内におけるシグナル伝達経路を解明するために、刺激前後における遺伝子発現解析をゲノムワイドに行う。また、転写因子 NFATc1 が形成する転写因子複合体を解明するため、タグ付き NFATc1 を過剰発現させた細胞から NFATc1

タンパク複合体を精製し、質量分析により結合タンパクの同定を行う。

【破骨細胞分化の必須遺伝子欠損細胞を用いたトランスクリプトーム解析】

これまでに、ノックアウトマウスが破骨細胞分化障害により大理石骨病を呈することから、破骨細胞分化の必須因子であることが明らかになっている分子として、TRAF6 と c-Fos があげられる。そこで、これらのノックアウトマウスの破骨細胞前駆細胞を RANKL 刺激した際のトランスクリプトーム解析を行うことで、この分子機構の詳細な解明を進める。

【NFATc1 の転写標的分子の同定】NFATc1 を欠損した細胞やカルシニューリン抑制剤などで処理した細胞等を解析し、遺伝子制御情報とタンパク発現量の変化や修飾の情報をもとに、転写標的分子を明らかにする。

【遺伝子改変マウス作成による新規分子の機能解析】上記の検討により、明らかになった新規シグナル経路に関わる分子の生体レベルでの意義を明らかにする。機能が不明の既知分子や、新規にクローニングした遺伝子の生体レベルにおける機能を解析するために、当該遺伝子を過剰発現したトランスジェニックマウスや遺伝子欠損マウスを作成する。作成した遺伝子改変動物の骨組織の病理学的、骨形態計測等の検索を行う。これらの動物由来の破骨細胞の分化や機能を培養系で解析し、生化学的な検討を加える。遺伝子改変マウスの解析から明らかになった機能をもとにして、治療標的分子としての可否を決定する

【関節炎性骨破壊の動物モデルを利用した治療効果の検討】

LPS 誘導性骨破壊モデル、コラーゲン誘導関節炎などの炎症性骨破壊モデルを用いて、明らかにした治療標的分子を抑制することで検討を加える。ドミナントネガティブ型分子や抑制分子の遺伝子導入、抗体療法、低分子薬剤による治療等を総合的に検討して新規治療への道を開く。

4. 研究実施内容

(1)実施の内容

【1】NFATc1 による OSCAR 遺伝子制御の解析

NFAT の活性化に関わるカルシウムシグナルに関与する免疫受容体の中で、OSCAR と TREM-2 に注目して、NFAT による転写制御の差異について検討した。OSCAR と TREM-2 のプロモーターを同定し、その制御機構を解析した。NFATc1 遺伝子欠損細胞を利用した。

【2】破骨細胞分化における NFATc1 必須性の解析

破骨細胞分化における NFATc1 の必須性を解明するために、胎児肝臓細胞由来の造血幹細胞を破骨細胞欠損マウスに移植する方法、NFATc1 欠損 ES 細胞を胎盤胞胚に注入する方法で個体レベルでの意義を検討した。また、NFATc1 プロモーターと NFATc2 プロモーターの制御機構を解析することで、NFATc1 遺伝子の制御機構の解明と破骨細胞分化における必須性の解析を試みた。

【3】骨芽細胞による骨形成における NFAT の解析

NFAT 阻害剤をマウスに投与し骨の解析を行うことで、生体レベルで NFAT を抑制した場合に見られる反応を解析した。特に、骨芽細胞において NFAT と結合する分子を中心に解析し、機能解析を進めた。NFATc1 ノックアウト細胞および NFATc2 ノックアウトマウスを用いた検討を行った。

【4】CaMKIV-CREB 経路による破骨細胞制御の解析

CaMKIV ノックアウトマウスを用いて骨代謝における意義を解析し、破骨細胞分化における RANKL 刺激による CREB やその下流因子のシグナル応答の解析を試みた。

