

Ovlivnění signální cesty RANK/RANKL/OPG

O. RŮŽIČKOVÁ

Osteocentrum, Revmatologický ústav, Praha

SOUHRN

Růžičková O.: **Ovlivnění signální cesty RANK/RANKL/OPG**

Chronická onemocnění spojená s postižením kostí, jako jsou revmatoidní artritida a osteoporóza, postihují miliony lidí a představují obrovské ekonomické náklady na zdravotní a sociální péči.

Kostra je živá tkáň, která v průběhu celého života podléhá obměně. Remodelace, která zahrnuje kostní resorpci a novotvorbu, tak umožňuje adaptaci skeletu na aktuální potřeby organismu a zároveň sanuje vzniklá mikropoškození. Ztráta kostní hmoty provází mnoho onemocnění, jako jsou chronická infekční onemocnění, revmatoidní artritida, leukemie, postmenopauzální osteoporóza, kostní metastázy a mnohá další.

Kostní tkáň obsahuje tři typy specializovaných kostních buněk, jsou to osteoklasty, osteoblasty a osteocyty. Remodelace kosti je děj, který v daném čase probíhá v základních mnohobuněčných jednotkách BMU (basic multicellular unit) jen na určitých místech kostních povrchů. Je to kontinuální proces dvou dějů, a to kostní resorpce a kostní novotvorby, který umožňuje obnovu kostry při zachování její struktury. Diferenciace a aktivace osteoblastů a osteoklastů je regulována pomocí transkripčních faktorů (TF), cytokinů a růstových faktorů (GF), které jsou produkovány jednak lokálně, samotnými kostními buňkami, jednak systémovými faktory. RANKL/RANK má zásadní roli v diferenciaci a přežívání osteoklastů. OPG (osteoprotegerin) a RANKL mají zásadní úlohu v propojení funkce osteoblastů a osteoklastů. Stávají se tak cílem možného farmakologického ovlivnění kostní resorpce.

Po vazbě RANKLu na RANK dochází k aktivaci signální kaskády regulující diferenciaci a aktivaci osteoklastů. RANKL-RANK stimulace je nepostradatelná pro indukci osteoklastogeneze, ostatní signální dráhy mohou jen pozitivně či negativně tuto signalizaci ovlivnit.

OPG není schopen ovlivnit zánětlivou aktivitu onemocnění, ale je schopen zabránit vzniku erozí a destrukci kloubu. Efekt OPG je tedy spojen s regulací kostního obrátu.

Kostní remodelace, ztráta kostí jsou kontrolovány osou RANKL-RANK-OPG. RANKL je také produkován T buňkami po antigenním stimulu. Tyto T buňky se mohou podílet také na vývoji a aktivaci osteoklastů. Imunitní buňky se tedy účastní kostního metabolismu jak ve zdraví, tak v přítomnosti zánětlivých nebo autoimunitních onemocnění, jako je revmatoidní artritida.

Inhibice RANKL u pacientů s revmatoidní artritidou nemá žádný efekt na samotný zánětlivý děj, ale brání kostní ztrátě a vzniku erozí. Vývoj humánní monoklonální protilátky proti RANKLu, denosumabu, představuje nový, vysoce účinný přístup v prevenci fragilních osteoporotických fraktur, skeletálních komplikací malignit a kostních erozí u revmatoidní artritidy. Blokáda RANKL/RANK signalizace nevede k imunitní dysfunkci. Inhibice RANKLu nemá vliv na průběh zánětlivé reakce mediované T buňkami u RA.

Klíčová slova: osteoporóza, revmatoidní artritida, kostní remodelace, RANK, RANKL, OPG, denosumab

SUMMARY

Růžičková O.: **Modification of the RANK/RANKL/OPG signaling pathway**

Chronic diseases associated with bone involvement such as rheumatoid arthritis and osteoporosis affect millions of people and require enormous health and social care costs.

The skeleton is a living tissue undergoing renewal throughout the entire life. Thus, remodeling involving bone resorption and formation allows adaptation of the skeleton to the current needs of the organism and microdamage repair. Bone mass loss accompanies many diseases such as chronic infectious diseases, rheumatoid arthritis, leukemia, postmenopausal osteoporosis, bone metastases and many others.

Bone tissue contains three types of specialized bone cells – osteoclasts, osteoblasts and osteocytes. Bone remodeling is a process occurring at a given time in basic multicellular units (BMUs) in only certain areas of bone surfaces. It is a continuous process of two actions, bone resorption and bone formation, allowing renewal of the skeleton while preserving its structure. Differentiation and activation of osteoblasts and osteoclasts is regulated by transcription factors (TFs), cytokines and growth factors (GFs), produced both locally by bone cells themselves and by systemic factors. RANKL/RANK play a crucial role in osteoclast differentiation and survival. OPG (osteoprotegerin) and RANKL have a key role in interconnecting osteoblast and osteoclast functions. Thus, they become a target of potential pharmacological influence on bone resorption.

After RANKL binds to RANK, a signaling cascade regulating osteoclast differentiation and activation is activated. RANKL-RANK stimulation is indispensable for induction of osteoclastogenesis. The other signaling pathways may only influence this signaling positively or negatively.

Although OPG is unable to influence the inflammatory activity of diseases it is able to prevent the development of joint erosion and destruction. Thus, the effect of OPG is associated with bone turnover regulation.

Bone remodeling and bone loss are controlled by the RANKL-RANK-OPG axis. RANKL is also produced by T cells after antigenic stimuli. These T cells may also participate in osteoclast development and activation. Thus, immune cells are involved in bone metabolism in both health and in the presence of inflammatory or autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis.

Inhibition of RANKL in patients with rheumatoid arthritis has no effect on the inflammatory action itself but prevents bone loss and development of erosions.

The development of denosumab, a human monoclonal antibody against RANKL, represents a new, highly effective approach to prevention of fragility osteoporotic fractures, skeletal complications of malignancies and bone erosions in rheumatoid arthritis. Blockade

of RANKL/RANK signaling does not lead to immune dysfunction. Inhibition of RANKL has no impact on the course of inflammatory reaction mediated by T cells in rheumatoid arthritis.

