

## 論文の内容の要旨

論文題目 Regulation of Osteoclast Differentiation by NFATc1  
(NFATc1 による破骨細胞分化の制御)

氏名 古賀 貴子

発生の段階で形成された骨は、生涯を通して骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスによって恒常性を維持している。歯周病、骨粗鬆症、骨腫瘍、変形性関節症、関節リウマチ等の骨破壊性疾患では、骨形成に比べて骨吸収が過剰になった結果、骨量減少をきたす。一方、骨吸収が骨形成に比して低下すると、大理石骨病や骨硬化症などの骨量増加の病態を呈する。このため、破骨細胞の分化・活性化の機構を明らかにすることは、骨疾患の病態の理解や治療のために非常に重要である。

破骨細胞は骨芽細胞などの間葉系ストローマ細胞との細胞間接着を介して造血幹細胞由来の単球/マクロファージ系前駆細胞から分化誘導される、多核の巨細胞である。骨芽細胞はマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)を分泌して破骨細胞前駆細胞に生存シグナルを伝達し、細胞膜上の破骨細胞分化因子(RANKL)を介して破骨細胞分化シグナルを活性化する。これまで、破骨細胞分化には M-CSF と RANKL は必須の細胞外刺激であり、それだけで十分であると考えられてきた。

RANKL は破骨細胞前駆細胞上でその受容体 RANK と結合する。RANK は tumor necrosis factor (TNF) 受容体ファミリーに属する受容体で、TNF receptor-associated factor 6

(TRAF6)と結合してシグナルを細胞内に伝える。TRAF6はRANKと結合すると3量体を形成し、NF- $\kappa$ B、Akt、および extracellular signal-regulated kinase(ERK)、Jun-N-terminal kinase(JNK)、p38などのMAPK経路を活性化する。また、RANKL/RANKシグナルは activator protein-1(AP-1)を構成する転写因子 c-Fos を誘導することでも AP-1 を活性化する。TRAF6、c-Fos、NF- $\kappa$ B といった因子は、そのノックアウトマウスが破骨細胞分化障害に起因する骨吸収の異常のために骨量が増加して骨髄腔が形成されない大理石骨病を引き起こすことから、必須因子であることが報告されてきた。しかしながら、これまで、破骨細胞分化に必須のRANKL/RANKの下流で活性化されるシグナル経路はTRAF6、NF- $\kappa$ B、MAPK(JNK、ERK、p38)、c-Fos、AP-1など、他のサイトカインやストレス応答で普遍的に活性化されるシグナル経路が中心であり、破骨細胞分化に結びつく直接的な過程をどうやって誘導するのか不明であった。

私は、RANKL誘導遺伝子の網羅的解析の結果、転写因子NFATc1(NFAT2)が最も強く誘導される転写因子であることを見出し、その破骨細胞分化における意義を解析した。NFAT転写因子ファミリーのなかでもNFATc1だけが特異的に増加し、生体内においても破骨細胞マーカーである酒石酸耐性酸フォスファターゼ(TRAP)陽性の破骨細胞において強く発現していることが明らかになった。その発現はRANKLで刺激したc-Fosノックアウトマウス、およびTRAF6ノックアウトマウス由来の骨髄細胞においては検出されないことから、NFATc1はc-FosとTRAF6に依存して発現することが示された。NFATc1はカルシウム依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリンを介して核へ移行し活性化されることが知られているので、破骨細胞分化におけるカルシウムシグナルの重要性を検討した。破骨細胞前駆細胞は、RANKL刺激により、カルシウムオシレーションと呼ばれる、連続した細胞内カルシウム濃度変動を示した。この現象は、カルシニューリンの阻害剤であるFK506とサイクロスポリンAにより阻害され、破骨細胞分化は強力に抑制された。このとき、これらの抑制剤はNFATc1の核移行を阻害していたが、興味深いことにNFATc1の発現も抑制していた。すなわち、NFATc1はカルシウム-カルシニューリン経路によって活性化されると、自分自身のプロモーターに結合してそのmRNAを自己増幅することが明らかになった。RANKLによる破骨細胞分化において、カルシウムシグナルはNFATc1の誘導と活性化に必須であることが初めて明らかになった。

次に、NFATc1ノックアウトマウスは胎生致死であるため、ES細胞からの破骨細胞分化システムを構築してNFATc1の破骨細胞分化における重要性を検討した。NFATc1を欠損するES細胞は破骨細胞分化が完全に傷害されていたことから、NFATc1は単球系前駆細胞からTRAP陽性の破骨細胞になる過程に必須の転写因子であることを証明した。さらに、NFATc1のレトロウイルスによる強制発現は、RANKLが存在しなくても高い効率で前駆細胞を破骨細

