

「サイトカインと破骨細胞分化におけるシグナル伝達」

増原 正明

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 先進治療科学専攻
生体機能制御学講座 歯科応用薬理学分野

Regulation of Cytokine Signal Transduction and Osteoclastogenesis

Masaaki Masuhara

Department of Applied Pharmacology, Kagoshima University
Graduate School of Medical & Dental Sciences
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan

Abstract

This review focuses on the signal transduction of cytokine receptors and of osteoclastogenesis. Cytokines regulate cell growth, differentiation, and transformation in immune, hematopoietic, and nervous system. Many of cytokine receptors exert their functions through JAK kinases and STAT transcription factors. The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 proteins are induced after stimulations with several cytokines, and bind to the kinase domain of JAK kinases, thereby inhibiting kinase activity. Hence, these proteins function in a classical negative feedback loop of cytokine signaling.

Bone resorbing osteoclast originates from monocyte-macrophage lineage cells. Two cytokines, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) are indispensable in the osteoclast differentiation process. RANKL expressed by osteoblasts activates TRAF adaptor proteins, c-Fos, and eventually induction of nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1, the master transcription factor of osteoclastogenesis. Cholesterol depletion suppresses the osteoclastogenesis, and the response of signaling molecules to the stimulation of RANKL is disordered. With the notice that RANKL stimulates the expression of caveolin-1, which is the scaffold protein of caveolae, signaling from lipid raft seems essential for the proper differentiation signals.

Key words: cytokine, SOCS family, osteoclast, caveolae

はじめに

筆者は大阪大学薬学部の学部および博士前期課程を修了後、久留米大学の博士課程に進み、同大学分子生命科学研究所において吉村昭彦教授（現 慶應大）のもとサイトカインシグナルについて研究を開始した。学位を取得後、大阪大学微生物病研究所（仲野徹教授）に博士研究員として異動し、*in vitro*での血球細胞分化系を用いて幹細胞がどのようにして未分化性を維持しているかについて調べた。その後血球つながりということで、明海大学（羽毛田慈之教授）にて破骨細胞分化の研究に携わってきた。

平成21年10月に鹿児島大学に赴任し、このような寄稿の機会を戴いたので、筆者のこれまでの研究、特にサイトカインシグナルの制御因子および破骨細胞分化についての研究について紹介をさせていただきたい。

1. サイトカインシグナルのネガティブフィードバック制御因子について

サイトカインとは免疫系をはじめとして造血系、神

経系など様々な細胞間での情報交換を担うタンパク質であり、免疫系調節を行っているインターロイキン、増殖因子として働くコロニー刺激因子(CSF)、神経細胞の成長・生存や機能維持を行う神経栄養因子、腫瘍壊死因子(TNF)など数百種類が発見されている。これらのサイトカインは細胞表面に存在する受容体に結合し、細胞内に情報を伝える。この時の受容体の活性化および情報伝達の形式から、サイトカインをいくつかに分類することができる。(図1)

- 上皮増殖因子(EGF)などの増殖因子の受容体は細胞内にチロシンキナーゼドメインを持つ。増殖因子の結合によりチロシンキナーゼが活性化され、アダプター分子のリン酸化を通じて Ras-MAPK、PI3K などの経路が活性化される。
- インターロイキン・インターフェロン(IFN)などの受容体は細胞内にキナーゼドメインを持たないが、JAK チロシンキナーゼが会合している。JAK チロシンキナーゼの活性化により、受容体のチロシン残基、アダプター分子のチロシン残基がリン酸化され、