Keywords: osteoporosis, rheumatoid arthritis, bone remodeling, RANK, RANKL, OPG, denosumab

Osteologický bulletin 2012;17(1):21–31

Adresa: MUDr. Olga Růžicková, Osteocentrum, Revmatologický ústav, Na Slupi 4, 120 00 Praha 2, e-mail: ruzic@revma.cz

Došlo do redakce: 28. 11. 2012

Přijato k tisku: 3. 4. 2012

Úvod

Chronická onemocnění spojená s postižením kostí, jako jsou revmatoidní artritida a osteoporóza, postihují miliony lidí a představují obrovské ekonomické náklady na zdravotní a sociální péči. Je proto nutné přizpůsobit diagnostické a terapeutické procesy novým klinickým výsledkům. Díky výsledkům výzkumu v posledních letech se strategie léčby těchto onemocnění zaměřila směrem k třem molekulám z rodiny tumor necrosis factor TNF, kterými jsou receptor aktivátor NF-kappaB (RANK), jeho ligand RANKL a kompetitivní receptor pro RANKL, osteoprotegerin (OPG). Výzkum potvrdil centrální roli těchto molekul v procesu diferenciace, funkce a přežívání osteoklastů. RANK-RANKL signální cesta nemá význam jen pro činnost osteoklastů, ale ovlivňuje mnoho dalších dějů. Má vliv na homeostázu kosti, je nezastupitelná v procesu formace lymfatických uzlin, mikroprostředí thymu, pro rozvoj prsní žlázy v průběhu gravidity. Zároveň je tato signální cesta ovlivňována mnoha dalšími faktory jak v prostředí kosti, tak systémově prostřednictvím různých působků a cytokinů. Ovlivnění signální cesty RANK-RANKL se zdá být slibné z hlediska možnosti léčby kostní ztráty u artritidy, kostních metastáz,

osteoporózy a dalších [20]. Z posledních výzkumů vyplývá, že i imunitní buňky mohou zasahovat do metabolismu kosti.

Osteoporóza je chronické metabolické onemocnění skeletu, charakterizované nerovnováhou mezi procesem kostní resorpce a kostní formace, vedoucí ke ztrátě kostní hmoty a deterioraci mikroarchitektury kosti. U postmenopauzálních žen vede pokles hladiny estrogenů k prudkému nárůstu kostní remodelace, kdy vzestup kostní resorpce není následován dostatečně kostní novotvorbou. S prohlubujícím se úbytkem kostní hmoty dochází ke ztrátě pevnosti kosti a stoupá riziko zlomenin, které ve svém důsledku vedou k nárůstu morbidity a mortality [1].

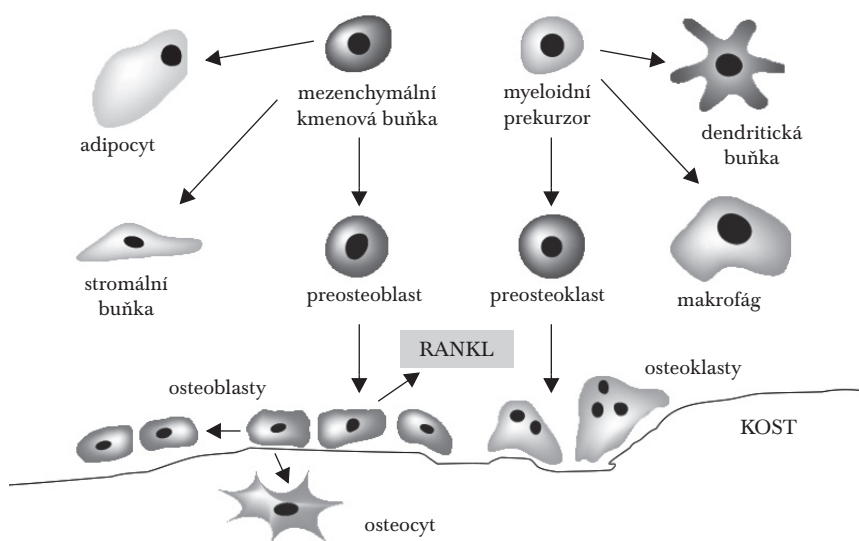
Remodelace kosti

Kostra je živá tkáň, která v průběhu celého života podléhá obměně. Skelet slouží jako opora pro svalový aparát, chrání vnitřní orgány, je místem krvetvorby, podílí se na udržení homeostázy organismu. Celý skelet se obnoví přibližně každých 10–20 let. Remodelace, která zahrnuje kostní resorpci a novotvorbu, tak umožňuje adaptaci skeletu na aktuální potřeby organismu a zároveň sanuje vzniklá mikro-

poškození. Pokud dojde k porušení rovnováhy mezi novotvorbou a resorpcí kosti, vzniká nejprve osteopenický stav, a pokud tato nerovnováha trvá, dojde ke vzniku osteoporózy se všemi jejími komplikacemi, vedoucí k výraznému zhoršení kvality života a zvýšení morbidity i mortality. Na vzniku této nerovnováhy se mohou podílet hormonální změny, nadprodukce zánětlivých cytokinů, růstové faktory. Ztrátu kostní hmoty provází mnoho onemocnění, jako jsou chronická infekční onemocnění, revmatoidní artritida, leukemie, postmenopauzální osteoporóza, kostní metastázy a mnohá další.

Kostní remodelace probíhá jak na endokortikálním, tak na trabekulárním kostním povrchu, a také intrakortikálně k zajištění správné adaptace a funkce skeletu, včetně hojení mikropoškození a zajištění homeostázy kalcia. Kostní tkáň je rezervoárem kalcia

Obr. 1
Diferenciace a zrání kostních buněčných linií



Upraveno dle: Walsh MC, et al. Ann. Rev. Immunol. 2006; 24:33-63

a fosfátu, který je schopen se v případě nutnosti podílet na udržení homeostázy vnitřního prostředí. Remodelace kosti probíhá na kostních površích, tento děj zahrnuje kostní resorpci zprostředkovanou osteoklasty, následovanou depozicí nové kosti produkované osteoblasty. Osteoblasty tvoří osteoid, který začíná mineralizovat asi po 10 dnech. Za fyziologických okolností jsou procesy resorpce a formace vyrovnány a množství odbourané a novotvořené kosti je v rovnováze. Běžný remodelační cyklus trvá 4–6 měsíců, většinu času zabírá novotvorba. Během jednoho roku je remodelováno přibližně 10 % skeletu, tzn. že celá kostra se obnoví přibližně za deset let. Remodelace probíhá na všech površích kostí dle aktuální potřeby.

Kostní tkáň obsahuje tři typy specializovaných kostních buněk, jsou to osteoklasty, osteoblasty a osteocyty. Osteoklast je buňka odvozená z hematopoetických buněk monocytomakrofágové linie. Hemopoetická prekursorová buňka kostní dřeně potřebuje pro svou diferenciaci v preosteoklast stimulaci růstovým faktorem – kolonie makrofágů stimulující faktor 1 CSF 1 (colony stimulating factor 1). Osteoklast je zodpovědný za resorpci kosti. Diferencovaný osteoklast je mnohobuněčná buňka, vybavená zřasenou membránou schopnou přilnutí k povrchu kosti. Zde pak dochází k sekreci kyselin a enzymů (tkáňové metalloproteinázy, katepsin K), které umožňují vlastní resorpci kostní tkáně. Ke vzniku mnohobuněčného zralého osteoklastu dochází po navázání cytokinu – ligandu aktivátoru receptoru nukleárního faktoru kappaB (RANKL), který je produkovan osteoblasty a T lymfocyty a který se váže na svůj receptor (RANK). RANKL/ RANK má zásadní roli v diferenciaci a přežívání osteoklastů. Osteoblasty jsou pak odvozeny z pluripotentní mezenchymální kmenové buňky (MSC). Jejich úkolem je syntéza nové kostní hmoty, osteoidu a umožnění následné mineralizace. Osteocyty jsou terminálně diferencované osteoblasty zavzaté do vlastní mineralizované kostní hmoty. Osteocyty představují asi 90 % všech kostních buněk dospělého skeletu. Tyto buňky jsou propojeny vzájemně a také s osteoblasty na kostním povrchu pomocí rozsáhlé sítě kanálků, které jsou naplněny kostní extracelulární tekutinou. Takto propojené buňky pak pracují jako mechanosenzor, registrující působící síly a mikropoškození. V návaznosti na tuto funkci dále probíhá remodelace a reparace kosti (obrázek 1).

