

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 破骨細胞分化におけるシグナル分子 TRAF6 の役割に関する研究

指導教員 中村耕三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

平成 15 年 3 月単位修得済満期退学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 門野 夕峰

緒論

骨組織の恒常性維持において破骨細胞は必要不可欠な役割を果たし、骨粗鬆症では破骨細胞による骨吸収が増大したり、関節リウマチなどの骨破壊性疾患では破骨細胞の分化、機能が亢進したりしている。破骨細胞の分化、活性化の機構を解明することは、これら骨粗鬆症や骨破壊性疾患の病態解明および治療開発に結びつく重要なものと考えられる。

破骨細胞は造血幹細胞由来の単球・マクロファージ系の多機能幹細胞から分化し、その分化は主にマクロファージコロニー刺激因子 M-CSF および破骨細胞分化因子 RANKL によって制御されている。RANKL 欠損マウス、または受容体 RANK 欠損マウスでは、破骨細胞分化障害をきたすため重篤な大理石骨病様の症状を呈する。RANK は腫瘍壊死因子 $TNF\alpha$ の受容体 TNFR のスーパーファミリー群に属し、細胞内シグナルアダプター分子である TRAF を介してシグナルを伝達する。TRAF6 欠損マウスでは、破骨細胞の分化障害による重篤な大理石骨病様の症状を呈し、TRAF6 欠損マウスの破骨細胞前駆細胞を M-CSF および RANKL 存在下で培養しても破骨細胞分化が見られないことから、RANKL が RANK に結合することによって惹起される破骨細胞分化シグナルは、主に TRAF6 によって媒介されていることが伺える。

TRAF6 は N 端側から RING フィンガー、Zinc フィンガー、TRAF-N ドメイン、TRAF-C ドメインという特徴的な構造を有するが、どの分子内構造が破骨細胞分化に重要なシグナ

ル分子 MAPK および転写因子 NF- κ B の活性化に必要であるかなど、破骨細胞分化や機能調節においてどのような役割を果たしているのか明らかにされていない。また TRAF6 は RANK だけでなく CD40 など他の TNFR スーパーファミリーからのシグナルや、IL-1R/TLR ファミリーからのシグナルも媒介するが、唯一 RANKL だけが破骨細胞分化を誘導するとされている。これら受容体からの TRAF6 シグナルに相違点が存在するかどうか、またそれが質的なものであるか量的なものであるかは検討されていない。本研究では以上の 2 点に着目して、分子生物学的手法を用いて破骨細胞前駆細胞に RANK、TRAF6 を中心としたシグナル分子の正常体または変異体を発現させ、破骨細胞分化シグナルを検討した。

第 1 章 TRAF6 分子内構造の破骨細胞分化における役割

野生種の胎児線維芽細胞 MEF を IL-1 α ならびに LPS 刺激したところ、転写因子 NF- κ B ならびにシグナル分子 MAPK である JNK と p38 の活性化が見られたが、TRAF6 欠損 MEF においてはこれらの活性化は見られなかった。レトロウィルスを用いて TRAF6 欠損 MEF に TRAF6 正常体を発現させたところ、これらの活性化は完全に回復したことから、IL-1 α ならびに LPS による NF- κ B、JNK、p38 の活性化には TRAF6 が必要不可欠であることが分かった。また N 端から順次、分子内構造を欠損させた TRAF6 変異体を導入することで行った機能解析の結果から、RING フィンガーおよび 5 つ存在するうちの 1 つ目の Zinc フィンガーは NF- κ B の活性化には必要ではないものの JNK または p38 の十分な活性化には必要であること、残り 4 つの Zinc フィンガーは NF- κ B、JNK、p38 すべての活性化に何らかの形で関与していることが分かった。

TRAF6 欠損マウス由来の破骨細胞前駆細胞を M-CSF と RANKL 存在下で培養しても一切破骨細胞は形成されないが、TRAF6 の正常体を発現させると骨吸収能を有する破骨細胞が形成されたことから、TRAF6 が破骨細胞分化において必要不可欠であることが確認された。また TRAF6 変異体を用いた機能解析の結果から、RING フィンガーが極性化して骨吸収能を獲得するという成熟段階に重要であること、N 端側から 2 つ目と 3 つ目の Zinc フィンガーが多核巨細胞になるまでの段階、つまり破骨細胞の分化に重要な働きをしていることも明らかとなった。こうして TRAF6 が破骨細胞の分化と成熟の両方の過程において重要な働きをしていることが初めて明らかとなった。