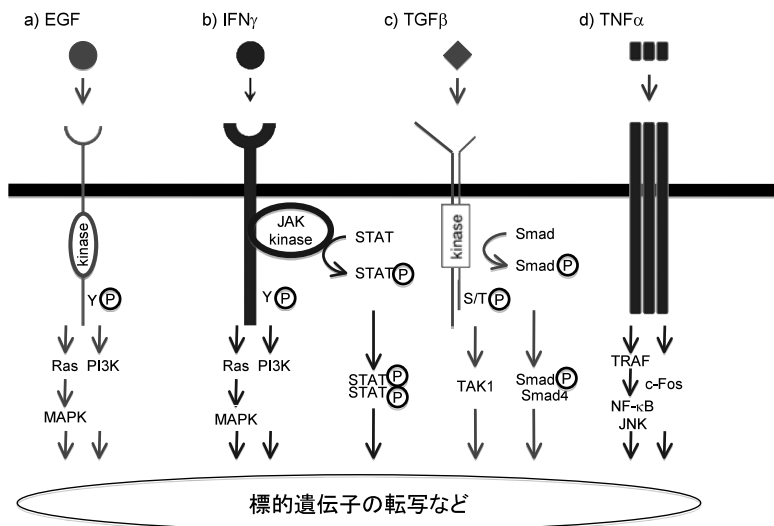


図1 サイトカイン受容体からのシグナル伝達

- EGF などの増殖因子の受容体はキナーゼドメインを有しており、リガンド結合によって活性化されたキナーゼが受容体のチロシン残基をリン酸化し、このリン酸化されたチロシンに結合したアダプター分子をもリン酸化することによって、下流にシグナルを伝達する。
- IFN γ など多くのサイトカイン受容体はキナーゼドメインを持っておらず、JAK family チロシンキナーゼが非共有結合で会合している。リガンド結合によって活性化されたキナーゼが a)と同様のシグナル伝達を行うのみならず、転写因子 STAT のリン酸化・活性化を行い、サイトカイン独自の遺伝子誘導を行う。
- TGF β 受容体はセリン/スレオニンキナーゼ活性を持っており、転写因子 Smad のリン酸化・活性化を通じて機能する。
- TNF などの受容体はいくつかのアダプター分子を通じて様々な経路が活性化される。TRAF から IKK を介して NF- κ B を活性化する経路、FADD からカスパーゼを活性化する経路などが存在する。

- a)と同様に Ras-MAPK, PI3K などが活性化されると共に、転写因子 STAT のリン酸化・活性化が引き起こされ、各サイトカインに特異的な遺伝子発現が誘導される。
- c) TGF β 受容体はセリン/スレオニンキナーゼドメインを持ち、転写因子 Smad のリン酸化・活性化を通じて標的遺伝子の発現を制御する。
- d) TNF 受容体などは TRAF (TNF receptor-associated factor) などのアダプター分子を介して転写因子 NF- κ B の活性化などを引き起こす。

筆者らが研究を開始した時点では上記の情報伝達経路の様々なスポットに未知の分子が存在し、重要な役割を担っている、ということが考えられていた。(もちろん現在でも情報伝達経路の全ての理解には至っていないのであるが。)

筆者がまず行ったのは b) の JAK チロシンキナーゼと会合している分子の探索である。Yeast Two-Hybrid 法を用いてスクリーニングを行った結果、JAK2 のキナーゼドメインに結合する新規分子を得ることができた。当初 JAK Binding Protein ということでも JAB と命名したこの分子は、指導教授である吉村教授がその数年前にクローニングおよび解析を行った分子 CIS

(Cytokine Inducible SH2 protein)^{1,2)}と相同性を持つ分子であった。筆者らの解析により、

- 1) この JAB が多くのサイトカインシグナルによって早期に誘導されること、
- 2) JAK キナーゼに結合してキナーゼ活性を抑制すること、
- 3) 下流のシグナル分子活性化を抑制すること、

が判明し、サイトカインシグナルのネガティブフィードバック調節因子であることが明らかとなった(図2)³⁾。この分子はオーストラリアおよび大阪大学医学部のグループにおいても独立にクローニングされ、SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling)-1, SSI (STAT-induced STAT inhibitor)-1 として同時に報告された^{4,5)}。

筆者らの引き続き解析から、この CIS および JAB にはいくつかのファミリー遺伝子が存在すること、そのうち CIS3 (SOCS-3 と同一分子) と名付けた分子もネガティブフィードバック因子であることが明らかとなった。またアミノ酸配列の解析から、リン酸化チロシンを認識する SH2 ドメイン以外に C 末端約 40 アミノ酸 (SOCS box) がよく保存されていることを明らかにした(図3)⁶⁾。この SOCS box は SCF ユビキチンリガーゼ複合体のうち基質タンパク質を認識すると

