



p38MAP キナーゼを介した破骨細胞の分化 段階的制御

1. はじめに

生体内の代謝は個々の反応が無秩序ではなく、恒常性を維持するために合目的かつ系統的に調節されている。その中で骨代謝の平衡関係は、サイトカインやホルモン作用によるカルシウム代謝と繰り返し行われる骨吸収と骨形成のバランスにより精密に維持されている。高齢化に伴い急増している骨粗鬆症やリウマチ症などの骨代謝性疾患の主な成因は、破骨細胞の病的な骨破壊が亢進して骨代謝バランスが破綻することによって引き起こされることが知られている。従って、骨粗鬆症やリウマチ症の病態を理解し新たな治療の確立や予防に役立てるため、破骨細胞の分化・骨吸収に必須となる細胞内シグナル伝達のしくみを明らかにすることは、我が国の少子高齢化に伴う医療費上昇という深刻な社会的背景から、そして骨代謝性疾患に対する新たな分子標的の検索による治療戦略を考慮する上で重要である。p38MAP キナーゼ (p38) は破骨細胞など様々な細胞分化や炎症応答に重要な役割を担うシグナル伝達経路の一つである。一見して普遍的な共通シグナルの最も重要な要素は、各々の細胞応答の運命を特徴づける標的因子の活性化に他ならない。本稿では、破骨細胞分化に必須である p38 がマスター転写因子 NFATc1 を標的として誘導する破骨細胞分化の分子メカニズムを中心に最近の研究の進展とともに概説する。

2. 破骨細胞の分化と動態

造血幹細胞に由来する破骨細胞は、骨組織において骨吸収を行い、コラーゲンを主成分とする骨基質とそれにリン酸カルシウムが沈着して構成されるカルシウム微結晶を溶解することによりカルシウムの動員を行う多核細胞である。破骨細胞はマクロファージや顆粒球と起源を共有しており、顆粒球・マクロファージ形成細胞 (CFU-GM) から前駆細胞、そして細胞融合を経たのちに、造血系細胞の中で唯一、細胞極性を有する成熟型の破骨細胞になる¹⁾ (図1)。この一連の分化過程で、破骨細胞分化の中心的な役割を担う TNF リガンドファミリーの破骨細胞分化誘導因子 receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) の刺激が破骨細胞分化の引き金となる。RANKL は骨芽細胞・ストローマ細胞表層に膜貫通型リガンドとして発現する。前駆細胞との細胞間の接触時に単球/マクロファージ系の前駆細胞表層の RANK 受容体を介して、リガンド・受容体と三量体を形成し、その架橋シグナルにより破骨細胞の分化が開