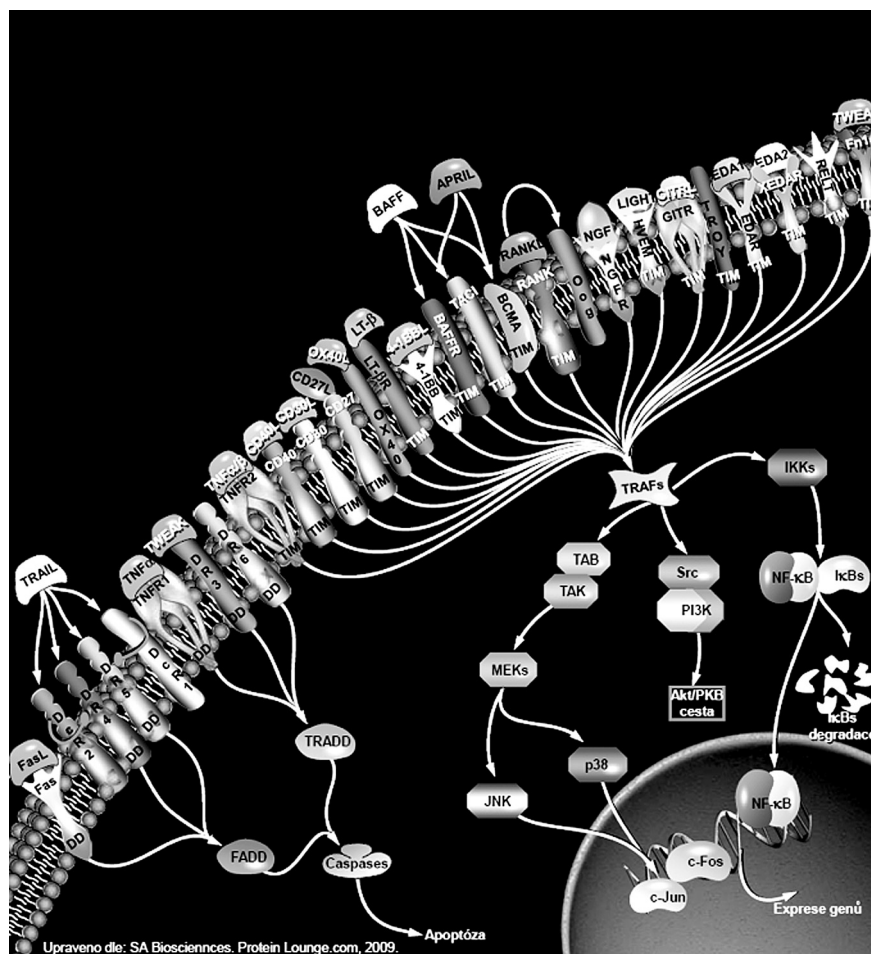
Remodelace kosti je děj, který v daném čase probíhá v základních mnohobuněčných jednotkách BMU (basic multicellular unit) jen na určitých místech kostních povrchů. Je to kontinuální proces dvou dějů, a to kostní resorp-

ce a kostní novotvorby, který umožňuje obnovu kostry při zachování její struktury.

Diferenciace a aktivace osteoblastů a osteoklastů je regulována pomocí transkripčních faktorů (TF), cytokinů a růstových faktorů (GF), které jsou produkovány jednak lokálně, samotnými kostními buňkami, jednak systémovými faktory. Pro rozvoj osteoblastické řady jsou klíčové TF Runx2/cbfa 1 a Osx (osterix). Protichůdně pak na pluripotentní kmenovou buňku působí TF Ppar gamma, který vede k přeměně kmenové buňky na adipocyt. A to je důležitý faktor stárnutí skeletu. Protein 5 a/nebo 6 spojený s LDL receptorem (LRP5, LRP6), spojený s koreceptorem frizzled (Fzd), jeho agonistou (Wnts) a antagonistou (Dickkopf, Dkk1, sklerostin, SOST) využívající beta-kateninové cesty, jsou hlavními regulátory kostní formace. Ačkoliv terminální specifické faktory účastníci se konečné diferenciace osteoblastů v osteocyty nejsou přesně známy, je jisté, že v tomto procesu se účastní sclerostin, fibroblastový růstový faktor (FGF-23), periostin, dentinový kyselý fosfoprotein (DMP-1) a další molekuly zapojené do homeostázy mineralizované tkáně [2,3].

Diferenciace osteoklastu je závislá na několika transkripčních faktorech (PU.1 a AP-1 skupiny, jako je Fos) a nukleárním faktoru aktivovaných T buněk (NFATc1)

Obr. 2
TNF superrodina



a velmi specifickém cytokinu, ligandu aktivátoru receptoru nukleárního faktoru kappaB (RANKL), který je produkován osteoblasty a T lymfocyty, a který se váže na svůj receptor (RANK). B lymfocyty a další buňky produkují osteoprotegerin (OPG), který působí jako kompetitivní antagonistu vazby RANKLu na RANK, a brání tak osteoklastogenezi. OPG a RANKL mají zásadní úlohu v propojení funkce osteoblastů a osteoklastů. Stávají se tak cílem možného farmakologického ovlivnění kostní resorpce.