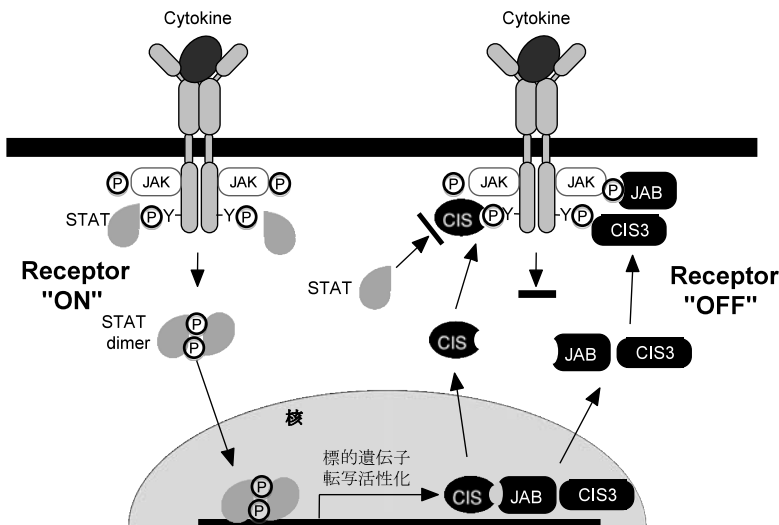


図2 サイトカインシグナルのネガティブフィードバック制御

サイトカインシグナルによって誘導された JAB, CIS3 は受容体に会合している JAK キナーゼに結合してその活性を抑えることによって、シグナルを終結させる。あるサイトカインによって誘導された JAB, CIS3 が他のサイトカインシグナルを抑制することもある。

考えられている F-box タンパク質に類似しており、標的分子のプロテアソーム依存性分解に関与していることが明らかにされた⁷⁾。現在ではこのモチーフは70種類以上のタンパク質に存在しており、様々なタンパク質の分解に関与していると考えられている⁸⁾。

さらに多数の変異体を作製して JAK2 と JAB の結合部位の解析を行った結果、JAB は JAK2 キナーゼのアクチベーションループと呼ばれる部位のリン酸化チロシンに結合して、酵素の活性中心部位への基質の接近を阻害するらしいこと、またこれらの機能に重要な部位は JAB の SH2 ドメインの N 末端側に存在していることが明らかとなった⁹⁾。

これら JAB/SOCS1 および CIS3/SOCS3 の研究から筆者が離れた後にノックアウトマウス作製をはじめとする研究結果が発表された。JAB/SOCS1 ノックアウトマウスは正常に生まれてくるが生後3週間で全身の炎症のため死亡し、この炎症は IFN γ ノックアウトマウスとのかけあわせで解消されることから、JAB/SOCS1 は IFN γ シグナルの制御因子という側面が最も大きいと考えられる^{10,11)}。また CIS3/SOCS3 ノックアウトマウスは胎生致死であり、特に造血幹細胞においてエリスロポエチンのシグナルを負に制御する因子であることが示された¹²⁾。しかしながら、両分子の組織

特異的なノックアウトマウスの結果から、これらが上記のシグナル制御にとどまらず、より広範なシグナルの制御に関与していることが示されている^{13,14,15)}。

2. 骨代謝研究について

筆者は上記のようにサイトカインシグナルについての研究、また大阪大学において血球細胞分化などについての研究^{16,17,18)}を行った後、明海大学歯学部に異動し骨リモデリング、特に破骨細胞についての研究を開始した。一見、それまでの研究と全く異なるように見えるが、「骨免疫学 (Osteoimmunology)」^{19,20)}という言葉で表されるように、骨と免疫は非常に近い存在である。それは血球細胞が骨髄内で分化増殖する、というだけでなく、関節リュウマチや歯周病などで炎症から骨破壊が引き起こされること、さらに骨吸収を行う破骨細胞は単球・マクロファージ系の前駆細胞から分化することからも分かるであろう。

骨は生体内で姿勢の保持、臓器の保護といった物理的な機能以外に、上に記した血球産生、カルシウム蓄積の場として働いている。成人では全く変化がないように見える骨であるが、実は少しずつ溶かされ、また新しく作り直されることが繰り返されている。この骨の吸収と再形成を骨のリモデリングと呼び、人間の成