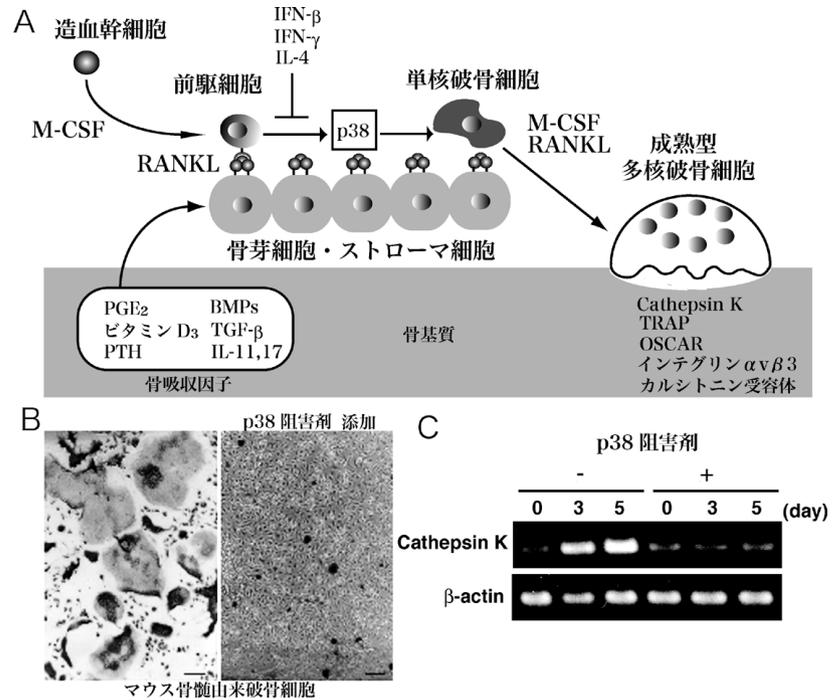


図1 破骨細胞の分化過程

A; p38 を介した破骨細胞の分化過程の模式図 B; RANKL と M-CSF 処理で分化した TRAP 陽性のマウス破骨細胞 (左). p38 阻害剤 (SB203580) により分化が阻害される (右) (文献3より引用し, 改変した). C; p38 阻害剤は RANKL によるカテプシン K 遺伝子の発現を抑制する (文献9より引用し, 改変した). OSCAR; osteoclast-associated receptor, PTH; parathyroid hormone, BMPs; bone morphogenetic protein, TGF; transforming growth factor

始される。同時に、RANK 遺伝子の発現を誘導する macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) とその受容体 c-fms シグナルがこの分化過程に必須である。破骨細胞分化において M-CSF は、分化を促進する作用よりも前駆細胞の生存因子として作用するが、M-CSF 非存在下に RANKL 処理したマウス骨髄培養細胞から破骨細胞分化を誘導すると spreading した多核の破骨細胞がほとんど認められないことから、破骨細胞の多核化あるいは spreading にも M-CSF が影響を及ぼしていると考えられる。従来、骨吸収因子としてよく知られるプロスタグランジン E₂ (PGE₂)、活性化型ビタミン D₃ や IL-11, 17 の炎症性サイトカインが血中のカルシウム濃度を上昇させる主な原因は、これらが骨吸収因子として作用して骨芽細胞とストローマ細胞の RANKL の発現を誘導し破骨細胞分化と骨吸収を促進する結果、骨に貯蔵されたカルシウムが体液中または血中に動員されるためであると考えられる。

分化に伴い成熟した破骨細胞は、特有の明帯と波状縁がつくられることによってダイナミックに構造変換し、骨吸収に必要な閉塞腔空間が構築される。明帯はリング状または斑点状に分布するアクチン繊維や細胞接着分子であるインテグリン $\alpha\beta3$ が発達しており、骨表面に接着して Pyk2-c-Src 系の細胞内シグナル伝達を介して骨吸収領域を確保するとともに細胞の移動に関与する。骨基質やアパタイト結晶の溶解には液胞型プロトンポンプが局在する波状縁が重要な役割を果たしており、カルボニックアンヒドラーゼ II を介した H⁺ の放出によって低 pH 環境を確立し、同時に cathepsin K やマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-9 などの多彩なプロテアーゼ、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) などの酵素を分泌することで骨組織の破壊を行う。この他、cathepsin K, インテグリン $\beta3$, プロトンポンプ TCIRG1, 塩素イオンポンプ ClC-7 も骨吸収には不可欠な破骨細胞マーカーである。このことは各々の遺伝子欠損マウスでは骨内に破骨細胞が存在するため分化は正常なのに対して、吸収能の欠失が原因で大理石骨病を呈することから明らかである。

3. 破骨細胞の細胞内シグナル伝達と p38MAPK の役割

ここ数年の破骨細胞研究において最も重要な知見の一つは、破骨細胞分化誘導因子 RANKL とその受容体 RANK が同定され、RANKL-RANK シグナルが破骨細胞分化を規定する主要な経路であると証明されたことである¹⁾。この事実は遺伝学的解析により各々の遺伝子欠損マウスにおいて骨内の破骨細胞が消失した結果、骨吸収が起こらないた

