

御機構を知るためには、触媒性残基のみならず反応特異性を司る残基を見出して解析することが重要であろう。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は多くの方々との共同研究によって得られたものである。この場を借りて関係者の方々に深謝する。

- 1) Futerman, A.H. & Hannun, Y.A. (2004) *EMBO Rep.*, 5, 777-782.
- 2) Hanada, K. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, 1632, 16-30.
- 3) Ikushiro, H., Hayashi, H., & Kagamiyama, H. (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Vitamin B6 and PQQ-dependent Proteins* (Iriarte, A., Kagan, H.M., & Martinez-Carrion, M., Eds.), pp. 251-254, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- 4) Ikushiro, H., Hayashi, H., & Kagamiyama, H. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 18249-18256.
- 5) Ikushiro, H., Hayashi, H., & Kagamiyama, H. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, 1647, 116-120.
- 6) Ikushiro, H., Islam, M.M., Tojo, H., & Hayashi, H. (2007) *J. Bacteriol.*, 189, 5749-5761.
- 7) Ikushiro, H., Hayashi, H., & Kagamiyama, H. (2004) *Biochemistry*, 43, 1082-1092.
- 8) Ikushiro, H., Fujii, S., Shiraiwa, Y., & Hayashi, H. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 7542-7553.
- 9) Yard, B.A., Carter, L.G., Johnson, K.A., Overton, I.M., Dorward, M., Liu, H., McMahon, S.A., Oke, M., Puech, D., Barton, G.J., Naismith, J.H., & Campopiano, D.J. (2007) *J. Mol. Biol.*, 370, 870-886.
- 10) Ikushiro, H., Okamoto, A., & Hayashi, H. (2006) *Sphingolipid Biology* (Hirabayashi, Y., Igarashi, Y., & Merrill, A., Eds.), Springer-Verlag Tokyo/Japan, pp. 483-492.
- 11) Ikushiro, H., Islam, M.M., Okamoto, A., Hoseki, J., Murakawa, T., Fujii, S., Miyahara, I., & Hayashi, H. (2009) *J. Biochem.*, 146, 549-562.
- 12) Schneider, G., Kack, H., & Lindqvist, Y. (2000) *Structure*, 8, R1-6.
- 13) Shiraiwa, Y., Ikushiro, H., & Hayashi, H. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 15487-15495.

生城 浩子, 林 秀行
(大阪医科大学医学部生化学教室)

Structural and kinetic study on bacterial serine palmitoyl-transferase

Hiroko Ikushiro and Hideyuki Hayashi (Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Osaka Medical College, 2-7, Daigaku-machi, Takatsuki, Osaka 569-8686, Japan)

破骨細胞分化の制御機構

1. はじめに

骨はリン酸カルシウム的一种であるヒドロキシアパタイトとI型コラーゲンを主成分とした強固な組織であり、その内部では破骨細胞と骨芽細胞によって骨吸収と骨形成が絶え間なく繰り返されている。この営みは「骨リモデリング (bone remodeling)」とよばれ、骨の強度や血清カルシウム濃度を調節する重要な生体システムの一つである。しかし、閉経後の女性や、歯周病、リウマチ、骨転移を伴う乳がんの患者では、破骨細胞が異常に活性化して骨の破壊をきたす。したがって、この細胞の分化メカニズムを解明すれば、これら疾患の治療方法の開発に応用できる可能性がある。本レビューでは、破骨細胞分化制御システムについて、これまでの研究の流れや疾患との関係を含めて概説したい。