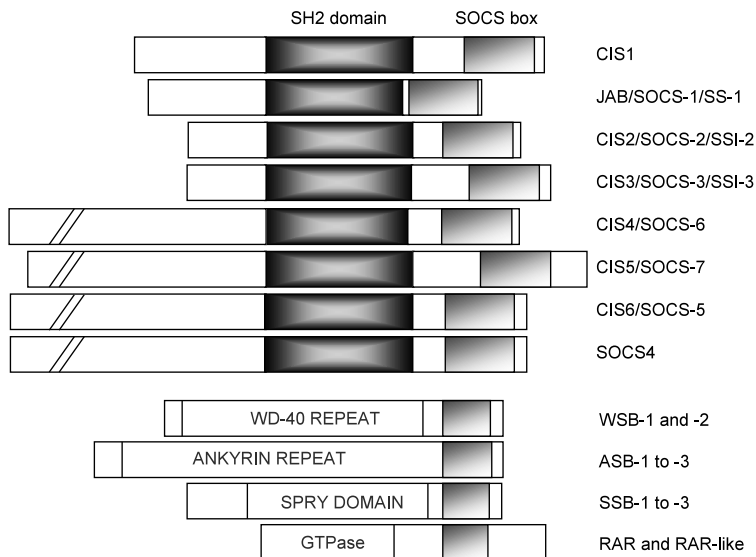


図3 SOCS ファミリー

SOCS ファミリーは C 末端側に約40アミノ酸の保存された配列: SOCS box を持つ。リン酸化チロシンを認識する SH2ドメインと SOCS box を持つ分子群と他のモチーフを持つ分子群が存在する。

人の場合数年で全身の骨がすべて新しいものに置き換わっている。このように常に骨を作り直すことによって微小骨折の蓄積を防ぎ、骨の質を保つことにも寄与しているのである。このリモデリングにおいて骨を吸収する細胞が破骨細胞 (Osteoclast)、骨を作る細胞が骨芽細胞 (Osteoblast) である。

骨芽細胞は間葉系幹細胞から分化する細胞で骨組織表面に存在している。骨形成時にはコラーゲン等の骨基質タンパク質を分泌し、ここにリン酸カルシウムが結晶化して沈着していく。骨芽細胞の多くは自らが分泌した基質の中に埋め込まれ骨細胞となる。微小骨折などにより生じる骨細胞のアポトーシスが、リモデリングに対するシグナルとなることが示されている²¹⁾。

破骨細胞は単球・マクロファージ系の細胞から分化する大型の多核細胞で、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼをマーカーとして確認することができる。骨と密着するシーリングゾーン、骨の無機質を溶かすための酸および有機質を溶かすためのプロテアーゼを分泌するひだ状の波状縁など特徴的な形態を有している。カルシトニンやビスホスホネートなど破骨細胞を抑制する薬物が臨床的に用いられている。

3. 破骨細胞分化について

骨粗鬆症の直接的な原因となりうることもあり、骨吸収を担う破骨細胞については精力的に研究がなされてきた。特に須田立雄らによって示された骨芽細胞との共存培養による骨髄細胞の破骨細胞への分化²²⁾、さらに1998年の破骨細胞分化因子 (ODF osteoclast differentiation factor = RANKL receptor activator of NF- κ B ligand) の同定^{23, 24, 25)}、高柳広らによる破骨細胞分化のマスター転写因子としての NFAT (nuclear factor of activated T cells) c1 の発見²⁶⁾、ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) シグナルの必要性の発見²⁷⁾、などにより以下に示すような多くのことが明らかになってきた。

図 4²⁸⁾で示すように、破骨細胞の分化には骨芽細胞の存在が必要である。まず骨芽細胞から産生される M-CSF は破骨細胞前駆細胞に生存シグナルを伝えている。そして、活性化ビタミン D₃、インターロイキン-1、副甲状腺ホルモン PTH などのいわゆる骨吸収因子が骨芽細胞を刺激して、破骨細胞分化因子 RANKL を細胞表面に誘導する。RANKL は TNF ファミリーのサイトカイン (図 1 d) であり、破骨細胞前駆