Pro zdárný průběh remodelace kosti je nutná vzájemná interakce mezi osteoklasty a osteoblasty. Tato komunikace v mikroprostředí kosti probíhá pomocí již zmíněných tří

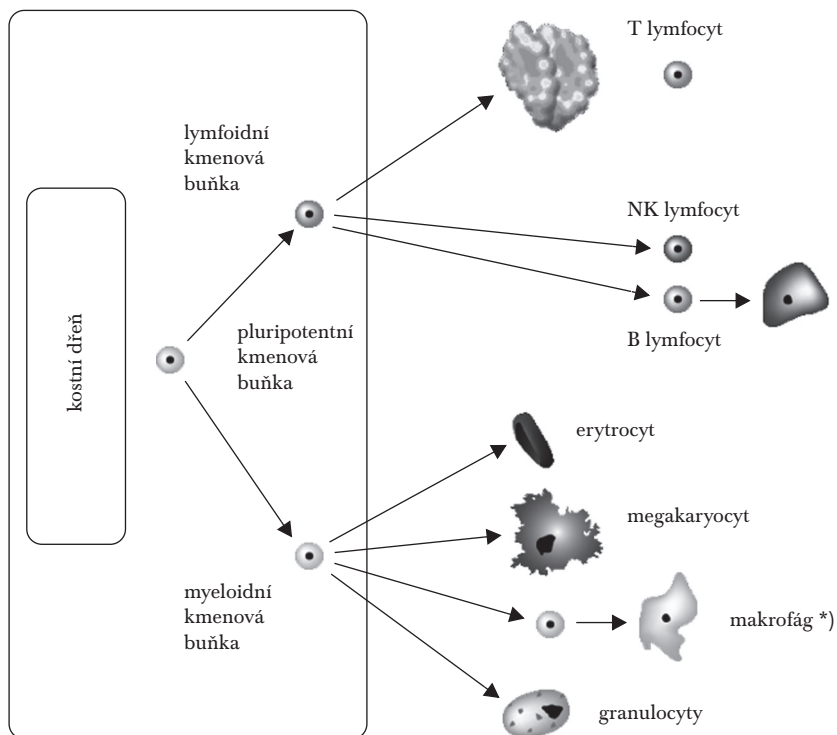
molekul z rodiny TNF alfa ligandů a receptorů. Jsou to: ligand pro receptor aktivátoru nukleárního faktoru kappaB (RANKL), jeho receptor RANK a OPG. RANKL je klíčovým faktorem diferenciaci, aktivace a přežívání osteoklastů. Je produkován osteoblasty a T lymfocyty [4]. Osteoprotegerin je pak kompetitivním inhibitorem vazby RANKLu na RANK, tedy inhibitorem diferenciaci a aktivace osteoklastů, tedy inhibitorem osteoresorpce. Vzájemný poměr RANKL a OPG v mikroprostředí kosti určuje převahu nebo deficit osteoresorpce vůči novotvorbě kosti. Tento mechanismus je univerzální pro děje spojené s resorpcí kosti. U žen s nízkou hladinou estrogenu, u postmenopauzálních žen byly nalezeny zvýšené hladiny RANKLu na buňkách kostní dřeně. Z některých studií vyplývá souvislost mezi vzájemným poměrem RANKL a OPG a vznikem cévních kalcifikací. V patogenetickém procesu úbytku kostní hmoty se účastní i další faktory jako: IGF (inzulinu podobný růstový faktor), TGF – beta. I další cytokiny jako IL-1, prostaglandiny, IL-6, TNF-alfa. Dále do kostní remodelace zasahují i oxid dusnatý a leukotrieny (obrázek 2).

Osteoprotegerin

Osteoprotegerin (OPG) je členem superrodiny TNF alfa ligandů a receptorů, byl poprvé identifikován nezávisle na sobě dvěma skupinami vědců v roce 1997 (Simone et al., 1997; Tsuda et al., 1997). Byl podán důkaz o jeho centrální roli v regulaci kostní remodelace inhibicí osteoklastogeneze. Osteoprotegerin je složen ze 401 aminokyselin [5]. Je to secernovaný glykoprotein účastnící se regulace kostní remodelace. Působí jako kompetitivní receptor pro ligand receptoru aktivátoru nukleárního faktoru kappaB (RANKL) a změna jeho koncentrace v mikroprostředí kosti je spojena s celou řadou kostních onemocnění. Osteoprotegerin (OPG), ochránce kosti, byl první objevenou molekulou v systému RANK-RANKL-OPG. Jde o solubilní protein syntetizovaný v podobě prekursoru. OPG lze nalézt v mozku, játrech, plicích, srdci, ledvinách, kosterních svalech, kůži, žaludku, varlatech a placentě. Inhibicí s TNF spojeného apoptotického ligandu (TRAIL, TNF- related apoptosis – inducing ligand) inhibuje apoptózu.

K udržení rovnováhy mezi kostní formací a resorpcí je nutná inhibice interakce RANKL a RANK vazbou OPG. Osteoprotegerin je produkován osteoblasty a působí jako decoy receptor

Obr. 3
Diferenciace a zrání osteoklastů



*) linie makrofágů se diferencuje v různé typy buněk: osteoklasty, dendritické buňky, mikroglie

Upraveno dle: Yin T, Li L, J. Clin. Invest. 2006; 116:1195-1201.

Obr. 4
Cytokiny modulující expresi RANK/RANKL

Cytokin	RANKL	OPG	RANK
TNF	↑	↑	↑
IL-1	↑	↑	
Ca ²⁺	↑	↑	
IL-17	↑		
CD40L		↑	
TGF	↓	↑	↓
dexametazon	↑	↓	↑
CsA, FK506	↑	↓	
IL-6			stimulace zrání makrofágů