【5】破骨細胞誘導性 T 細胞の探索

種々のヘルパーT細胞を用いて破骨細胞分化への作用を検討した。特に、IL-17, IL-23 の関与をノックアウトマウスを用いて検討した。

【6】抗リウマチ薬による骨破壊抑制効果の作用機序の解析

現在臨床で使用されている抗リウマチ薬を破骨細胞分化系に添加し、作用機序を解析した。

(2)得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

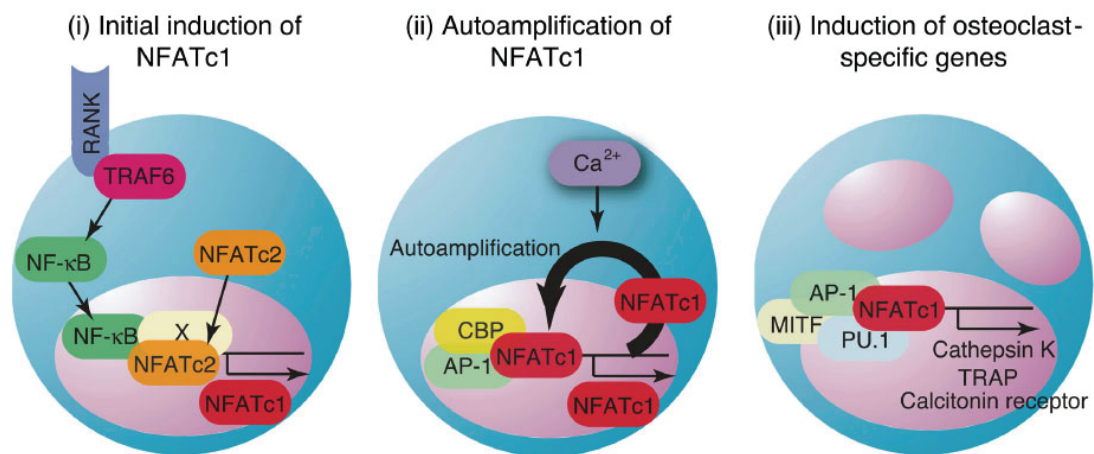
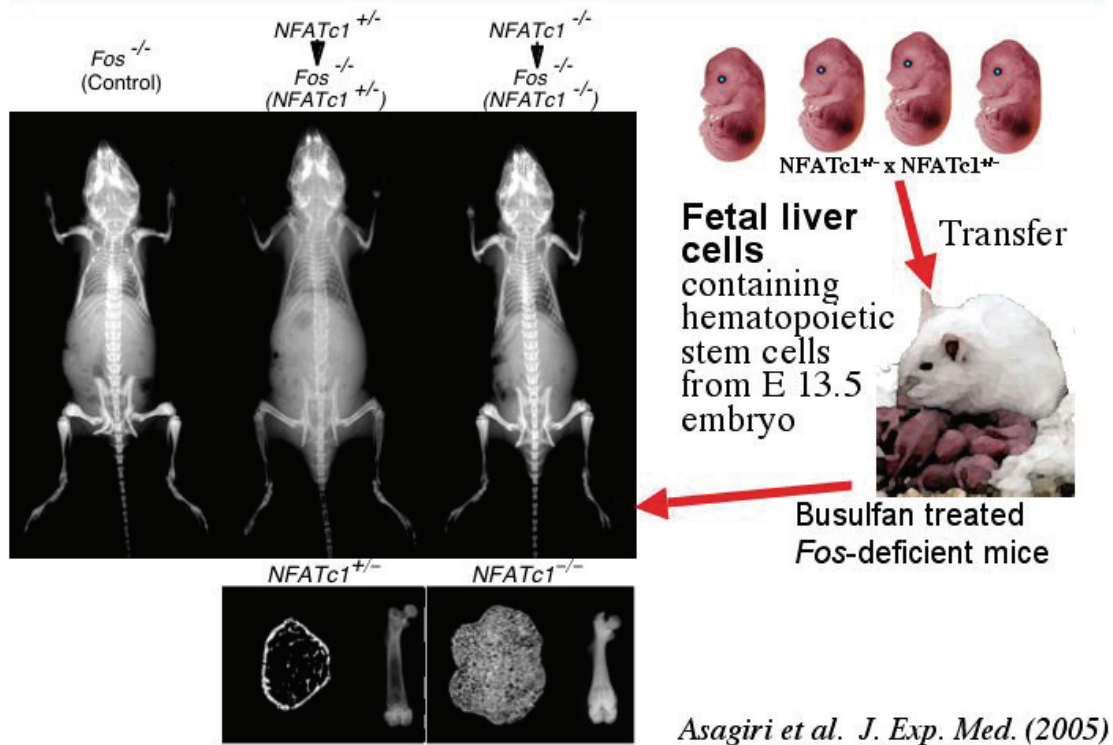
【1】NFATc1 による OSCAR 遺伝子制御による破骨細胞分化におけるポジティブフィードバック制御機構の解明 (J Biol Chem, 280:32905, 2005)

これまでに転写因子 NFATc1 が破骨細胞特異的な遺伝子発現を誘導することで、成熟破骨細胞へと分化させるマスター転写因子としての役割を持つことを明らかにしてきた。しかし、破骨細胞分化において必須である共刺激受容体の発現制御と NFATc1 との関係は不明であった。本研究では、破骨細胞に発現する共刺激受容体 OSCAR と TREM2 遺伝子の破骨細胞分化過程における mRNA 発現とタンパク発現を経時的に解析するとともに、プロモーターを同定してその転写因子による制御機構を解析した。そして、破骨細胞分化過程で発現量が上昇する免疫受容体 OSCAR は、NFATc1 の標的遺伝子として制御を受けているのに対して、破骨細胞分化過程で発現量が大きく変わらない TREM2 は、NFATc1 非制御下にあることを明らかにした。OSCAR 遺伝子は、NFATc1、PU.1 や MITF より成る転写複合体によって発現制御を受けており、共刺激受容体を制御する転写因子複合体が解明された。さらに、OSCAR は NFATc1 によって制御されると同時に、カルシウムシグナルを介して NFATc1 をさらに活性化するため、破骨細胞分化において正のフィードバックループを形成して不可逆的な分化の推進に強く寄与することが判明した。このようなポジティブフィードバック機構は分化の不可逆的な推進に寄与するだけでなく、阻害標的としても効率が良いため、新たな治療戦略を開発する上でも重要な知見を提供することとなる。