胞に分化誘導することを見出した。そして NFATc1 は TRAP やカルシトニン受容体など破骨細胞特異的遺伝子のプロモーターに直接作用してその転写活性を促進した。この転写誘導の際に、AP-1 の構成因子である c-Fos と c-Jun は NFATc1 に結合し、協調して作用する重要な転写パートナーであることが判明した。すなわち、NFATc1 は RANKL による破骨細胞分化において RANKL 下流の c-Fos と TRAF6 シグナルを統合するマスター転写因子であった。

続いて、私は RANKL によるカルシウムシグナルの活性化機構について解析した。免疫細胞におけるカルシウムシグナルの活性化に immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) をもつアダプタータンパクは重要な役割をもつことが知られている。また、ITAM をもつアダプタータンパクのひとつである DAP12 のノックアウトマウスは中程度の大理石骨病を呈することに着目し、破骨細胞分化における ITAM の役割を解析した。DAP12 欠損前駆細胞は RANKL と M-CSF による骨髓細胞単独での培養系では破骨細胞への分化が完全に障害されていたが、骨芽細胞との共存による培養系では分化は回復した。実際に、DAP12 ノックアウトマウスの骨組織において破骨細胞数は正常であった。このことは、骨芽細胞との接触を介して、何らかの分子が DAP12 欠損を補っていることを示唆していた。そこで破骨細胞前駆細胞において高発現しているもうひとつの ITAM 含有分子 FcR $\gamma$ に着目し、FcR $\gamma$  と DAP12 両分子の二重欠損マウス (DKO) を作成した。FcR $\gamma$  ノックアウトマウスの骨組織は正常で、FcR $\gamma$  ノックアウトマウス由来骨髓細胞からの破骨細胞分化も異常はみられなかった。一方、DKO マウスの骨組織には破骨細胞がほとんど存在せず重篤な大理石骨病を呈した。DKO 由来破骨細胞前駆細胞は、RANKL/M-CSF 系、共存培養系のどちらにおいても破骨細胞分化が完全に障害され、レトロウイルスを用いて FcR $\gamma$ を導入した DKO 由来前駆細胞は骨芽細胞の共存下で破骨細胞分化を回復した。このことは FcR $\gamma$ の担う骨芽細胞を介したシグナルが DAP12 の欠損を補う役割を持つことを明らかにしている。

次に、破骨細胞前駆細胞において ITAM 含有アダプター分子が結合する4つの免疫グロブリン様受容体 OSCAR、PIR-A、TREM-2 および SIRP $\beta$ 1 を同定した。OSCAR、PIR-A は FcR $\gamma$ と、及び TREM-2、SIRP $\beta$ 1 は DAP12 と結合した。これらの免疫グロブリン様受容体に対する抗体をもちいて受容体を架橋刺激すると、破骨細胞分化は促進された。さらに、DAP12 欠損細胞からの破骨細胞分化は OSCAR、PIR-A に対する抗体を用いた架橋刺激により回復し、破骨細胞分化において免疫受容体が重要な役割を果たすこと、および DAP12 欠損を補う FcR $\gamma$ の関与する骨芽細胞からのシグナルは免疫受容体 OSCAR、PIR-A を介することが明らかとなった。

DKO 細胞において RANKL 刺激による NFATc1 の発現は増加しなかったが、TRAF6 や c-Fos の発現や MAPK シグナルの活性化は正常であった。さらにレトロウイルスを用いた NFATc1 の強制発現により DKO 細胞の破骨細胞分化は回復した。これらのことは ITAM シグナルは RANKL 下流で NFATc1 - カルシウム経路を誘導する点において重要であることを示唆してい

る。また DKO 細胞や DAP12 欠損細胞は RANKL/M-CSF による単独培養系においてカルシウムオシレーションが観察されないが、PIR-A 抗体を用いた架橋刺激により DAP12 欠損によるカルシウムオシレーション障害は回復した。

さらに、FcR $\gamma$ および DAP12 の ITAM は RANKL 依存的にリン酸化されること、および RANKL シグナルは ITAM を介して PLC $\gamma$ をリン酸化し、カルシウムシグナルを活性化することをみいだした。以上より、免疫グロブリン様受容体が DAP12 または FcR $\gamma$ の ITAM を介して伝えるシグナルは、RANKL の共刺激シグナルとして破骨細胞分化に必須であることが解明され、RANKL と M-CSF だけでは破骨細胞分化に十分ではないことが示された。

本研究は破骨細胞分化における RANKL と M-CSF 以外の新たな分化シグナルを明らかにすると同時に、免疫細胞における制御分子が破骨細胞分化においても重要な役割を果たしていることを解明した。このことは、関節リウマチに代表されるような炎症性骨疾患における、免疫系によって制御される破骨細胞分化を理解し治療応用を開発するための重要な分子基盤となりうるであろう。