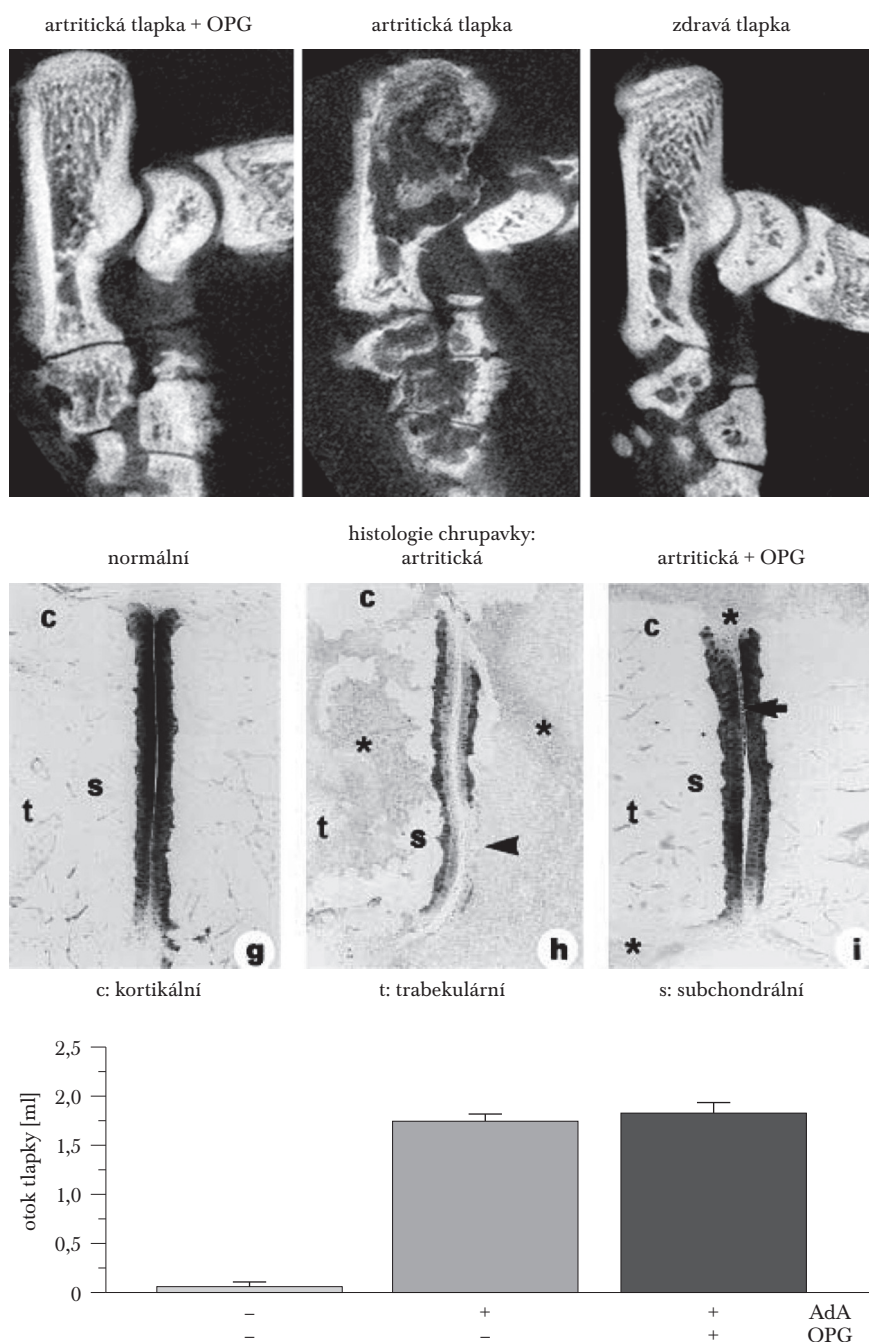
váží se na RANKL, čímž brání vazbě na RANK, a tím následné aktivaci osteoklastů, a tedy i kostní resorpci [6,7]. Osteoprotegerin má klíčovou úlohu v regulaci kostní remodelace a mnoho studií prokázalo jeho úlohu při mnoha kostních onemocněních. Byla prokázána úloha OPG v patogenezi osteoporózy a revmatoidní artritidy. Osteoporóza je onemocnění spojené se snížením denzity kostního minerálu (BMD) díky zvýšené osteoklastické aktivitě, která je spjata s poklesem hladiny estrogenů u žen po menopauze. Bylo prokázáno, že podání estrogenů do kultury lidských osteoblastů vede ke zvýšení produkce OPG. Obdobné výsledky byly získány ve studii se SERM [8]. Z toho vyplývá, že estrogeny regulovaná produkce OPG je částečně odpovědná za jeho ochranný efekt na kostní denzitu, která po menopauze klesá. Obdobně bisfosfonáty vedou k normalizaci kostního obratu inhibicí osteoklasty zprostředkované kostní resorpce a jsou schopny zvýšit hladinu osteoprotegerinu v trabekulárních osteoblastech [9].

Faktory chránící před ztrátou kostní hmoty vedou k nárůstu OPG, faktory indukující osteoporózu jako např. glukokortikoidy snižují hladinu OPG. U dexametazonu bylo potvrzeno snížení exprese mRNA pro OPG u osteoblastických buněk [10].

Zatímco osteoporóza je charakterizována zvýšeným rizikem fraktur při sníženém množství kostní hmoty a poruše mikroarchitektury kosti, revmatoidní artritida je charakterizována chronickým zánětem synoviální tkáň kloubů, který vyústí v destrukci chrupavky i kosti, částečně zapříčiněné zvýšenou osteoklastogenezí. V reakci in vitro v kulturách synoviálních fibroblastů u revmatoidní artritidy a mononukleárních buněk periferní krve dochází k formaci osteoklastům podobných buněk [11]. V souladu s pozorováním in vitro byly výsledky studií provedených in vivo, které také prokázaly spojení mezi OPG, osteoporózou, revmatoidní artritidou, ale také zánětlivým střevním onemocněním, které také může být spojeno s kostní ztrátou. OPG může zabránit úbytku kostní hmoty a akumulaci osteoklastů, stejně tak jako ochránit chrupavku. U TNF alfa indukované artritidy brání OPG vzniku kostních erozí a snad také destrukci kloubů spojené s artritidou. I když OPG není schopen ovlivnit zánětlivou aktivitu onemocnění, je schopen zabránit vzniku erozí a destrukci kloubu. Efekt OPG je tedy spojen s regulací kostního obratu [12].

Byla také provedena celá řada klinických studií, zaměřených na sledování souvislosti OPG a některých kostních nemocí. Silná asociace byla prokázána u mutací genu OPG a juvenilní Pagetovy choroby (JPD). Toto onemocnění známé také jako idiopatická hyperfosfatázie, je autozomálně recesivně dědičné onemocnění, charakterizované akcelerovaným kostním obratem celého skeletu. Závažnost JPD se pohybuje ve škále od těžkých deformit skeletu zabraňujících mobilitě, vedoucích k frakturám, zástavě růstu, morbiditě a mortalitě až po mírné formy s minimálním postižením, kdy není postižen růst. Již zjištěných mutací je celá řada,

Obr. 5
Inhibice RANKL brání vzniku erozí chrupavky a kosti bez vlivu na zánětlivou aktivitu artritidy u krys



Upraveno dle: Kong YY, et al. Nature. 1999; 397:315-23. Stolina M, et al. J Bone Miner Res. 2005; 20:1756-65.

mimo změny samotné molekuly, může být postižena vazebná afinita k molekule RANKL, nebo je tato vazba nedostačující [13].

U postmenopauzální osteoporózy byla provedena celá řada studií, zaměřených na souvislost mezi sérovou hladinou OPG a BMD u postmenopauzálních žen. Výsledky těchto sledování nejsou jednotné. V jedné srovnávací studii 206 bílých postmenopauzálních žen byla pozorována pozitivní korelace mezi sníženou sérovou hladinou osteoprotegerinu a sníženou hodnotou BMD, stejně tak jako se zvýšenou incidencí obratlových zlomenin [14]. V dalších studiích bylo zjištěno, že u postmenopauzálních žen s osteoporózou při léčbě bisfosfonáty dochází při měřeních po 6 a 12 měsících k pozitivní korelaci mezi sérovou hladinou OPG a BMD. Tento nárůst je přisuzován zvýšené sekreci OPG osteoblasty po léčbě bisfosfonáty [15]. Stejně tak zvyšuje hladinu sérového OPG podání raloxifenu u žen s nízkou BMD [16].

U pacientů s Pagetovou chorobou, která je charakterizována excesivní kostní resorpcí následovanou abnormální kostní novotvorbou, léčba bisfosfonáty pamidronátem a risedronátem vede k nárůstu sérové hladiny OPG, což opět může být následek zvýšené produkce OPG osteoblasty [17].