2. 破骨細胞分化を誘導する細胞外刺激

破骨細胞の前駆細胞は単球・マクロファージに由来し、骨の微小環境において外部から種々の刺激を受けることにより破骨細胞に分化する (図1)。刺激因子の一つであるM-CSF (macrophage colony-stimulating factor) は、破骨細胞前駆細胞の形成と、その後の破骨細胞分化において必須であり、M-CSF 遺伝子にフレームシフト変異をもつ *op/op* マウスは、破骨細胞形成不全による大理石骨病を発症する¹⁾。一方、*in vitro* における破骨細胞分化誘導系では、TGF (transforming growth factor)- β をブロックすると破骨細胞分化が阻害されることから、TGF- β シグナルが破骨細胞分化に密接に関わっていると考えられる²⁾。また、*in vitro* において破骨細胞の前駆細胞をメチルセルロース培地中で浮遊状態を維持しながら培養すると、前駆細胞は成熟した破骨細胞に分化できない。したがって、インテグリンを介した接着シグナルが必須であるといわれている³⁾。

これらの刺激因子は破骨細胞の分化には必要ではあるが、破骨細胞分化に特有ではなく、最終的に破骨細胞分化のトリガーとしての役割を担うのは、骨芽細胞が産生するRANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) とよばれる膜結合型の分子である⁴⁾。RANKLあるいはその受容体であるRANKを欠損したマウスは、破骨細胞形成不全による

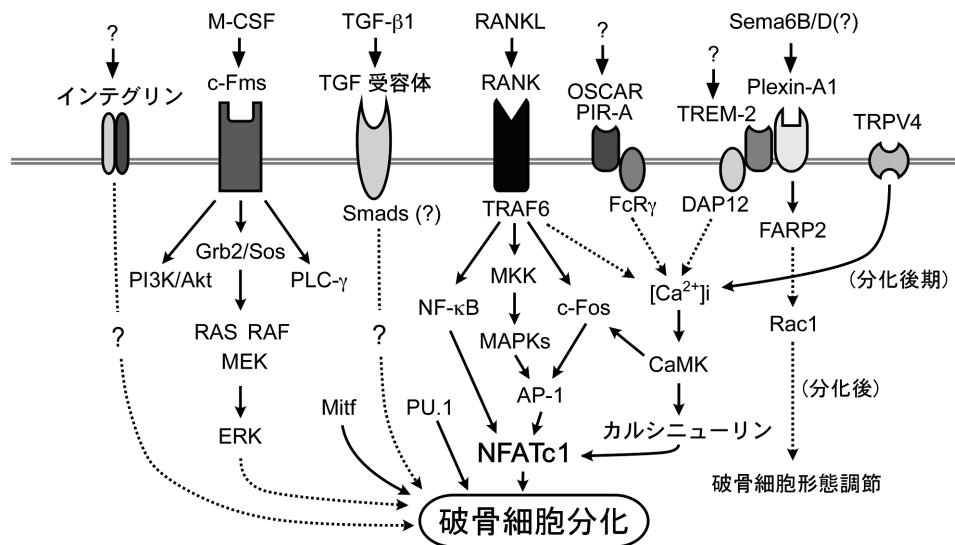


図1 破骨細胞分化を誘導する細胞外および細胞内シグナル

破骨細胞の前駆細胞には c-Fms (M-CSF 受容体), TGF 受容体 (I 型と II 型), RANK, TREM-2, Plexin-A1 などの受容体のほか, インテグリンや TRPV4 が発現しており, 破骨細胞の分化誘導に関与している. 破骨細胞の前駆細胞から破骨細胞への分化を誘導するのは RANK である. TREM-2, OSCAR, Plexin-A1 および TRPV4 (分化後期に必要な Ca^{2+} 浸透圧感受性チャネル) は RANK と協調してカルシウム依存性の細胞内シグナルを活性化し, 破骨細胞分化誘導に必須の転写因子である NFATc1 の発現を誘導する. NFATc1 は破骨細胞に関連する種々の遺伝子の発現を誘導することによって, 破骨細胞分化を進行させる.