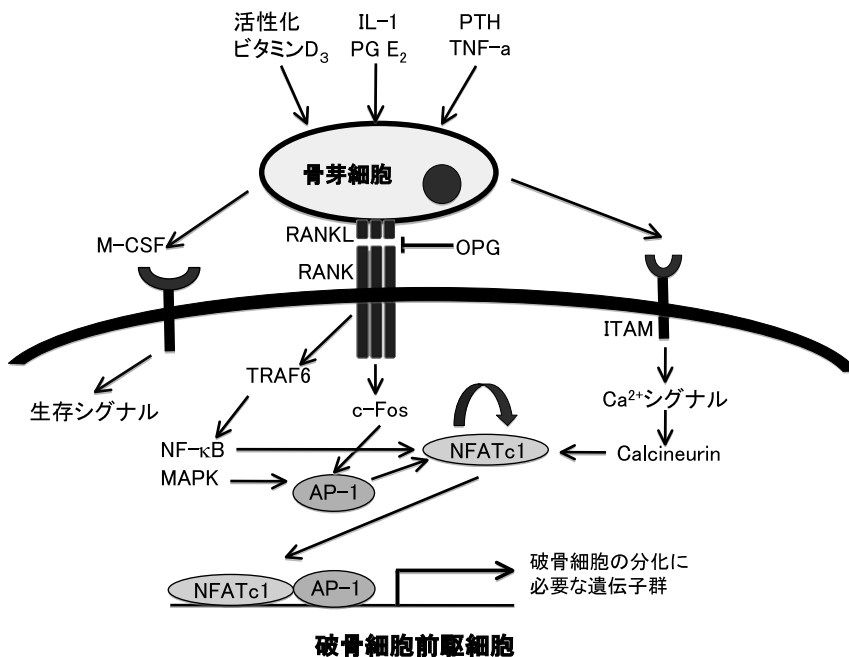


図 4 破骨細胞分化に関するシグナル

破骨細胞前駆細胞は骨芽細胞からの RANKL 刺激によって破骨細胞へと分化する。詳細は本文。(文献28より)

細胞上の受容体 RANK に結合して破骨細胞分化シグナルを伝達する。

破骨細胞前駆細胞は RANKL 刺激を受け RANK から細胞内に情報が伝達される。RANK にはアダプタータンパク質 TRAF が結合し、NF- κ B、MAPK などの下流分子を活性化する。また、c-Fos の誘導も起こり、AP-1 の活性化が引き起こされる³⁹⁾。これらのシグナルにより転写因子 NFATc1 の発現が誘導され、ITAM を介したカルシウムシグナルによってさらに活性化されることによって、破骨細胞の分化に必要な遺伝子群が誘導される。

このように破骨細胞の研究が進む中、筆者らは骨代謝とコレステロールの関連に着目した。それは、

- a) 骨量の低い患者では脳卒中などの血管障害への高いリスクが示されており、それらの疫学的関連から血管障害を引き起こす脂質代謝と骨代謝の間に高い相関が示唆されている。
- b) 閉経後の女性ではコレステロール値が上昇しやすく骨粗鬆症に罹患するリスクも高くなることが知られている。
- c) 高脂血症治療薬であるスタチン系薬剤は骨形成を促

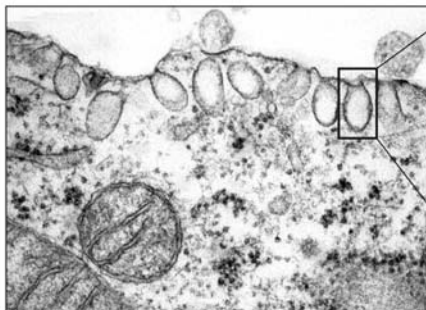
進、骨吸収を抑制することが知られている。

などのように、コレステロールと骨代謝に関係があると考えられるデータが増加してきているが、一方でその機構については全く分かっていないためである。*in vitro*での骨髄細胞から破骨細胞への分化系を用いて解析を行った結果、コレステロール除去血清を用いて培養した場合、破骨細胞の分化がほぼ完全に阻害されていた。これは *de novo* のコレステロール合成を阻害するシンバスタチン処理を行ったときにも同様の結果が得られた。シグナル分子について解析を行った結果、正常であれば RANKL 刺激によって ERK、I κ B α および Akt のリン酸化が起こるが、コレステロールを除去した場合 ERK、I κ B α は RANKL 刺激によらず恒常的にリン酸化されており、逆に Akt の活性化は見られなくなった。

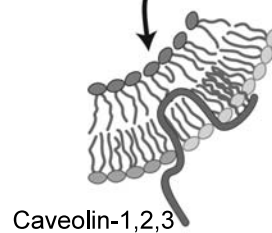
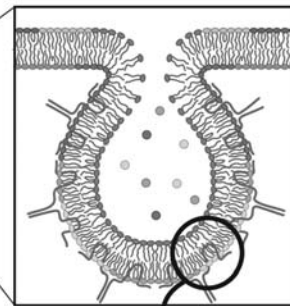
正常なシグナル伝達にはコレステロールが必須であると考えられるが、ではコレステロールは細胞でどのような働きをしているであろうか？