Zajímavé je, že u pacientů s revmatoidní artritidou byly nalezeny zvýšené hladiny OPG oproti zdravým kontrolám. Tento jev může být připisován kompenzatornímu zvýšení OPG spíše než jeho kauzální úloze v chorobném procesu [18]. Při analýze synoviální tkáně pacientů s revmatoidní artritidou bylo zjištěno zvýšení hladiny OPG po podání anti-TNF léčby, což podporuje ohranný vliv OPG. Více informací než měření izolované sérové hladiny OPG nám poskytuje sledování poměru OPG a RANKL [19].

RANKL

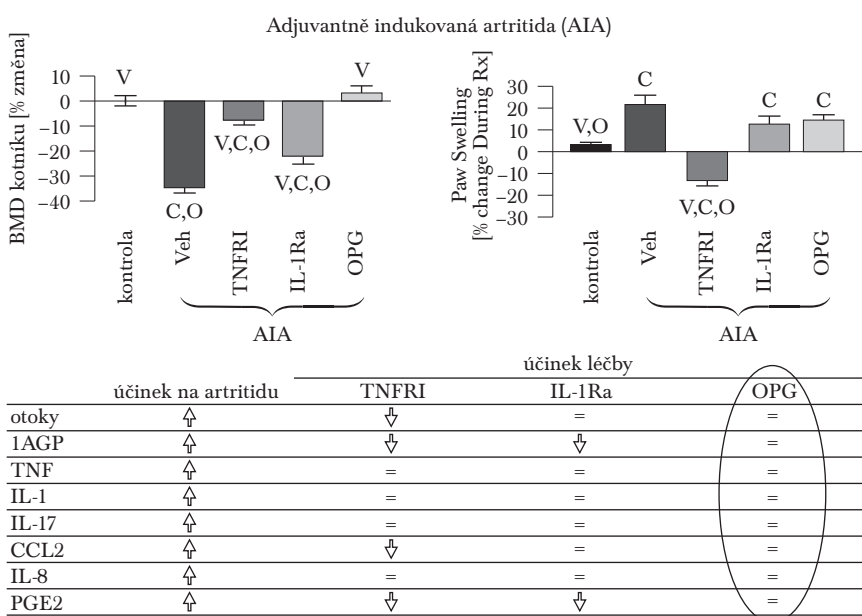
RANKL je také členem superrodiny TNF receptorů a ligandů. Po antigenním stimulu dochází v T lymfocytech k výrazné upregulaci RANKLu, zároveň bylo prokázáno, že RANKL zvyšuje schopnost dendritických buněk stimulovat proliferaci naivních T buněk. Lidský RANKL je syntetizován jako glykoprotein obsahující 317 aminokyselin. Vyskytuje se ve formě membránově vázané a solubilní. Ve vysoké hladině je exprimován ve skeletu a v primární i sekundární lymfatické tkáni, mRNA pro RANKL lze nalézt i v kožních keratinocytech, v epitelálních buňkách prsní žlázy, v srdci, v kosterním svalu, plicích, žaludku, placentě, štítné žláze a mozku. Membránově vázaný RANKL může být posttranslačně regulován některými desintegriny a metalloproteinázami. Na modelu murin karcinomu prostaty byla nalezena zvýšená exprese metalloproteinázy osteoklasty, která může změnit membránově vázaný RANKL na solubilní, a zvýšit tak aktivaci osteoklastů a vznik osteolytických lézí [21–31].

RANK

Objevení RANKu bylo opět nezávisle na sobě prezentováno několika výzkumnými týmy. Opět jde o člena superrodiny TNF receptorů a ligandů. Jde o signální receptor v procesu diferenciaci osteoklastů. RANK mRNA se vyskytuje v dendritických buňkách, v kostech, kosterním svalstvu, thymu, játrech, tenkém a tlustém střevě a v adrenálních žlázách. RANK je možno detekovat na povrchu dendritických buněk, CD4+ a CD8+ T lymfocytů, Langerhansových buněk, epitelálních buněk prsní žlázy v průběhu těhotenství [32–35].

OPG byl první identifikovanou molekulou v ose RANK-RANKL-OPG a byl klonován jako potenciální inhibitor osteoklastogeneze. Overexprese OPG u transgenických myší vedla ke vzniku osteopetrózy a naopak chybění OPG vedlo k časně osteoporóze. Osteoklastogenní faktor RANKL zvyšuje diferenciaci buněk kostní dřene v osteoklasty a zvyšuje aktivitu zralých osteoklastů v odbourávání kosti. Může být inhibován vazbou na OPG. Hlavní úloha RANKL-RANK interakce je pozitivní regulace osteoklastogeneze, vyvažovaná kompetitivní vazbou OPG na RANKL. Dá se shrnout, že všechny faktory mající pozitivní či negativní vliv na kostní osteoklastickou resorpci pozitivně či negativně ovlivňují RANKL a OPG mRNA. Funkce osy RANK-RANKL-OPG souvisí s rozvojem některých geneticky vzácných onemocnění skeletu, např. duplikace signálního peptidu RANK je spojena s výskytem Pagetovy choroby. Pacienti trpící expanzivní skeletální hyperfosfatázií, familiárním metabolickým kostním onemocněním vyznačujícím se hyperostózou dlouhých

Obr. 6
Inhibice RANKL nesnižuje lokální nebo systémové zánětlivé parametry artritidy u krys s artritidou



Upraveno dle: Stolina M, et al. EULAR 2009

kostí, zkrácenou dobou života, předčasnou ztrátou zubů a epizodickou hyperkalcemií je dána inzercí v exonu 1 pro RANK. Je popsáno větší množství mutací, které vedou k osteopatii, úbytku kostní hmoty, frakturám a kostním deformitám [36–46].

RANK je člen superrodiny TNF receptorů (TNFR), nemá žádnou kinázovou aktivitu, proto potřebuje další asociované faktory, které zprostředkují přenos signálu po navázání ligandu. Jsou to TNFR asociované faktory (TRAFs), které se váží na různé oblasti cytoplazmatické části TNF receptorů a zprostředkují ligandem indukovanou signalizaci. Jedním z TRAFs pro RANKL je TRAF 6, dalšími jsou 2,5. Tyto TRAFs zprostředkují aktivaci NF-kappaB a c-Jun NH2-terminální kinázy (JNK). Zdá se, že pro aktivaci NF-kappaB je esenciální interakce s TRAF6. TRAF6 je tedy hlavní molekulou nutnou pro komunikaci RANK a NF-kappaB cesty, která je nutná pro osteoklastogenezi [47–51].