【2】破骨細胞分化における NFATc1 必須性の解明 (J Exp Med, 202:1261, 2005)

転写因子 NFATc1 は破骨細胞分化に必須であるが、相同性の高いファミリー分子である NFATc2 は NFATc1 の欠損を代償できない。しかし、そのメカニズムは不明であった。破骨細胞分化因子 RANKL の刺激による破骨細胞分化過程において、NFATc1 と NFATc2 の mRNA 発現の変動を解析すると、前者は発現が大きく誘導されるが後者の発現は低いまま一定であった。そこで、NFATc1 および NFATc2 遺伝子のプロモーターを同定してプロモーターアッセイやクロマチン免疫沈降実験によって、その制御機構を解析した。その結果、破骨細胞分化の初期過程では、NFATc2、NF- κ B より形成される転写因子複合体が NFATc1 初期誘導に関わっていた。一方、細胞分化の進行に伴い、NFATc1 自身が c-Fos と複合体を形成して NFATc1 プロモーターに結合し、NFATc1 の自己増殖が生じることが明らかとなった。また、NFATc1 の特異的な自己増殖は、プロモーター配列上の NFAT 結合配列の有無で決定されるのではなく、CBP や PCAF により構成されるクロマチンリモデリング因子が NFATc1 遺伝子のプロモーターに特異的に動員されることで実現されていた。本研究により、エピジェネティックなクロマチンの制御機構を介した NFATc1 遺伝子発現の自己増殖が破骨細胞分化決定することが解明された。この結果により、破骨細胞を制御するために、NFATc1 を標的とすることがきわめて有効な方法であることが示された。また、自己増幅機構にスイッチを入れることによって、必須性を決めていることが解明され、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。

NFATc1の破骨細胞分化における必須性のin vivoでの証明

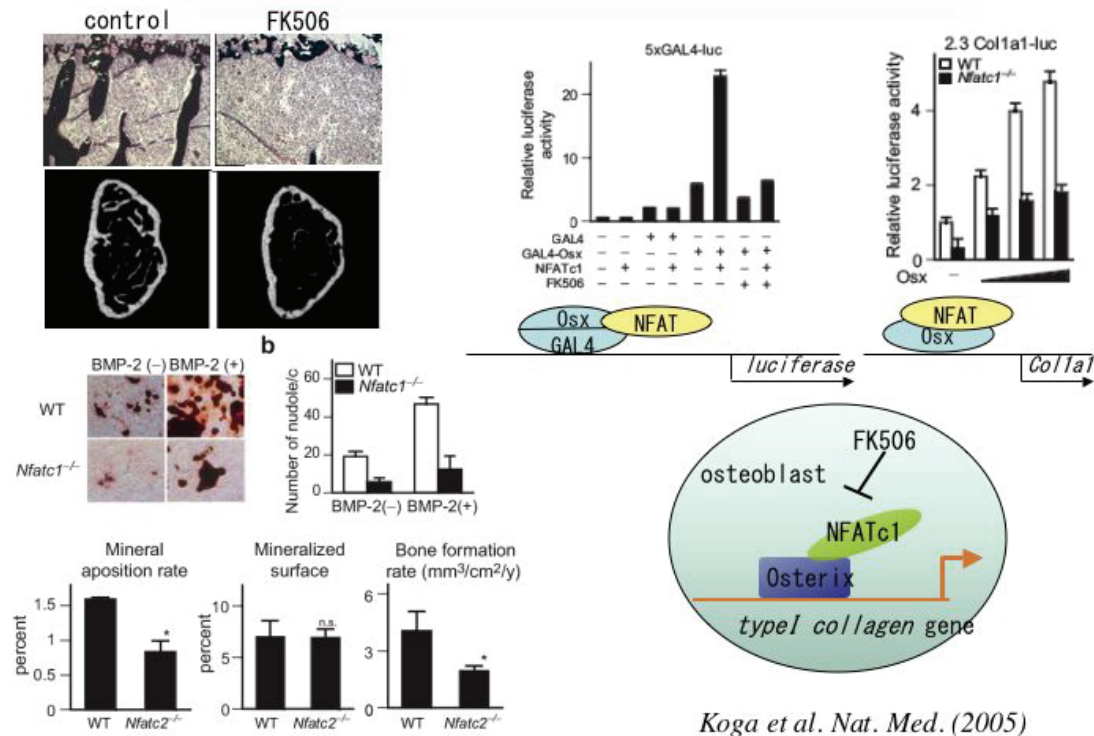


【3】骨芽細胞による骨形成における NFAT の重要性 (Nat Med, 11:880, 2005)