コレステロールは生体内でステロイドホルモンの前

細胞膜マイクロドメイン:カベオラの電子顕微鏡写真



カベオラの構造



Caveolin-1,2,3

図5 カベオラの電子顕微鏡写真および模式図

細胞膜は一様な膜ではなく、脂質ラフトと呼ばれるマイクロドメインが存在する。コレステロール、スフィンゴ脂質が集積しており、カベオリンと呼ばれる裏打ちタンパク質によってフラスコ状のくぼみ構造をとっているものをカベオラと呼び、シグナル伝達の「プラットフォーム」として機能していると考えられている。(文献³¹より)

駆体として働くほか、細胞膜に存在して重要な役割を果たしている。特に脂質ラフトと呼ばれる細胞膜マイクロドメインにはコレステロールとスフィンゴ脂質が多く含まれ、ここに膜タンパク質、例えば G タンパク質や Src タンパク質などがアシル化された後に局在し、同じく局在している受容体の情報伝達を調節している³⁰⁾。

さらにこの脂質ラフトに裏打ちタンパク質：カベオリンが集積してフラスコ状のくぼみ構造をとっているものがカベオラと呼ばれ、こちらにもシグナル伝達や物質輸送に関与している^{31, 32)}。図 5 にカベオラの電子顕微鏡写真および模式図を示す³¹⁾。

コレステロール除去によるシグナル伝達の不備が脂質ラフトと関係するかどうかを調べるために Methyl- β -cyclodextrin によって破骨細胞前駆細胞の細胞膜からコレステロールを除去してラフトを破壊すると ERK, I κ B α , Akt のシグナルについてコレステロール除去時と同様の結果が得られた。さらに破骨細胞前駆細胞を RANKL で刺激すると、刺激後早期にカベオリン遺伝子の発現が誘導され、発現したカベオリンタンパク質は速やかに細胞膜ラフトに移行することが明らかとなった。

これらの結果は、破骨細胞の分化に伴ってカベオラなどの細胞膜マイクロドメインに変化が起こり、おそらくは受容体・アダプター分子などの局在変化によ

て、正常な破骨細胞分化に必要なシグナルを送っていることを示唆している。これまで細胞分化にともなってラフトやカベオラなどの構造が変化する例はほとんど報告されておらず、詳細な解析が待たれる。

筆者らは他に破骨細胞特異的な NF- κ B の制御因子について解析し、リソソーム酵素活性と β ガラクトシダーゼなどへの保護タンパク質としての機能を持つ cathepsin A が NF- κ B の分解に関与しており、siRNA 法によって cathepsin A をノックダウンすると破骨細胞形成が亢進することを明らかにした(図 6)³³⁾。

RANKL のクローニング後約10年で骨代謝に関する研究は大きく進んだ。図 4 に示したシグナル伝達経路以外では2007年に加藤茂明らが閉経後骨粗鬆症の病因を解明している³⁴⁾。彼らは女性ホルモン欠乏が破骨細胞にどのような影響を与えるかについて検討し、その結果、女性ホルモンが破骨細胞内の受容体(ER)に結合してアポトーシスを引き起こすリガンド Fas Ligand の発現を誘導し、これによって破骨細胞の寿命が調節されていることを示した。

しかしながら残されている問題も多い。臨床面ではビスホスホネート薬剤と顎骨壊死の関係・機序の解明は喫緊の問題であろう。他にも、歯科矯正治療時の圧迫側での骨吸収・牽引側での骨形成が起こる機構、さらには歯や骨の形態を決定する仕組みなどの解明が待たれる。また破骨細胞分化の機能のみ注目されていた RANKL が中枢での体温調節に関与している³⁵⁾などの報告も出てきていることから、「骨と免疫」以上に異なるように見える分野との関わりの中で興味深い研究が出てくるものと考えられる。

参考文献

- 1) Yoshimura A., Ohkubo T., Kiguchi T., Jenkins NA., Gilbert DJ., Copeland NG., Hara T., Miyajima A.: A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J.*, 14, 2816-2826, 1995
- 2) Matsumoto A., Masuhara M., Mitsui K., Yokouchi M., Ohtsubo M., Misawa H., Miyajima A., Yoshimura A.: CIS, a Cytokine Inducible SH2 Protein, Is a Target of the JAK-STAT5 Pathway and Modulates STAT5 Activation. *Blood*, 89, 3148-3154, 1997
- 3) Endo TA., Masuhara M., Yokouchi M., Suzuki R., Sakamoto H., Mitsui K., Matsumoto A., Tanimura S.,