めに発症する大理石骨病を呈すること、ならびにレトロウイルスを用いた再構築実験、すなわち遺伝子欠損マウスに欠損遺伝子を発現させると重篤な病態がレスキューされたことに裏付けられる。当時、このリガンドの発見は1997年に四つのグループから独立に報告され、そのうち着実にこの研究分野を推進してきた国内のグループが osteoclast differentiation factor (ODF) と RANKL が同一の分子であることを明らかにした¹⁾。RANKL は II 型膜タンパク質で、胸腺、リンパ節、T 細胞に強く発現する。RANK 受容体は、I 型膜タンパク質である TNF 受容体スーパーファミリーに属し、胸腺、肝臓、骨格筋、大腸、小腸、副腎などに広く発現が認められる。RANK 受容体がクローニングされた当初、TNF receptor-associated factor (TRAF) ファミリーのアダプター分子 TRAF6 が RANK 受容体に結合すること、nuclear factor-kappa B (NF- κ B) や c-Jun N-terminal kinase (JNK) 経路の活性化など一部の細胞内シグナル伝達経路が明らかにされたが、不明な点が多く残されていた。そこで筆者らは、RANKL が TNF ファミリーに属すること、炎症性サイトカインである TNF シグナルと同様に RANK 受容体に TRAF ファミリー TRAF2, 5, 6 が会合することから、JNK 以外の MAP キナーゼである extracellular signal-regulated kinase (ERK) および p38MAPK (p38) の活性化と破骨細胞分化の相関について調べた。その結果、p38 が RANKL によって活性化すること、さらに破骨細胞分化に必須であることを初めて見出した^{3,4)} (図 2)。ERK は RANKL および M-CSF により活性化され転写因子 microphthalmia transcription factor (MITF) をリン酸化するが、破骨細胞分化において特異的な作用を示すかどうかについては議論が分かれている。RANKL 刺激で活性化される PI3 kinase (PI3K)-Akt 経路は破骨細胞の生存や波状縁とアクチンリング形成に働いている。最近、RANKL-RANK シグナルの主経路の他に、破骨細胞分化に必須となる DNAX activating protein 12 (DAP12), Fc γ R を介した細胞外からの第 2 の協調シグナルが重要であることが示された。これらの分子は各々 triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2, signal-regulatory protein (SIRP) β 1 と OSCAR, paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-A との結合を介して骨芽細胞や前駆細胞と相互作用し、前駆細胞内の Syk-phospholipaseC (PLC) γ を活性化して細胞内カルシウム濃度を上昇させる²⁾。このように、破骨細胞の分化を方向づける RANKL-RANK シグナルを介した主経路以外に細胞間接触時の補助シグナルが破骨細胞分化に不可欠であることが明らかになった。このことは骨内において破