RANKL-RANK signalizace zahrnuje aktivaci transkripce faktoru NF-kappaB. Proteiny NF-kappaB1 a NF-kappaB2 jsou syntetizovány jako dlouhé prekurzory, které jsou skladovány v cytoplazmě ve vazbě na IkappaB inhibiční proteiny. Tyto proteiny jsou rychle degradovány po aktivaci IkappaB kinázy (IKK). IKK komplex obsahuje dvě katalytické subjednotky IKK alpha a IKK beta a regulační podjednotku. Pro RANK signalizaci osteoklastogeneze je esenciální IKK beta [52].

Mitogen-activated protein kinázy (MAPK) patří do rodiny Ser/thr protein kináz. Některé z těchto kináz jsou zahrnuty do RANK aktivace. Některé z nich jsou opět nepostradatelné k aktivaci osteoklastogeneze [53–56].

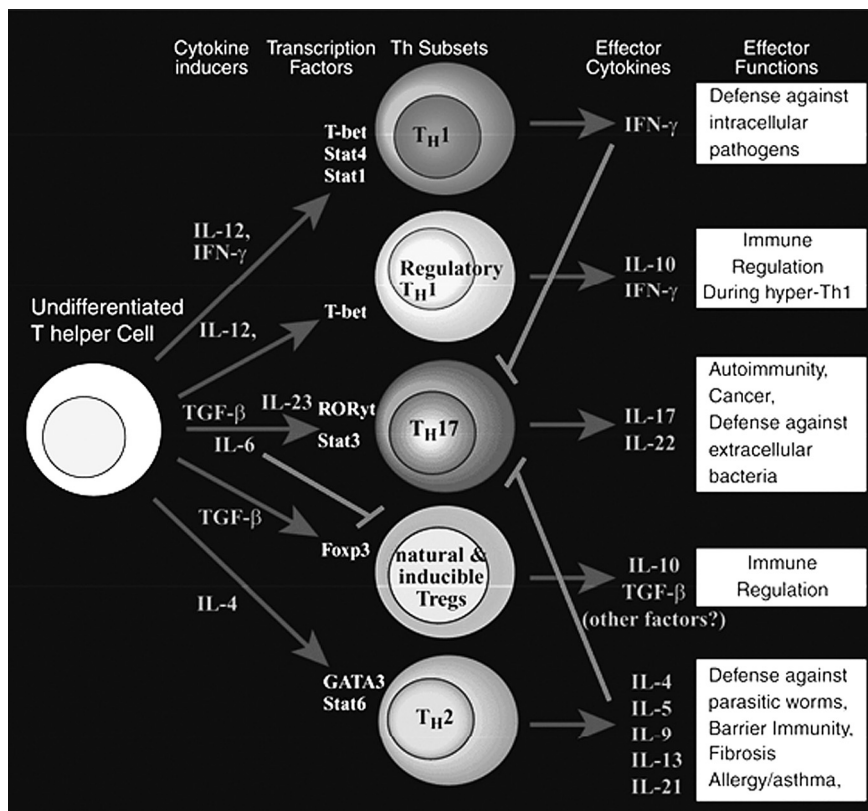
Před několika lety byl objeven transkripční faktor NFATc1 (nukleární faktor aktivovaných T buněk) jako faktor indukovaný RANKL, ale nikoli IL-1 v průběhu diferenciace osteoklastů. Exprese NFATc1 závisí na NF-kappaB a C-Fos cestě. Exprese NFATc1 vede k diferenciaci osteoklastů. NFAT rodina transkripčních faktorů vyžaduje pro svou aktivaci a nukleární translokaci CA2+/kalmodulin závislou Ser/Thr fosfatázu calcineurin [57–59].

RANKL uvolňuje Ca²⁺ z intracelulárních zásob cestou PLC (phosphoinositide-specific phospholipase C),

což vede k akceleraci translokace NF-kappaB do jádra a prodloužení přežívání osteoklastů.

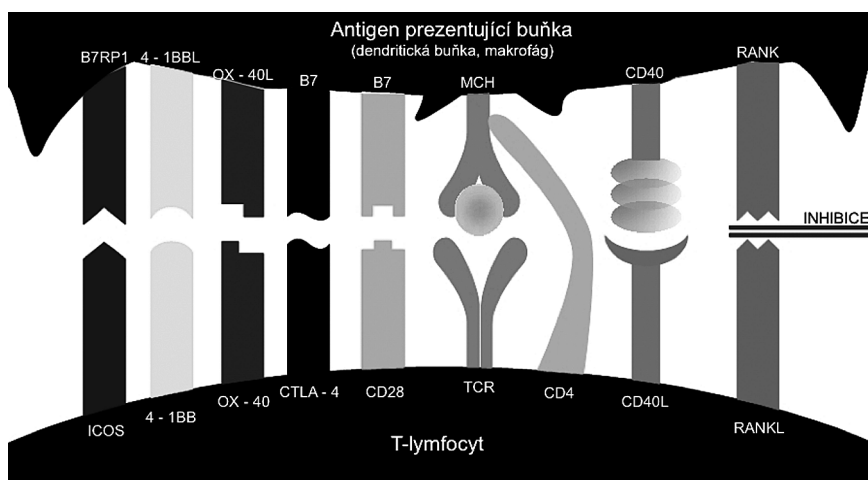
RANK stimulace a regulace kostního metabolismu souvisí a je závislá na kalciové signalizaci Calcineurin-NFATc1 a proteiny protein kinázy C(PKC) jsou také aktivovány kalcie a jsou nepostradatelné v regulaci kostní remodelace.

Obr. 7
Diferenciace T-lymfocytů a výkonné funkce



Fundamental Immunology, 6th Ed., et. W. E. Paul

Obr. 8
RANK-RANKL je jednou z mnoha molekul exprimovaných na lymfoidních buňkách



Upraveno dle: Fontenot AP, Kotzin BL. Textbook of Respiratory Medicine. Murray JF, et al. eds. W. B. Saunders Company. 2000. pp.413-444.

Osteoimunologie

RANKL je exprimován na aktivovaných T buňkách, ale T buňky zároveň secernují faktor, který negativně ovlivňuje RANK signalizaci. Mezi tyto faktory patří IFN-gamma, který akceleruje degradaci TRAF6 cestou ubiquitin-proteasomu, což vede k silné inhibici RANKL indukované NF-kappaB a JNK aktivace. RANKL také indukuje produkci IFN-beta v osteoklastických prekurzorových buňkách, IFN-beta je inhibítozem diferenciace osteoklastů cestou interference s RANKL indukovanou expresí c-Fos [60,61] (obrázek 3).

Estrogeny a androgeny suprimují diferenciaci osteoklastů indukovanou RANKL downregulací JNK-c-Jun a zároveň kontrolují produkci OPG. Podávání OPG snižuje počet osteoklastů a kostní ztrátu po ovariectomii u krys. Estrogeny také regulují délku přežití osteoklastů.