破骨細胞以外の骨格系細胞における NFAT の役割に関しては、ほとんど明らかにされていない。我々は、NFAT の強力な阻害薬である FK506 の生体への投与によって、破骨細胞分化が顕著に抑制されるばかりでなく、骨芽細胞による骨形成が低下することを見いだした。同様に、NFATc1 欠損細胞では骨芽細胞分化が障害され、NFATc2 欠損マウスでも骨芽細胞による骨形成が低下していた。また、FK506 処理した骨芽細胞における遺伝子の網羅解析の結果、ALP を除く多くの骨芽細胞特異的遺伝子群の mRNA 発現が低下することが明らかになった。さらに、NFAT による骨芽細胞分化制御のメカニズムを解析した結果、骨芽細胞による骨形成に重要な基質タンパクである I 型コラーゲンのプロモーターが、骨芽細胞分化の必須転写因子 Osterix と NFAT によって協調的に制御されることが明らかとなった。本成果によって、NFAT 転写因子ネットワークの骨芽細胞における重要性が確立されただけでなく、NFAT が細胞種特異的に標的遺伝子を決めるメカニズムとして、NFAT を中心とした転写因子複合体の違いにあることが示唆された。NFAT を介した転写制御機

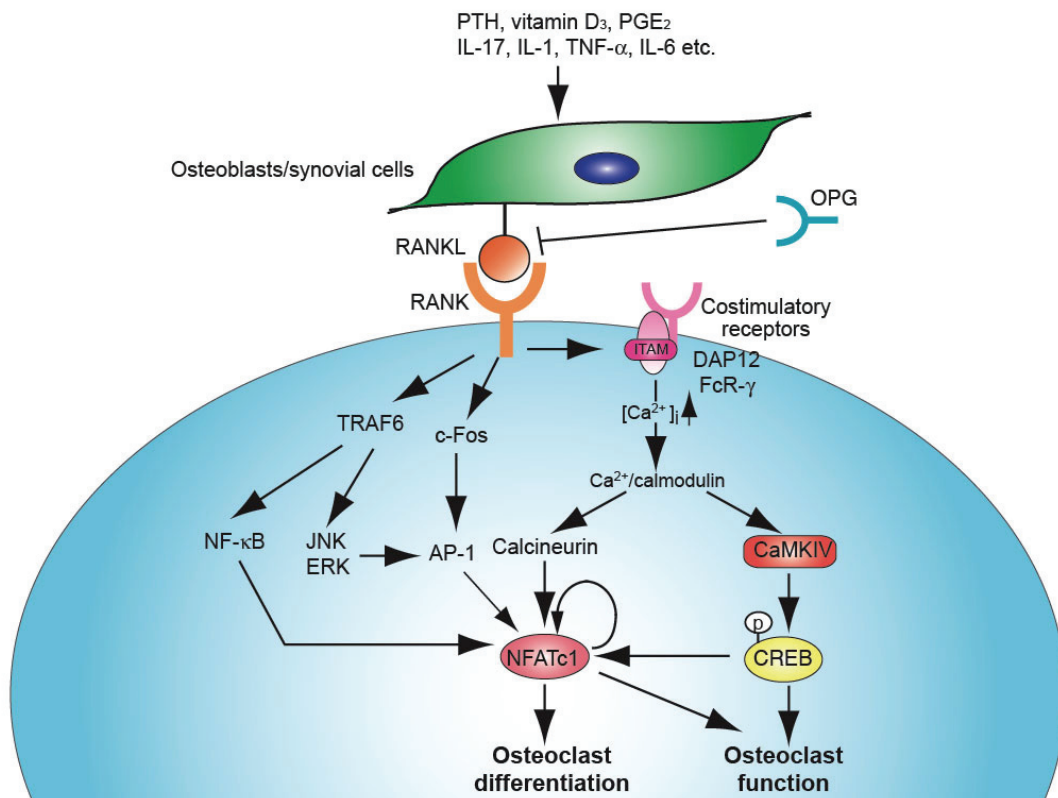
構は、免疫細胞だけでなく、破骨細胞と骨芽細胞といった骨代謝制御細胞においても非常に重要な役割を担うことが明らかになり、破骨細胞による骨吸収を特異的に抑制するためには、細胞特異的な drug delivery system を開発したり、破骨細胞特異的な NFATc1 自己増幅経路などを標的とする必要があることがわかった。