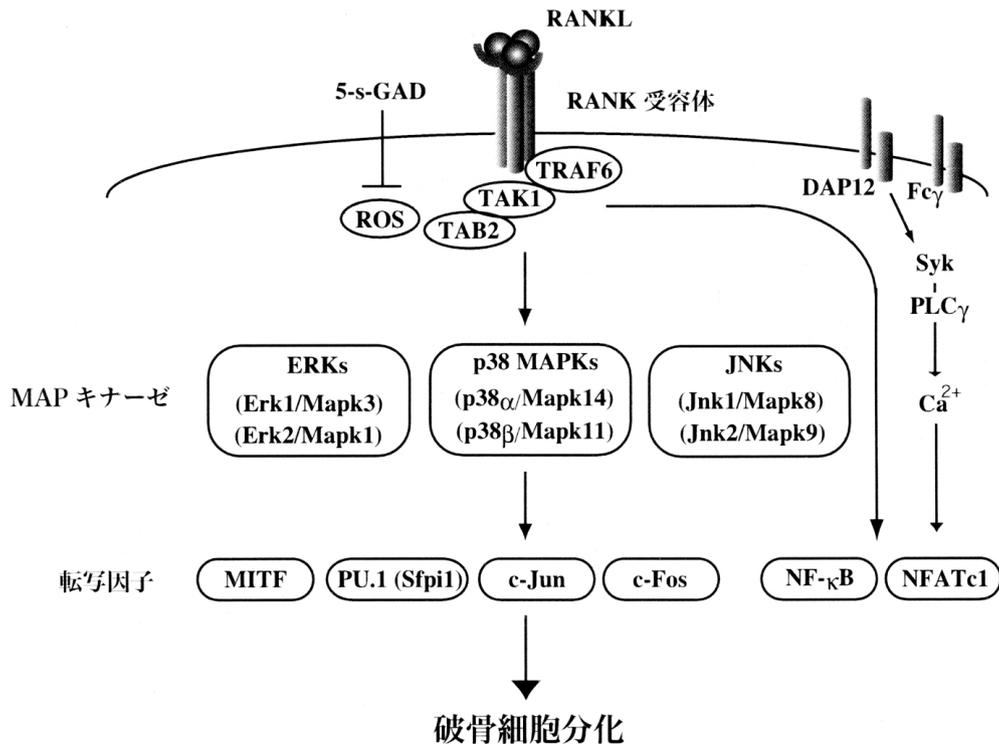


図2 MAP キナーゼを介した破骨細胞分化に関する主要な細胞内シグナル伝達

骨細胞の骨吸収が適材適所にて行われるよう複数の細胞外シグナルによる効率的かつ精密な分化制御機構が働いていることを示している。

細胞外から破骨細胞の分化決定シグナルが細胞内へ伝えられると、核内において活性化された転写因子を介した破骨細胞マーカーの遺伝子発現が行われる。破骨細胞分化に関わる転写因子については、主に遺伝学的な解析により NF- κ B, PU.1, c-Fos, MITF, nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1 が不可欠であることが示された (図2)。これらの中で RANKL 刺激により最も顕著に誘導される転写因子は NFATc1 である。NFATc1 を前駆細胞に過剰発現させると破骨細胞分化を誘導することができる。この過程では RANKL 刺激を必要としないこと、さらに遺伝子を欠失した ES 細胞では破骨細胞分化を誘導できないことから、NFATc1 は破骨細胞分化のマスター因子として位置づけられる。NFATc1 は DAPI12 と Fc γ を介したカルシウムシグナル依存性のカルシニューリンと、TRAF6 を介した経路により活性化される^{2,5)}。破骨細胞が存在しない c-Fos ノックアウトマウスが示す大理石骨病の病態は NFATc1 の発現によって改善できることから、NFATc1 は c-Fos 下流において調節をうけている⁶⁾。TRAP 遺伝子は PU.1 と

MITF との相乗効果により転写活性化が行われるが、NFATc1 や c-Fos などの転写因子もこの遺伝子の発現を誘導する⁷⁾。c-Jun については議論があったが、ドミナントネガティブ c-Jun を発現するトランスジェニックマウスが大理石骨病を呈することにより、破骨細胞分化に重要であることが証明された⁸⁾。このように、TRAP やカルシトニン受容体などの破骨細胞マーカーの遺伝子発現を誘導する転写活性化因子を介した RANKL-RANK シグナルのヒエラルキーが次第に明らかになってきた。しかしながら、RANK-TRAF6 を介した MAP キナーゼ経路の活性化とマスター因子 NFATc1 を含めた転写因子との関係や効率的な破骨細胞分化における詳細な分子メカニズムについては不明な点が多く、整理が必要であった。

4. p38MAPK を介した分化段階的制御

これまで、p38 は赤血球や樹状細胞などのさまざまな細胞分化に必須であることが知られており、このことは p38 が破骨細胞分化において一体どのようにして分化を規定しているのかという問題を我々に提起している。そこで筆者らは、RANKL-RANK シグナル下流の p38 がどのように転写因子を介して破骨細胞分化を制御するのかを明らかにす