大理石骨病を呈する. ヒトでは RANKL 遺伝子 (*TNFSF11*) の変異が大理石骨病を発症させる一方⁵⁾, RANK 遺伝子 (*TNFRSF11*) の変異が破骨細胞を活性化させ, 骨溶解 (osteolysis) を引き起こすことが報告されている⁶⁾. なお骨芽細胞は RANKL だけでなく, RANKL のおとり (decoy) 受容体である OPG (osteoprotegerin) を産生し, RANKL と RANK の相互作用を阻害することによって, 破骨細胞分化を抑制する機能も有している⁷⁾.

3. 破骨細胞分化に関与する細胞内シグナル

RANKL は TNF (tumor necrosis factor) スーパーファミリーに属し, これが破骨細胞の前駆細胞に発現する RANK に結合すると, RANK の細胞内ドメインに TRAF (TNF receptor-associated factor)-6 などの分子が会合する (図 1). 次に一群のキナーゼ (MKK, ERK, JNK, p38 など) が活性化され, 最終的に c-Fos や NFATc1 (nuclear factor of activated T cell c1), PU.1 などの転写因子が遺伝子発現を調節することによって破骨細胞分化が進行する (図 1).

NFATc1 は, 破骨細胞分化初期に RANK シグナルによって劇的に発現レベルが上昇する遺伝子の一つである

(図 1). これに着目した高柳博士らのグループは, 胎生致死である NFATc1 欠損マウスから ES 細胞を樹立し, *in vitro* での破骨細胞分化誘導を試みた. その結果, NFATc1 を欠損した ES 細胞は破骨細胞に分化できず, NFATc1 が必須であることが示唆された⁸⁾. また, 同グループおよび松尾博士らのグループは, 破骨細胞の前駆細胞に NFATc1 を強制的に発現させると RANKL 刺激なしに破骨細胞分化が誘導されることを示した^{8,9)}. よって, NFATc1 は必要かつ十分な機能を持ち合わせた破骨細胞分化のマスター遺伝子といわれている.

また, NFATc1 の活性化には, OSCAR (osteoclast-associated receptor), TREM-2 (triggering receptor expressed in myeloid cells-2), PIR-A (paired immunoglobulin-like receptor-A), および Plexin-A1 などの受容体を介したカルシウム依存性シグナルの活性化を必要とし^{4,10)}, RANK シグナルもこの経路の活性化を調節する (図 1). しかし現在のところ, OSCAR や TREM-2 のリガンドとして実際にどのような分子が機能しているのか不明であり, 今後の解析が待たれる.

4. 破骨細胞分化における転写因子 IRF-8 の役割

われわれは, 破骨細胞分化に伴う遺伝子発現の推移を網

羅的に把握するため、DNA マイクロアレイを用いて未刺激の破骨前駆細胞、RANKL 刺激 24 時間後の分化途中の細胞、そして分化した破骨細胞における各種 mRNA の発現レベルを解析した。その結果、転写因子として知られる *IRF-8* (*interferon regulatory factor 8*) の発現レベルが 24 時間以内に低下することを見いだした¹¹⁾。IRF-8 は、マクロファージなどの免疫担当細胞において遺伝子発現調節を担うほか、破骨細胞と前駆細胞を共有するコンベンショナル樹状細胞 (cDCs: conventional dendritic cells) の分化や機能発現に必要であることが報告されている¹²⁾。また、この因子は転写だけでなく、他の転写因子に対するコレギュレーターとしての機能を持ち、例えば PU.1 や NFATc1, c-Fos, TRAF6 など、破骨細胞分化に必須の細胞内因子とも相互作用することが明らかにされている。これらの情報から、われわれは IRF-8 が破骨細胞分化制御に関与しているのではないかと推察した。