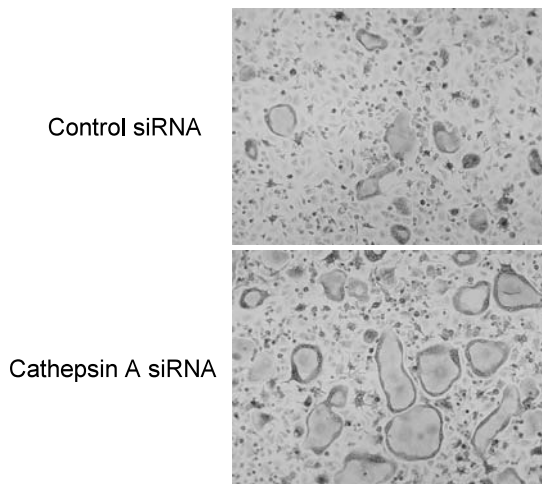


図 6 カテプシン A のノックダウンによる破骨細胞形成促進

骨髓細胞から破骨細胞を形成させる際に、カテプシン A に対する siRNA を処理するとコントロールと比較して破骨細胞形成の促進が見られた。(文献³³より)

- Ohtsubo M., Misawa H., Miyazaki T., Leonor N., Taniguchi T., Fujita T., Kanakura Y., Komiyama S., Yoshimura A.: A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, 387, 921-924, 1997 (First 3 authors contributed equally)
- 4) Starr R., Willson TA., Viney EM., Murray LJ., Rayner JR., Jenkins BJ., Gonda TJ., Alexander WS., Metcalf D., Nicola NA., Hilton DJ.: A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 387, 917-921, 1997
 - 5) Naka T., Narazaki M., Hirata M., Matsumoto T., Minamoto S., Aono A., Nishimoto N., Kajita T., Taga T., Yoshizaki K., Akira S., Kishimoto T.: Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 387, 924-929, 1997
 - 6) Masuhara M., Sakamoto H., Matsumoto A., Suzuki R., Yasukawa H., Mitsui K., Wakioka T., Tanimura S., Sasaki A., Misawa H., Yokouchi M., Ohtsubo M., Yoshimura A.: Cloning and characterization of novel CIS family genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239, 439-446, 1997
 - 7) Kamizono S., Hanada T., Yasukawa H., Minoguchi S., Kato R., Minoguchi M., Hattori K., Hatakeyama S., Yada M., Morita S., Kitamura T., Kato H., Nakayama Ki., Yoshimura A.: The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *J. Biol. Chem.*, 276, 12530-12538, 2001
 - 8) Piessevaux J., Lavens D., Peelman F., Tavernier J.: The many faces of the SOCS box. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 19, 371-381, 2008
 - 9) Yasukawa H., Misawa H., Sakamoto H., Masuhara M., Sasaki A., Wakioka T., Ohtsuka S., Imaizumi T., Matsuda T., Ihle JN., Yoshimura A.: The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J.*, 18, 1309-1320, 1999
 - 10) Alexander WS., Starr R., Fenner JE., Scott CL., Handman E., Sprigg NS., Corbin JE., Cornish AL., Darwiche R., Owczarek CM., Kay TW., Nicola NA., Hertzog PJ., Metcalf D., Hilton DJ.: SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell*, 98, 597-608, 1999
 - 11) Marine JC., Topham DJ., McKay C., Wang D., Parganas E., Stravopodis D., Yoshimura A., Ihle JN.: SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell*, 98, 609-616, 1999
 - 12) Marine JC., McKay C., Wang D., Topham DJ., Parganas E., Nakajima H., Pende H., Yasukawa H., Sasaki A., Yoshimura A., Ihle JN.: SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell*, 98, 617-627, 1999
 - 13) Kawazoe Y., Naka T., Fujimoto M., Kohzaki H., Morita Y., Narazaki M., Okumura K., Saitoh H., Nakagawa R., Uchiyama Y., Akira S., Kishimoto T.: Signal transducer and activator of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor 1 (SSI-1)/ suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) inhibits insulin signal transduction pathway through modulating insulin receptor substrate 1 (IRS-1) phosphorylation. *J. Exp. Med.*, 193, 263-269, 2001
 - 14) Naka T., Tsutsui H., Fujimoto M., Kawazoe Y., Kohzaki H., Morita Y., Nakagawa R., Narazaki M., Adachi K., Yoshimoto T., Nakanishi K., Kishimoto T.: SOCS-1/SSI-1-deficient NKT cells participate in severe hepatitis through dysregulated cross-talk inhibition of IFN-gamma and IL-4 signaling in vivo. *Immunity*, 14, 535-545, 2001
 - 15) Mori H., Hanada R., Hanada T., Aki D., Mashima R., Nishinakamura H., Torisu T., Chien KR., Yasukawa H., Yoshimura A.: Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat. Med.*, 10, 739-743, 2004
 - 16) Kitajima K., Masuhara M., Era T., Enver T., Nakano T.: GATA-2 and GATA-2/ER display opposing activities in the development and differentiation of blood progenitors. *EMBO J.*, 21, 3060-3069, 2002
 - 17) Masuhara M., Nagao K., Nishikawa M., Kimura T., Nakano T.: Enhanced degradation of MDM2 by a nuclear envelope component, mouse germ cell-less. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 308, 927-932, 2003
 - 18) Nakamura T., Arai Y., Umehara H., Masuhara M., Kimura T., Taniguchi H., Sekimoto T., Ikawa M., Yoneda Y., Okabe M., Tanaka S., Shiota K., Nakano T.: PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nature Cell Biol.*, 9, 64-71, 2007
 - 19) Arron JR., Choi Y.: Bone versus immune system. *Nature*, 408, 535-536, 2000
 - 20) Takayanagi H.: Osteoimmunology: shared mechanisms