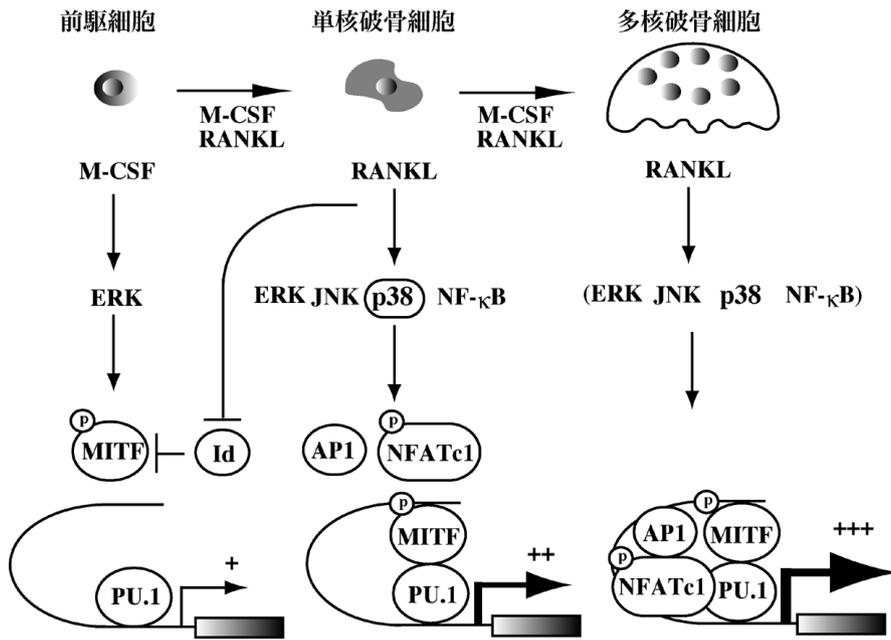


図3 p38 を介した分化段階的制御機構

ることを目的として、分化初期から成熟型に至る破骨細胞において高発現する *cathepsin K* 遺伝子の発現を指標に p38 の標的を追究した。その結果、破骨細胞分化に必須であるマスター転写因子 NFATc1 がその有力な候補であることを見出した⁹⁾。すなわち、p38 が NFATc1 と会合し NFATc1 を直接リン酸化すること、さらに NFATc1 は p38 のみならず転写因子 PU.1 と会合することが明らかとなった(図3)。実際、マウス破骨細胞培養系において p38 と NFATc1 が核内に局在することが観察され、*cathepsin K* 遺伝子上流の NFAT 結合部位に対する NFATc1 の特異的な DNA 結合活性を認めた。p38 の活性化は NFATc1 による *cathepsin K* プロモーターの活性を PU.1 と相加的に上昇させ、また MIF を共発現すると最も強力なプロモーター活性を相乗的に誘導した。このことは、p38 経路を介した NFATc1 などの転写因子群の相互の協調的な作用により *cathepsin K* 遺伝子が効率的に発現誘導されることで破骨細胞のダイナミックな骨吸収に関与していることを示唆している。*cathepsin K* 以外にも TRAP, OSCAR 遺伝子上流には NFAT, PU.1, MIF 結合部位が存在し、多数の破骨細胞マーカー遺伝子の発現が p38 依存的である。従って、上述の p38 を介した分化段階的制御機構モデルが他の破骨細胞マーカー遺伝子の発現に寄与することが示唆された。しかし、カルシトニン受容体をはじめ複数のアイソフォームが存在する遺伝子については、破骨細胞特異的なプロモーターの同定を含め詳細に検討する必要があると思われる。さらに、RANKL に