NFATは骨芽細胞マスター転写因子Osterixと協調的に作用し、I 型コラーゲン遺伝子を活性化する



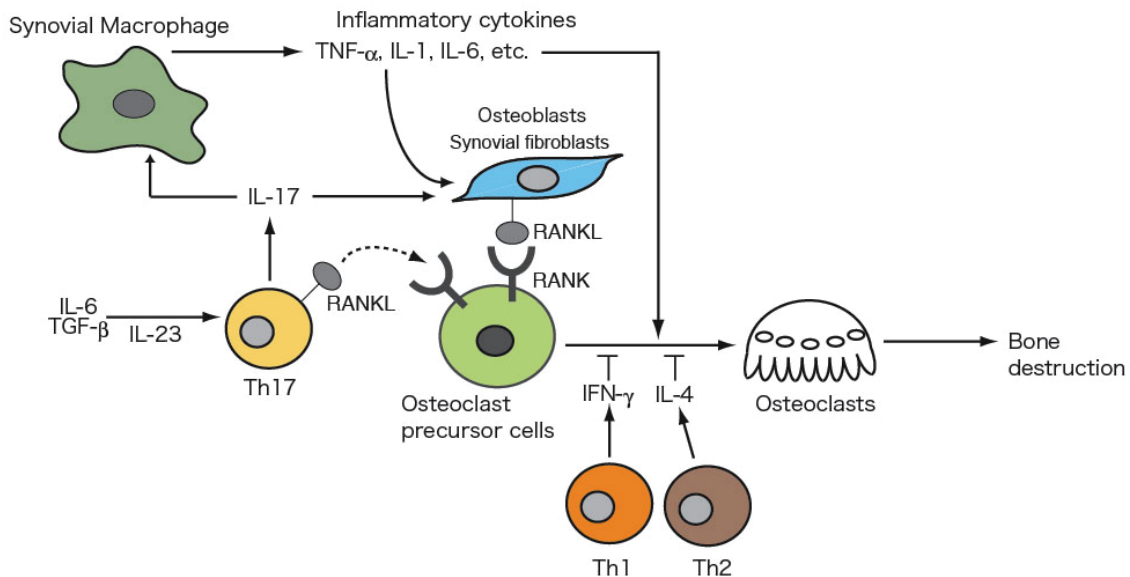
【4】CaMKIV-CREB 経路による破骨細胞制御機構の解明 (Nat Med, 12:1410, 2006)

破骨細胞分化における calcineurin-NFATc1 の重要性に比して、カルシウム/カルモジュリンによって活性化されるもう一つの経路である Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase (CaMK) およびその下流で活性化される転写因子 CREB の役割については明らかになっていない。そこで、破骨細胞分化過程における CaMK ファミリー分子の mRNA 発現を解析し、siRNA を用いたノックダウン実験を行った結果、CaMKIV の重要性が示唆された。そこで、CaMKIV 欠損マウスを解析した結果、CaMKIV が破骨細胞分化と骨吸収能の両方に重要な役割を果たすことが明らかになった。CaMK は、転写因子 CREB をリン酸化し、活性化 CREB は NFATc1 自己増殖に必須の c-Fos のプロモーターを活性化することで分化を制御していた。また、TRAP やカルシトニン受容体などの破骨細胞特異的遺伝子のプロモーターアッセイによって、CREB と NFAT が協調的にこれらの遺伝子発現を増強することが明らかとなった。このように CaMK/CREB 経路は、NFATc1 を効率よく誘導すると共に、NFATc1 依存性の遺伝子制御を促進することで二層性に破骨細胞の転写制御に関わることが明らかになり、カルシウムで制御される二つの転写因子経路の協調による転写制御ネットワークが解明された。また、CaMKIV 阻害剤は卵巣摘出骨粗鬆症モデルや炎症性骨破壊モデルに治療効果をもち、今後の新たな治療標的としての可能性が示唆された。



【5】Th17 が破骨細胞誘導性 T 細胞であることの解明 (J Exp Med, 202:2673, 2006)

関節リウマチでは、炎症滑膜にヘルパー T 細胞が集積することは知られていたが、なぜこのような T 細胞活性化が骨吸収細胞である破骨細胞を誘導するのか、真の骨破壊性 T 細胞サブセットはどのような性格のものかは長らく不明であった。従来関節リウマチは Th1 型の疾患であると考えられてきたにも関わらず、IFN- γ の強い破骨細胞分化抑制作用を考えると骨破壊を引き起こす T 細胞が Th1 細胞であるとは考えにくかった。そこで、Th1, Th2, Treg に加え、最近自己免疫疾患での重要性が注目される Th17 細胞を培養系で厳密に分化させて、破骨細胞分化への作用を詳細に検討した。その結果、Th1, Th2 細胞はそれぞれ IFN- γ , IL-4 を介して破骨細胞分化を強く抑制することが見いだされた。一方、Treg 細胞は破骨細胞分化に対する作用があまり顕著でなかった。IL-23 によって誘導される Th17 細胞は、破骨細胞分化に促進的であり、特に骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系を用いると、リコンビナントの RANKL がなくても破骨細胞分化を誘導することができたことから、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。IL-17 や IL-23 の遺伝子欠損マウスにおいては炎症性骨破壊に伴う破骨細胞形成が著しく低下しており、Th17 細胞が、炎症と骨破壊を結びつける破骨細胞誘導性 T 細胞サブセットであることが解明された。本研究により、PRESTO 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という研究領域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、Th17 細胞が産生する IL-17 など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。



【6】抗リウマチ薬による NFATc1 抑制を介した骨破壊抑制効果の解明 (Mod Rheumatol, 12:12, 2007)