まず、*IRF-8* と *NFATc1* の発現変化を時系列的に比較したところ、RANKL 刺激によって *IRF-8* の発現が低下した後、*NFATc1* の発現レベルが上昇することが判明した。そこで、*IRF-8* cDNA を破骨細胞の前駆細胞に導入し、*IRF-8* の発現を維持させたまま RANKL で刺激したところ、*NFATc1* の発現上昇は抑制され、破骨細胞は形成されなかった (図 2A)。また、IRF-8 は NFATc1 と複合体を形成し、NFATc1 の転写機能を阻止することで破骨細胞関連遺伝子の発現を抑制した¹¹⁾。次に IRF-8 欠損マウスの骨組織を解析したところ、破骨細胞形成の促進による重篤な骨粗鬆症の発症が認められた (図 2B)。この IRF-8 欠損マウスから調整した破骨細胞の前駆細胞を *in vitro* で培養すると、RANKL による破骨細胞分化が野生型よりも強く促進された (図 2C)。これらの結果は、IRF-8 が生体内で破骨細胞分化を抑制する働きを担うこと、そして RANK シグナルによる *IRF-8* の抑制が破骨細胞分化に必須であることを示唆する (図 3)。

5. 炎症性骨破壊における IRF-8 の役割

成人の多くが罹患する歯周病では、歯周組織への細菌の感染によって破骨細胞形成が促進され、歯を支える歯槽骨が吸収されるという、いわゆる炎症性骨破壊が見られる。これには、微生物の構成成分である LPS (lipopolysaccharide) やペプチドグリカンなどを認識する一群の受容体、TLRs (Toll-like receptors) が関与すると考えられており、興味深いことに、TLR シグナルの下流では IRF-8 を含む IRF ファミリーの分子が遺伝子発現を調節することが報告