よる NFATc1 遺伝子の発現は p38 依存的であることから、p38 は分化初期における NFATc1 の遺伝子発現、ならびに NFATc1 のリン酸化修飾による *cathepsin K* 遺伝子の転写活性の増強の両ステップに重要な役割を果たしており、破骨細胞の分化段階的制御によって破骨細胞の分化決定に寄与していると考えられる。

5. 破骨細胞の分化抑制因子

冒頭に述べた通り、通常、骨吸収と骨基質の合成による骨代謝のバランスは厳密に維持されており、その理由の一つに健全時には過剰な破骨細胞分化により骨吸収が亢進して病的な骨破壊を惹起させないような分化調節機構が存在するからである。例えば、osteoprotegerin (OPG) は RANKL に直接結合して RANK 受容体と競合して RANKL 活性を中和するデコイレセプターとして作用し破骨細胞の分化と骨吸収を抑制するため、骨粗鬆症治療薬としての実用性が期待されている。この他、破骨細胞分化を抑制するサイトカインとして、インターフェロン(IFN)-β、IFN-γ と IL-4 が各々の異なる分子標的として c-Fos の分解、TRAF6 の分解と NF-κB の活性抑制に作用し、過剰な破骨細胞分化を調節している¹⁰⁻¹²⁾。活性化 T 細胞、B 細胞やストローマ細胞から分泌される IFN-γ と IL-4 は、関節リウマチ症などの病的な骨破壊が過剰な炎症反応によって促進されないよう細胞間相互作用を介したネガティブフィードバック制御に役割を果たしていると考えられる。また、RANKL 刺激

によって破骨細胞が分泌する IFN- β を介した破骨細胞の自己制御機構が存在することが明らかとなり、破骨細胞自身が暴走しないようブレーキをかけながら分化を調節する新たな分子調節機構がこの他にも報告され注目されている。その例として、inhibitors of differentiation/DNA binding (Id) 因子は転写因子 MITF と結合して MITF の転写活性化を阻害し、初期の破骨細胞分化を抑制することが示された¹³⁾。最近筆者らは、破骨細胞分化の後期に NFATc1 の転写活性化によって誘導される TRAP 遺伝子の発現が Pax ファミリーによって阻害されることを見出した (Kogawa et al., unpublished)。このように、破骨細胞は自身が諸刃の刃となり過剰な分化による骨吸収が原因となって病的な骨破壊による骨代謝疾患を引き起こさないよう、転写因子あるいは IFN- β の分泌など、転写レベルやオートクラインによって多段階の負の制御機構を介して自己管理を行っていると考えられる。

6. おわりに

骨粗鬆症治療薬として既に実用化されているビスフォスフォネート製剤あるいはロウマチ発症のリスクファクターである TNF に対する抗 TNF 抗体は骨破壊を大幅に低下させる。この他にも今後需要が増大する高齢化社会を見据え、骨代謝疾患の治療を狙った新たな分子標的の検索とその製剤開発が行われている。p38 についても骨破壊抑制の標的候補として例外ではない。実際 p38 阻害剤 SC-409 が炎症性骨破壊を阻害することが示されている¹⁴⁾。さらに筆者らは最近、昆虫由来の化合物 5-S-GAD が濃度依存的に活性酸素 (ROS) を介した破骨細胞の分化のみならず骨吸収を顕著に阻害することを見出しており (図 2, Kogawa et al., unpublished)、新治療薬としての可能性を期待している。最近、骨芽細胞に NFAT を過剰発現させたマウスに顕著な骨量を認め、NFAT が骨形成の調節因子であることが明らかにされた¹⁵⁾。このことは、骨吸収と骨形成、両者のカップリングによる骨代謝バランスが共通の分子により調節を受けていることを示している。NFAT を標的とした治療薬開発の期待を含め、新たな骨代謝疾患の予防・治療法を確立して患者の QOL の改善と向上に役立つよう、改めて分子レベルでの総合的な見地からの研究の進展が必要と思われる。