抗リウマチ薬による関節リウマチの骨破壊抑制機構の機序には不明な点が多い。破骨細胞分化培養系を用いてメトトレキサート (MTX)、サラゾスルファピリジン (SASP) およびブシラミン (Buc) の単独および併用添加における破骨細胞分化への影響を検討した。各薬剤の単独添加は、破骨細胞分化の必須転写因子 NFATc1 発現を転写レベルで抑制し、破骨細胞分化を抑制した。MTX および SASP は骨芽細胞上の破骨細胞分化促進因子 RANKL の発現を転写レベルで抑制した。また、これら三者の併用添加は、MTX 単独添加に比べ低濃度で破骨細胞分化および NFATc1 発現を顕著に抑制した。本研究から、NFATc1 の転写レベルでの発現に作用点を有する薬剤が破骨細胞性骨破壊疾患に有用であることが明らかとなった。

5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

自己免疫性関節炎による骨破壊の研究では、T 細胞が産生する種々のサイトカインによる効果についてさまざまな報告があったが、破骨細胞誘導性のサブセットという観点での報告はなく、本研究課題が世界をリードする成果をあげた。本成果は J Exp Med 誌の表紙に取り上げられただけでなく、Nat Rev Immunol をはじめとする総説誌でも注目すべき論文として取り上げられた。また、関節炎での骨破壊を担う破骨細胞の分化シグナルの解明は、世界的に多くの研究者が取り組んでいる課題である。細胞融合に必要な DC-STAMP などの遺伝子が報告され、RANK に結合する新たなアダプター分子などが報告されているが、本研究課題による CaMK-CREB 経路の同定は、Nat Med 誌の表紙でとりあげられるなど国際的に高い評価をえており、本分野において世界をリードする成果をあげたと言える。

6. 研究実施体制

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
大場（磯部） 美穂	東京医科歯科 大学分子情報 伝達学	研究補助 者	マウス飼育 分子生物学的実験補助	平成 16 年 12 月～ 平成 19 年 3 月
高（廣岡）純 子	東京医科歯科 大学分子情報 伝達学	研究補助 者	マウス飼育 分子生物学的実験補助	平成 16 年 12 月～ 平成 19 年 3 月
西岡（本田） 鼓	東京医科歯科 大学分子情報 伝達学	研究補助 者	マウス飼育 分子生物学的実験補助	平成 16 年 12 月～ 平成 18 年 12 月
田谷 麻美子	東京医科歯科 大学分子情報 伝達学	研究補助 者	マウス飼育 研究データの収集、解 析	平成 18 年 4 月～ 平成 18 年 12 月

7. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2005 年 3 月 12 日	第 2 回 Osteoimmunology Forum	東京ガーデン パレスホ テル	50 人	骨免疫学の研究成果発表、 討論会
2006 年 2 月 11 日	第 1 回骨免疫学ワーク ショップ	フォーシー ズンズホテ ル丸の内	50 人	骨免疫学の研究成果発表、 討論会
2006 年 3 月 11 日	第 3 回 Osteoimmunology Forum	東京大学山 上会館	50 人	骨免疫学の研究成果発表、 討論会
2006 年 5 月 28 日・6 月 2 日	第 1 回国際骨免疫学会 議	Crete, Creece	200 人	骨免疫学の領域の確立と 発展のための初の国際会 議
2006 年 10 月 14 日	第 2 回骨免疫学ワーク ショップ	六本木ヒル ズ森タワ ー、アカデ ミーヒルズ	50 人	骨免疫学の研究成果発表、 討論会

(2) 招聘した研究者等

氏 名（所属、役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
なし			

8. 発展研究による主な研究成果

(1)論文発表 (英文論文 20 件 邦文論文 28 件)

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

Suematsu, A., Tajiri, Y., Nakashima, T., Taka, J., Ochi, S., Oda, H., Nakamura, K., Tanaka S., and Takayanagi H. Scientific basis for the efficacy of combined use of antirheumatic drugs against bone destruction in rheumatoid arthritis. **Mod Rheumatol**, 17, 17-23(2007)

Negishi, H., Fujita, Y., Yanai, H., Sakaguchi, S., Ouyang, X., Shinohara, M., Takayanagi, H., Ohba, Y., Taniguchi, T., Honda, K. Evidence for licensing of IFN- γ -induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. **Proc Natl Acad Sci** 103, 15136-41(2006)

○ Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, D. J., & 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., & 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., Crombrughe, B., Nakashima K. & Takayanagi, H. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. **Nat Med** 11, 880-885 (2005)

Kim, Y., Sato, K., Asagiri, M., Morita, I., Soma, K., and Takayanagi, H. Contribution of NFATc1 to the transcriptional control of immunoreceptor OSCAR but not TREM-2 during osteoclastogenesis. **J Biol Chem** 280, 32905-32913 (2005)