- and crosstalk between the immune and bone systems. *Nature Rev. Immunology*, 7, 292-304, 2007
- 21) Tatsumi S., Ishii K., Amizuka N., Li M., Kobayashi T., Kohno K., Ito M., Takeshita S., Ikeda K.: Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab.*, 5, 464-475, 2007
- 22) Udagawa N., Takahashi N., Akatsu T., Tanaka H., Sasaki T., Nishihara T., Koga T., Martin TJ., Suda T.: Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 7260-7264, 1990
- 23) Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., Mochizuki S., Tomoyasu A., Yano K., Goto M., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K., Udagawa N., Takahashi N., and Suda T.: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/ osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 3597-3602, 1998
- 24) Lacey DL., Timms E., Tan HL., Kelley MJ., Dunstan CR., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian YX., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J., Boyle WJ.: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93, 165-176, 1998
- 25) Anderson DM., Maraskovsky E., Billingsley WL., Dougall WC., Tometsko ME., Roux ER., Teepe MC., DuBose RF., Cosman D., Galibert L.: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390, 175-179, 1997
- 26) Takayanagi H., Kim S., Koga T., Nishina H., Isshiki M., Yoshida H., Saiura A., Isobe M., Yokochi T., Inoue J., Wagner EF., Mak TW., Kodama T., Taniguchi T.: Induction and Activation of the Transcription Factor NFATc1 (NFAT2) Integrate RANKL Signaling in Terminal Differentiation of Osteoclasts. *Dev. Cell*, 3 889-901, 2002
- 27) 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.: Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature*, 428, 758-763, 2004
- 28) Takayanagi H.: Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J. Mol. Med.*, 83, 170-9, 2005
- 29) Boyle WJ., Simonet WS., Lacey DL.: Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423, 337-342, 2003
- 30) Simons K., Toomre D.: Lipid rafts and signal transduction. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 1, 31-39, 2000
- 31) Parton, RG.: Cell biology. Life without caveolae. *Science*, 293, 2404-2405, 2001
- 32) Hnasko R., Lisanti MP.: The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease. *Mol. Interv.*, 3, 445-464, 2003
- 33) Masuhara M., Sato T., Hada N., Hakeda Y.: Protective protein/cathepsin A down-regulates osteoclastogenesis by associating with and degrading NF- κ B p50/p65. *J. Bone Miner. Metab.*, 27, 46-56, 2009
- 34) Nakamura T., Imai Y., Matsumoto T., Sato S., Takeuchi K., Igarashi K., Harada Y., Azuma Y., Krust A., Yamamoto Y., Nishina H., Takeda S., Takayanagi H., Metzger D., Kanno J., Takaoka K., Martin TJ., Chambon P., Kato S.: Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*, 130, 811-823, 2007
- 35) Hanada R., Leibbrandt A., Hanada T., Kitaoka S., Furuyashiki T., Fujihara H., Trichereau J., Paolino M., Qadri F., Plehm R., Klaere S., Komnenovic V., Mimata H., Yoshimatsu H., Takahashi N., von Haeseler A., Bader M., Kilic SS., Ueta Y., Pifl C., Narumiya S., Penninger JM.: Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature*, 462, 505-509, 2009