謝辞：本研究は理化学研究所細胞生化学研究室、埼玉医科大学分子生物学教室において実施されました。御協力頂きました理化学研究所辻本雅文主任研究員、埼玉医科大学

泰壽教授、久武幸司助教授 (現筑波大学教授)、そして多くの共同研究者の方々に深謝致します。

- 1) Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, Jimi, E., Gillespie, M.T., & Martin, T.J. (1999) *Endocr. Rev.*, **20**, 345-357.
- 2) Koga, T., Inui, M., Inoue, K., Kim, S., Suematsu, A., Kobayashi, E., Iwata, T., Ohnishi, H., Matozaki, T., Kodama, T., Taniguchi, T., Takayanagi, H., & Takai, T. (2004) *Nature*, **428**, 758-763.
- 3) Matsumoto, M., Sudo, T., Saito, T., Osada, H., & Tsujimoto, T. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 31155-31161.
- 4) Matsumoto, M., Sudo, T., Maruyama, M., Osada, H., & Tsujimoto, M. (2000) *FEBS Lett.*, **486**, 23-28.
- 5) Gohda, J., Akiyama, T., Koga, T., Takayanagi, H., Tanaka, S., & Inoue, J. (2005) *EMBO J.*, **24**, 790-799.
- 6) Matsuo, K., Galson, D.L., Zhao, C., Peng, L., Laplace, C., Wang, K.Z., Bachler, M.A., Amano, H., Aburatani, H., Ishikawa, H., & Wagner, E.F. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 26475-26480.
- 7) Matsumoto, M., Hisatake, K., Nogi, Y., & Tsujimoto, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 33086-33092.
- 8) Ikeda, F., Nishimura, R., Matsubara, T., Tanaka, S., Inoue, J., Reddy, S.V., Hata, K., Yamashita, K., Hiraga, T., Watanabe, T., Kukita, T., Yoshioka, K., Rao, A., & Yoneda, T. (2004) *J. Clin. Inv.*, **114**, 475-484.
- 9) Matsumoto, M., Kogawa, M., Wada, S., Takayanagi, H., Tsujimoto, M., Katayama, S., Hisatake, K., & Nogi, Y. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 45969-45979.
- 10) Takayanagi, H., Ogasawara, K., Hida, S., Chiba, T., Murata, S., Sato, K., Takaoka, A., Yokochi, T., Oda, H., Tanaka, K., Nakamura, K., & Taniguchi, T. (2000) *Nature*, **408**, 600-605.
- 11) Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., Suzuki, H., Suzuki, T., Sato, K., Yokochi, T., Oda, H., Nakamura, K., Ida, N., Wagner, E.F., & Taniguchi, T. (2002) *Nature*, **416**, 744-749.
- 12) Miroslavjevic, D., Quinn, J.M., Elliott, J., Horwood, N.J., Martin, T.J., & Gillespie, M.T. (2003) *J. Bone Miner. Res.*, **18**, 984-993.
- 13) Lee, J., Kim, K., Kim, J.H., Jin, H.M., Kyung, C., Lee, S.-H., Kook, H., Kim, K.K., Yokota, Y., Lee, S.Y., Choi, Y., & Kim, N. (2006) *Blood*, **107**, 2686-2693.
- 14) Mbalaviele, G., Anderson, G., Jones, A., De Ciechi, P., Settle, S., Mnich, S., Thiede, M., Abu-Amer, Y., Portanova, J., & Monahan, J. (2006) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **317**, 1044-1053.
- 15) Winslow, M.M., Pan, M., Starbuck, M., Fallo, E.M., Deng, L., Karsenty, G., & Crabtree, G.R. (2006) *Dev. Cell*, **10**, 771-782.

松本 征仁

(埼玉医科大学分子生物学教室)

Gradual regulation of osteoclastogenesis mediated by p38 MAP kinase

Masahito Matsumoto (Saitama Medical University, 38 Moroyama, Iruma, Saitama 350-0495, Japan)