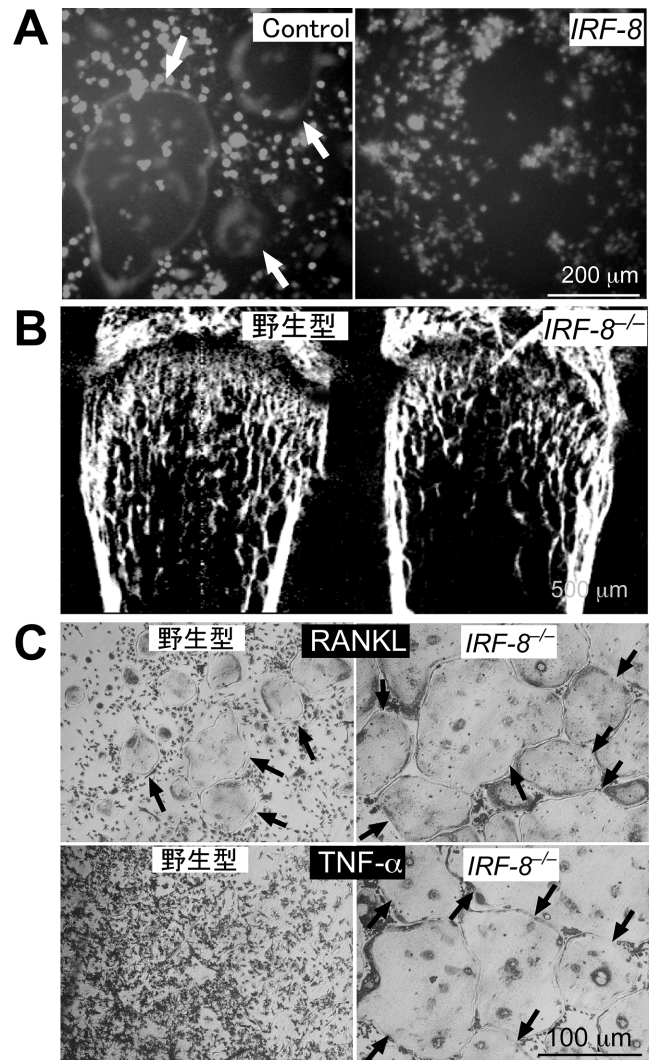


図2 破骨細胞分化における IRF-8 の機能

A, 破骨細胞の前駆細胞に Control ベクター [*EGFP* cDNA] または *IRF-8* cDNA を組み込んだベクター [*IRF-8*-IRES-*EGFP*] を用いて遺伝子を導入し、RANKL で刺激した。Control ベクターを導入した細胞 (左) は破骨細胞 (矢印) に分化したのに対して、*IRF-8* cDNA を導入した細胞 (右) は破骨細胞分化が抑制された。B, 野生型マウスと IRF-8 欠損マウスの大腿骨 X 線透過像。野生型マウスの大腿骨 (左) に比べて、IRF-8 欠損マウスの骨密度 (右) は減少している。C, 野生型マウス (左列) および IRF-8 欠損マウス (右列) の骨髓細胞から調整した破骨細胞の前駆細胞を RANKL (上段) または $\text{TNF-}\alpha$ (下段) で刺激した。IRF-8 欠損マウスから調整した前駆細胞は、野生型に比べて破骨細胞分化が強く促進された。矢印は多核破骨細胞を示す。

されている¹³⁾。そこで、IRF-8 が炎症性骨破壊に関与するかどうか検討するため、マウスの頭蓋骨膜に LPS を投与し炎症性骨破壊を誘導した。その結果、IRF-8 欠損マウスの

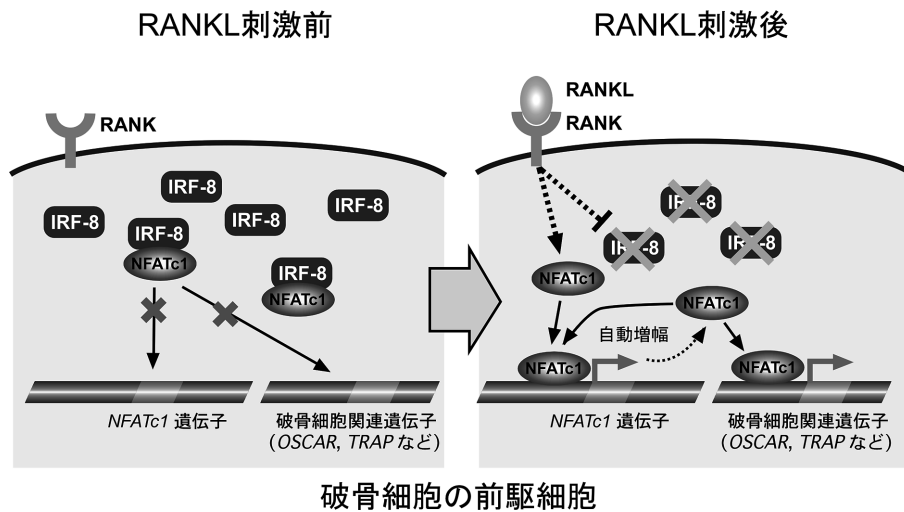


図3 破骨細胞分化における IRF-8 と NFATc1 との相互作用

破骨細胞の前駆細胞には IRF-8 が発現しており、NFATc1 の発現と機能を阻害することにより、破骨細胞分化を抑制する (左)。しかし、RANK シグナルが活性化されると IRF-8 の発現が低下し、NFATc1 に対する抑制が解除される。RANK シグナルと自動増幅 (auto-amplification) によって発現レベルが上昇した NFATc1 は、破骨細胞分化に関連する遺伝子である *OSCAR* や *TRAP* (*tartrate-resistant acid phosphatase*) などの遺伝子発現を調節し、破骨細胞分化を誘導する。

頭蓋骨では野生型に比べて重度の骨破壊が観察された¹¹⁾。

また、炎症性サイトカインの一つである TNF- α も RANKL と同様、破骨細胞分化を誘導する能力をもつが、その破骨細胞分化誘導活性は RANKL に比べると非常に弱い。ところが、IRF-8 欠損マウスから調整した破骨細胞の前駆細胞を TNF- α で刺激すると、野生型に比べて破骨細胞分化が強く促進された (図 2C)。このことは、炎症性骨破壊において、IRF-8 が TNF- α による骨破壊を阻止するという極めて重要な役割を担っていることを示唆する。