Lee, F.Y., Kim, D.W., Karmin, J.A., Hong, D., Chang, S.S., Fujisawa, M., Takayanagi, H., Bigliani, L.U., Blaine, T.A., and Lee, H.J. μ -calpain regulates RANKL-supported osteoclastogenesis via NF- κ B activation in raw 264.7 cells. **J Biol Chem** 280, 29929-29936 (2005)

Gohda, J., Akiyama, T., Koga, T., Takayanagi, H., Tanaka, S. and Inoue, J. RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. **EMBO** 24, 790-799 (2005)

Takatsuna, H., Asagiri, M., Kubota, T., Oka, K., Osada, T., Sugiyama, C., Saito, H., Aoki, K., Ohya, K., Takayanagi, H. and Umezawa K. Inhibition of RANKL-induced Osteoclastogenesis by (-)-DHMEQ, a Novel NF- κ B Inhibitor, through Downregulation of NFATc1. **J Bone Mineral Res** 20, 653-662 (2005)

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

Asagiri, M., Takayanagi, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. **Bone** 40, 251-264 (2007)

Takayanagi, H. Amazing multifunctionality of calcineurin and NFAT signaling in bone homeostasis. **BoneKEy-osteovision** 3, 28-31(2006)

<http://www.bonekey-ibms.org/cgi/content/full/ibmske;3/9/28>

Commentary on: Winslow MM, et al. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Dev Cell* 10, 771-82 (2006)

Sato, K., Takayanagi, H. Osteoclasts, rheumatoid arthritis, and osteoimmunology. **Curr Opin Rheumatol** 18, 419-426 (2006)

Takayanagi, H., Sato, K., Takaoka, A., Taniguchi, T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. **Immunol Rev** 208, 181-193 (2005)

Takayanagi, H. All Interferons are Not Equal: Specific Mechanisms of Interfering with Osteoclastogenesis. **BoneKEy-osteovision** 2, 24-28 (2005)

<http://www.bonekey-ibms.org/cgi/content/full/ibmske;2/11/24>

Commentary on: Coelho LF, et al. Interferon- α and - β differentially regulate osteoclastogenesis: Role of differential induction of chemokine CXCL11 expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102, 11917-11922 (2005)

Takayanagi, H. Osteoimmunological insight into bone damage in rheumatoid arthritis. **Mod Rheumatol** 15, 225-231 (2005)

Takayanagi, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **J Periodont Res** 40, 287-293 (2005)

Takayanagi, H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. **J Mol Med** 83, 170-179 (2005)

Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T. and Taniguchi, T. Stat1-mediated cytoplasmic attenuation in osteoimmunology. **J Cell Biochem** 94, 232-240 (2005)

高柳広：Osteoimmunology と破骨細胞 医学のあゆみ 221 (1) 37-45、2007

高柳広：破骨細胞分化・活性化の分子機構 CLINICAL CALCIUM 17 (4) 484-492、2007

高柳広：破骨細胞分化を増やすT細胞の同定 整形外科 58 (4) 406、2007

末松綾子、高柳広：炎症性骨破壊における免疫系と骨軟骨細胞のクロストーク 日本臨床免疫学会誌 Jpn. J Clin. Immunol 30 (1) 22-28、2007

高柳広：細胞増殖・分化・死のシグナル伝達 骨免疫学 遺伝子医学 MOOK シグナル伝達病を知る 6、107-112、2006

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

西川恵三、高柳広：網羅的解析から読み解く破骨細胞および骨芽細胞分化の分子基盤 医学のあゆみ 219 (9) 723-727、2006

古賀貴子、高柳広：Osteoimmunology 内分泌・糖尿病科 23 (suppl.3) 150-158、2006

古賀貴子、高柳広：骨代謝における FK506 の作用機序 医学のあゆみ 219 (4) 291-292、2006

高柳広：骨免疫学の現状と将来 THE BONE 9月号 20 (5)：105 (665) -111 (671)、2006

高柳広：特集 II 炎症と破骨細胞 炎症と免疫 14 (5)：41-42、2006

朝霧成挙、高柳広：破骨細胞分化の転写制御 炎症と免疫 14 (5)：48-59、2006

篠原正浩、高柳広：骨免疫学 - 炎症性骨破壊における破骨細胞活性化の分子機構- 分子リウマチ 3 (9)：55 (239) -62 (246)、2006

西川恵三、高柳広：免疫系と骨の破壊 -免疫系と破骨細胞分化の密接な関わり合いを中心として 治療学 40 (7) 21-28、2006

高柳広：骨免疫学とは何か：その歴史と展望 ホルモンと臨床 54：735-742、2006

越智小枝、高柳広：TNF- α と骨代謝 炎症と免疫 14 (4)：50-56、2006

朝霧成挙、高柳広：骨免疫学研究の最前線 転写因子 NFATc1 による骨代謝制御 医学のあゆみ 217 (12)：1119-1121、2006

高柳広：破骨細胞制御遺伝子の発見 整形外科 58 (3)：296、2006

古賀貴子、高柳広：骨吸収と骨形成における NFATc1 の働き THE BONE 20(3):75-81(335-341)、2006

越智小枝、高柳広：抗リウマチ薬による破骨細胞制御 リウマチ科 35 (4)：391-396、2006

佐藤浩二郎、高柳広：破骨細胞分化第3シグナルの発見- 骨免疫学の視点から 実験医学増刊 24 (5)：202(764)-207(769)、2006

古賀貴子、高柳広：免疫グロブリン様受容体による骨破壊の制御 臨床免疫、44 (3)：267-275、2005

高柳 広：骨免疫学 - その研究のながれ- Osteoimmunology-a historical view- THE BONE、19(6)：17(643)-23(649)、2005