第 2 章 TRAF6 を介したシグナル強度と破骨細胞分化の関連

RANK には TRAF6 結合部位が 3 つ存在するが、TRAF6 と結合しないように結合部位に変異を入れた RANK 変異体を作成し、レトロウィルスを用いて破骨細胞前駆細胞に発現させ破骨細胞分化誘導能を検討した。RANK 正常体を発現させた細胞からは、骨吸収能を有する破骨細胞が多数形成され、同様に 1 つだけに変異のある RANK の変異体 E342A、E375A または E449A、また 2 つの TRAF6 結合部位に変異のある RANK の変異体 E342/449A および E375/449A を発現させた細胞からも破骨細胞が形成された。これらの結果から 1 番目または 2 番目の TRAF6 結合部位のうち少なくとも 1 つが存在すれば、骨吸収可能な破骨細胞を分化誘導することが可能であることが分かった。一方で、1 番目と 2 番目の両方に変異のある E342/375A と 3 つすべてに変異のある E3A を発現させた細胞からは破骨細胞はまったく形成されなかった。これらの結果は、これら変異体を介した p38 の活性化と関連していた。

次に RANK と最も相同性が高いとされる CD40 の破骨細胞分化における役割を検討した。前駆細胞上には NF- κ B と p38 を活性化できる機能的な CD40 が発現していたが、p38 の活性化の程度は RANKL に比べ弱く、破骨細胞分化を誘導できなかった。続いて CD40 を過剰発現させシグナルの増強を試みたところ、破骨細胞分化誘導の促進因子として知られている TGF- β の存在下で、p38 の活性化が増強、遷延化して、RANKL-RANK 非依存性に骨吸収能を有する破骨細胞が形成された。また TRAF6 結合部位を増やした CD40 変異体の破骨細胞分化誘導能の強弱を検討したところ、TRAF6 結合部位の増加に伴い、より多くの TRAF6 と会合してより強くかつより長く持続する p38 の活性化が誘導するようになり、TGF- β の非存在下でも破骨細胞分化を誘導できるようになった。また TRAF6 を過剰発現させるだけで、RANKL をはじめとしたリガンド刺激や TGF- β などの破骨細胞分化促進因子が存在しなくとも、骨吸収能を有する成熟破骨細胞が形成された。これらの結果から、TRAF6 を介したシグナルの強度がある閾値に達すれば破骨細胞分化を誘導でき、生理的条件下では RANKL だけが唯一この条件を満たしているものと考えられた。

総括

生理的条件下では破骨細胞の分化は RANKL、RANK、TRAF6 を介して伝達されるシグナルによって制御されている。第 1 章の結果から、TRAF6 は特徴的な分子内構造を介してシグナルを分配することで破骨細胞分化ならびに成熟を段階的に制御していることが分かった。また同じ TRAF6 を介していても、下流分子への伝達経路はシグナルを惹起するサ

イトカインによって異なることも分かった。第 2 章の結果から、受容体 RANK ならびに CD40 から惹起される TRAF6 シグナルの強度は異なり、その差異が生理的条件下における破骨細胞分化能の有無に影響を与えている可能性が示唆された。このシグナル強度の差異が生まれる原因としては、シグナル伝達に用いられる TRAF6 内の分子内構造が RANK と CD40 とでは異なる可能性や、これら受容体に結合する TRAF6 以外の分子の影響が考えられる。TRAF6 シグナルに対して促進的に機能する因子が多く活性化すれば、広義の破骨細胞分化シグナルは全体として増強され、抑制的なものが多いれば減弱され、シグナル全体の強度により破骨細胞分化が制御されていると考えることができる。

RANK や CD40 には TRAF6 だけでなく、TRAF6 と同様に NF- κ B や MAPK を活性化する TRAF2、TRAF5 も結合することが知られており、これらの分子の影響も考慮する必要がある。TNF α によって惹起されるシグナルは主に TRAF2 を介して下流に伝達されるが、TGF- β 存在下では TNF α により、RANKL-RANK-TRAF6 非依存性に、骨吸収能を獲得する前の段階までの破骨細胞分化が誘導され、IL-1 α などで TRAF6 を活性化すればこれらの細胞が骨吸収能を有する成熟破骨細胞にまで最終分化できることが最近分かった。関節リウマチなどで見られる炎症条件下では、滑膜によって RANKL のみならず TNF α 、CD40L、IL-1 α などのサイトカインが産生され、様々な経路で TRAF6 をはじめとする TRAF 分子が活性化されている可能性があり、生理的条件下とは異なった機構によって成熟破骨細胞が分化誘導されている可能性も考えられる。今後、生理的条件下だけでなく、病態に即した条件下における破骨細胞分化機構の解明は、関節リウマチなど骨破壊性疾患に対する「疾患特異的な治療法開発」に重要と考えられる。