6. 破骨細胞分化を阻害する MafB と Bcl6 の機能

IRF-8 と同様に破骨細胞分化を抑制する細胞内因子として、転写因子として知られる MafB および、細胞内タンパク質である Bcl6 (B cell lymphoma 6) が報告されている^{14, 15)}。これらの因子は破骨細胞の前駆細胞に発現しており、RANK シグナルの活性化によって発現レベルが低下する。また、破骨細胞の前駆細胞にこれらの因子を強制的に発現させると破骨細胞分化が抑制されること^{14, 15)}、そして Bcl6 欠損マウスは、破骨細胞形成促進による骨粗鬆症を発症することが示された¹⁵⁾。さらに、Bcl6 の作用を明らかにした宮本博士のグループは、RANK シグナルが転写抑制因子である Blimp1 の発現上昇を介して Bcl6 の発現レベルを抑制することを明らかにした¹⁵⁾。

以上のように、RANKL-RANK 系は IRF-8 や MafB, Bcl6 などの発現を抑制することができる唯一のシステムであり、これは破骨細胞分化における新しい誘導機構として位置づけることができる。

7. おわりに

最近、バイオベンチャー企業である Amgen 社は新しい抗体医薬として、抗 RANKL ヒトモノクローナル抗体「デノスマブ (AMG162)」を開発した。この抗体を閉経後の女性に半年ごとに投与すると、骨密度と骨代謝が著明に改善され、骨折の発生率が有意に低下することが確認されている。これまで、骨粗鬆症の治療には破骨細胞の骨吸収機能阻害剤であるビスホスホネート製剤やカルシトニン製剤が主に用いられてきたが、デノスマブはこれらの薬剤とは作用点が異なり、骨粗鬆症だけでなく、リウマチや乳がんの骨転移に対しても高い治療効果が期待されている。今後さらに、破骨細胞分化研究が生命科学の発展と新しい医療技術の開発に役立つことを期待したい。

謝辞

本稿で紹介した IRF-8 に関する研究は、当時昭和大学大学院歯学研究科の大学院生であった、趙 宝紅 (Zhao, Baohong) 博士 (現 ニューヨーク特別外科病院) が中心

に行ったものである。ここに厚く感謝の意を表したい。

高見 正道, 上條 竜太郎
(昭和大学歯学部口腔生化学)