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：カラー図説 RANKL/RANK シグナル伝達 日本臨床、63 (9) 1502-1504、2005

高柳 広：骨免疫学の概念と展開 日本臨床、63 (9) 1505-1509、2005

高柳 広 <編集> 骨研究がわかる 羊土社（東京） 2005年8月1日発行

高柳 広：概論 ポストゲノム時代の生体高次機能解析で脚光を浴びる骨研究 骨研究が

わかる、12-20、2005

古賀貴子、高柳 広：骨吸収のメカニズムー破骨細胞の分化と活性化機構ー 骨研究がわかる、49-57、2005

高柳 広：骨免疫学：骨代謝と免疫系のクロストーク 細胞工学、24（7）693-697、2005

高柳 広：特集Ⅱ 骨破壊の分子細胞機能学 序 炎症と免疫、13（4）48-50、2005

高柳 広：破骨細胞分化に関与する RANKL 誘導遺伝子の解析 臨床免疫、43(6)689-694、2005

高柳 広：骨制御シグナルの新たな展開 実験医学、23（11）130-136、2005

朝霧成挙、高柳 広：変形性関節症の治療ターゲット分子を発見！ 実験医学 23(10)1546、2005

高柳 広：骨免疫学への遺伝子チップ応用 日本臨床免疫学会会誌、28（2）79-85、2005

高柳 広：関節リウマチにおける骨破壊の分子機構 内科、95（2）338-342、2005

高柳 広：免疫系と骨代謝 日本臨床、63 増刊 1、87-95、2005

高柳 広：関節リウマチにおける軟骨破壊の分子機構 内科、95（1）136-139、2005

(2)口頭発表

①学会

国内 26 件、 海外 17 件

②その他

国内 28 件、 海外 2 件

(3)特許出願（本研究に係わり、JST から出願したものとで研究機関から出願したもの）

出願元	国内（件数）	海外（件数）
JST	0	0
研究機関	0	0
計	0	0

(4)その他特記事項

<新聞記事>

毎日新聞 2006.11.27 記憶高める酵素 骨の分解を促す

産経新聞 2006.11.27 骨壊す細胞 酵素が調節 東京医歯大教授ら発見 骨粗鬆症治療に可能性

日本経済新聞 2006.11.27 骨粗しょう症治療に光？ 「破骨細胞」に調整酵素 医科歯科大チーム発見

読売新聞 2006.10.15 骨と免疫の学際的な出会い。リウマチ治療革命につなぐ骨免疫学 破骨細胞の抑制、治療に応用へ

産経新聞 2006.7.17 知の先端「骨免疫学」領域切り開く 「関節リウマチ」根治へ 患者への思い 原動力に

読売新聞 2006.4.24 新進3氏にゴールド・メダル（東京テクノ・フォーラム） 骨免疫学（新領域を開く）
読売新聞 2006.4.13 ゴールド・メダル賞授賞式

日経産業新聞 2006.3.30 21世紀の気鋭 分子レベルから解明

朝日新聞 2005.12.28 科学に貢献 野口さんから高校生まで 文科省10件を選定
毎日新聞 2005.12.28 ナイスな研究者選定 キラリと光る成果を評価

山陽新聞 2005.11.23 ビフィズス菌増やす DHNA 骨粗鬆症に効果 岡山大研究グループ解明（コメント）

日経産業新聞 2005.7.27 骨をつくる遺伝子解明 骨粗鬆症治療薬に道

毎日新聞 2005.3.15 学士院賞に10人 新設の奨励賞は5人
朝日新聞 2005.3.15 学士院賞に整数論の加藤氏ら
東京新聞 2005.3.15 学士院賞加藤氏ら9件10人

日刊工業新聞 2005.2.21 第1回日本学術振興会賞
毎日新聞 2005.2.26 若手研究者にエール

<受賞>

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

9. 結び

本研究課題では、PRESTOの成果を発展させ、自己免疫性関節炎による骨破壊病態の全貌解明を達成し、骨破壊を担う破骨細胞のシグナル伝達機構の解明においても新たな知見を多数得ることでき、当初の目標をほぼ達成したと考えられる。PRESTOで雇用されていた研究員も継続して研究を続けることができ、安心して研究に取り組むことができ、次のステージへと発展することができた。さらに詳細な破骨細胞シグナルの検討を進め、最終的な臨床応用へ結びつけていくことが今後の課題である。