- 1) Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., & Shultz, L.D. (1990) *Nature*, **345**, 442-444.
- 2) Kaneda, T., Nojima, T., Nakagawa, M., Ogasawara, A., Kaneko, H., Sato, T., Mano, H., Kumegawa, M., & Hakeda, Y. (2000) *J. Immunol.*, **165**, 4254-4263.
- 3) Miyamoto, T., Arai, F., Ohneda, O., Takagi, K., Anderson, D. M., & Suda, T. (2000) *Blood*, **96**, 4335-4343.
- 4) Takayanagi, H. (2009) *Nat. Rev. Rheumatol.*, **5**, 667-676.
- 5) Sobacchi, C., Frattini, A., Guerrini, M.M., Abinun, M., Pangrazio, A., Susani, L., Bredius, R., Mancini, G., Cant, A., Bishop, N., Grabowski, P., Del Fattore, A., Messina, C., Errigo, G., Coxon, F.P., Scott, D.I., Teti, A., Rogers, M.J., Vezzoni, P., Villa, A., & Helfrich, M.H. (2007) *Nat. Genet.*, **39**, 960-962.
- 6) Hughes, A.E., Ralston, S.H., Marken, J., Bell, C., MacPherson, H., Wallace, R.G., van Hul, W., Whyte, M.P., Nakatsuka, K., Hovy, L., & Anderson, D.M. (2000) *Nat. Genet.*, **24**, 45-48.
- 7) Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., & Boyle, W.J. (1997) *Cell*, **89**, 309-319.
- 8) Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E.F., Mak, T.W., Kodama, T., & Taniguchi, T. (2002) *Dev. Cell*, **3**, 889-901.
- 9) 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.
- 10) Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., Tsujimura, T., Okuno, T., Yukawa, K., Mizui, M., Yamamoto, M., Prasad, D. V., Suzuki, K., Ishii, M., Terai, K., Moriya, M., Nakatsuji, Y., Sakoda, S., Sato, S., Akira, S., Takeda, K., Inui, M., Takai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Kumanogoh, A., & Kikutani, H. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 615-622.
- 11) Zhao, B., Takami, M., Yamada, A., Wang, X., Koga, T., Hu, X., Tamura, T., Ozato, K., Choi, Y., Ivashkiv, L.B., Takayanagi, H., & Kamijo, R. (2009) *Nat. Med.*, **15**, 1066-1071.
- 12) Tailor, P., Tamura, T., & Ozato, K. (2006) *Cell Res.*, **16**, 134-140.
- 13) Zhao, J., Kong, H.J., Li, H., Huang, B., Yang, M., Zhu, C., Bogunovic, M., Zheng, F., Mayer, L., Ozato, K., Unkeless, J., & Xiong, H. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 10073-10080.
- 14) Kim, K., Kim, J.H., Lee, J., Jin, H.M., Kook, H., Kim, K.K., Lee, S.Y., & Kim, N. (2007) *Blood*, **109**, 3253-3259.
- 15) Miyauchi, Y., Ninomiya, K., Miyamoto, H., Sakamoto, A., Iwasaki, R., Hoshi, H., Miyamoto, K., Hao, W., Yoshida, S., Morioka, H., Chiba, K., Kato, S., Tokuhisa, T., Saitou, M., Toyama, Y., Suda, T., & Miyamoto, T. (2010) *J. Exp. Med.*, **207**, 751-762.

Regulatory systems responsible for osteoclast differentiation
Masamichi Takami and Ryutaro Kamijo (Department of
Biochemistry, School of Dentistry, Showa University, 1-5-8
Hatanodai, Shinagawa, Tokyo 142-8555, Japan)

季節繁殖の制御機構と脳深部光受容器の解明

1. はじめに

温帯地域に生息する動物は、環境の季節変動に適応しながら子孫を残している。これらの動物の多くは、食糧資源や気温が仔の成長に適した春に、出産(産卵)できるよう、妊娠(孵卵)期間を逆算し、配偶子形成や性行動などの繁殖活動を行う。このような生存戦略を「季節繁殖」と呼ぶ。季節繁殖する動物は、日照時間の変化をカレンダーとして利用しているが、これは気温や降水量などの他の季節変動する環境因子と比較して、日照時間が正確な周期性を持つためであると考えられている。このように日照時間(光周期)の変化により生じる生理応答は「光周反応」と呼ばれている。本稿では、近年の研究により明らかになった季節繁殖の制御機構と、それを担う脳深部光受容器について紹介する。

2. 季節繁殖のモデル動物、ウズラ

脊椎動物の繁殖活動は視床下部—下垂体—性腺軸からなる内分泌系に支配されている。すなわち視床下部の性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)が下垂体前葉に作用すると、性腺刺激ホルモン(黄体形成ホルモン:LH及び卵胞刺激ホルモン:FSH)が血中に分泌される。性腺刺激ホルモンは性腺(精巣、卵巣)の発達を促し、性腺からは性ステロイドホルモンが産生される。季節繁殖動物が特定の季節に繁殖活動を営むためには、これらの内分泌系が日照時間の変化を読み取る中枢機構によって制御される必要がある。

我々はこの仕組みを解明するために、様々な脊椎動物の中で、最も敏速で劇的な光周反応を示すウズラ(*Coturnix japonica*)に着目した¹⁾。ウズラは非繁殖期の短日条件から繁殖期の長日条件に移すと、長日条件1日目の終わりに