Také další cytokiny regulují osteoklastogenezi. IL4 ruší osteoklastogenezi, zatímco členové TGF rodiny umocňují RANKL indukovanou osteoklastogenezi. M-CSF je klíčový pro proliferaci a přežití osteoklastických prekurzorových buněk, stejně tak jako pro makrofágy. M-CSF zprostředkuje RANKL indukovanou přeměnu prekurzorových buněk do osteoklastické řady [62,63].

TNF alfa hojně se vyskytující v místech zánětlivých kostních erozí je velmi silným akcelerátorem osteoklastogeneze. Dokáže zvýšit expresi RANK na prekurzorových buňkách, z toho vyplývá synergie signalizace RANKL-RANK a TNF alpha-TNFR.

Shrňme tedy, že RANKL-RANK stimulace je nepostradatelná pro indukci osteoklastogeneze, ostatní signální dráhy mohou jen pozitivně či negativně tuto signalizaci ovlivnit.

Genotyp Rankl-/- a Rank-/- vede k fenotypu s kompletní absencí lymfatických uzlin 9–11. I další členové TNF rodiny mají vliv na vývoj a uspořádání sekundární lymfatické tkáně. Jejich nepřítomnost může vyvolat poruchu či chybění lymfatických uzlin, Peyerových plaků, dendritických buněk, změnu architektury sleziny. RANKL-RANK signalizace kontroluje formaci lymfatických uzlin u lidí. K rozvoji lymfatických uzlin je třeba několika odlišných buněčných typů, jako jsou fibroblasty, makrofágy, retikulární buňky a endoteliální buňky. Primordiální lymfatické uzliny jsou poté osídleny T a B buňkami a buňkami, které se vyvíjejí do NK buněk, antigen prezentujícími buňkami a folikulárními buňkami. RANKL a RANK exprimující buňky se vyskytují ve zralých lymfatických uzlinách, v jejich kortikální části. RANKL a RANK jsou dále exprimovány ve slezině a Peyerových plátech. RANKL se účastní regulace vývoje lymfatických uzlin kontrolou jejich buněčné kolonizace [64–72].

Dendritické buňky jsou specializované na vazbu a zpracování antigenu. Ve většině tkání se vyskytují v nezralé formě, neschopné stimulovat T buňky. Kontakt s antigenem vede k jejich maturaci jako odpověď na zánětlivý stimul. Zralé dendritické buňky s antigenem putují do T buněčných zón sekundárních lymfatických orgánů a prezentují antigen antigen-specifickým T buňkám. T buněčné oblasti sekundárních lymfatických orgánů představují mikroprostředí umožňující interakci mezi dendritickými buňkami, T buňkami a B buňkami iniciujícími adaptivní imunitní reakci. RANKL není exprimován na klidových CD 4+ nebo CD 8+ T buňkách, ale 4 hodiny po stimulaci anti -CD3/CD 28, je povr-

chový RANKL detekovatelný na CD4+ T buňkách s vrcholem za 48 hodin, který trvá až 96 hodin. Expres RANKL na CD8+ T buňkách podléhá obdobné kinetice po stimulaci, ale v množství nižším než na CD4+ T buňkách. Povrchová exprese RANK je přítomna na všech dendritických buňkách. Interakce mezi RANKL na aktivovaných T buňkách a RANK na dendritických buňkách má vliv na přežívání dendritických buněk. RANKL zvyšuje antigen-specifickou primární T buněčnou odpověď. RANKL může indukovat v dendritických buňkách tvorbu mnoha cytokinů, jako je IL-1, IL-6, IL-12, IL-15. Signalizace RANKL-RANK z T buněk na DC nemá vliv na expresi povrchových molekul MHC třídy II, CD 80, CD 86, CD 54. Zdá se, že RANKL má roli v odpovědi paměťových T buněk [73–76] (obrázek 4).

OPG je také možno identifikovat na povrchu DC buněk, kde váže molekulu z rodiny TNF TRAIL, která je produkována aktivovanými T buňkami a která je zodpovědná za apoptózu DC buněk. Zdá se, že rovnováha mezi RANKL a TRAIL, které jsou oba produkovány aktivovanými T buňkami, mají vliv na přežívání DC buněk a OPG může modifikovat tento stav. Zdá se, že RANKL, RANK, OPG mají vliv na některé funkce lymfocytů a DC buněk, nemají však nezastupitelnou roli pro funkci těchto buněk, která by nemohla být zastoupena jinými molekulami.

Expres RANKL a OPG je ovlivněna sexuálními hormony. Z toho mohou vyplývat rozdíly v imunitních reakcích obou pohlaví a autoimunitních onemocněních s preferencí jednoho pohlaví, jako je revmatoidní artritida u žen [77,78].

Poslední studie prokázaly vliv RANKL-RANK na rozvoj AIRE+ epiteliálních buněk thymu. AIRE (autoimunitní regulátor), transkripční faktor. Mutace AIRE vede k rozvoji multiorgánové autoimunitní reakce. RANK signalizace má tedy jednu z klíčových úloh v regulaci centrální tolerance [79,80].

Expres RANKL v kůži má vliv na počet regulatorních T buněk (Tregs). Tregs udržují imunologickou autotoleranci a tlumí excesivní reakci vůči vlastním antigenům u autoimunitních reakcí nebo alergií. Kůže je zdrojem vitamínu D3, což je klíčový spouštěč exprese RANKL v průběhu osteoklastogeneze. RANKL je exprimován i v kožních keratinocytech, kde jeho množství výrazně narůstá po UV ozáření. UV záření prostřednictvím upregulace RANKL v keratinocytech vede k aktivaci exprese RANK lymfatickými buňkami cestou RANKL-RANK interakce. RANKL aktivuje lymfatické buňky, preferenčně Tregs, což vede k supresi imunitní reakce v kůži i jiných tkáních [81–83].

Kostní remodelace a ztráta kosti jsou kontrolovány osou RANKL-RANK-OPG. RANKL je také produkován T buňkami po antigenním stimulu. Tyto T buňky se mohou podílet také na vývoji a aktivaci osteoklastů. V buněčné kultuře prekurzorových hematopoetických buněk kostní dřeně bylo zjištěno, že aktivované CD4+ T buňky mohou indukovat osteoklastogenezi, která může být blokována přidáním OPG, a není závislá na cytokinech produkováných T buňkami, jako jsou IL-1 a TNF alpha, které také mohou zvyšovat RANKL. Imunitní buňky se tedy účastní kostního metabolismu jak ve zdraví, tak v přítomnosti zánětlivých nebo autoimunitních onemocnění, jako je revmatoidní artritida [84].

Revmatoidní artritida (RA) je chronické autoimunitní onemocnění, které postihuje 1–2 % populace. Jde o chro-

nický zánět synoviálních kloubů, progresivní destrukce chrupavky a kosti, pro pacienta představuje trvalé kruté bolesti, toto onemocnění vede k invalidizaci, zhoršení kvality života a zkrácení jeho délky [85–88]. Zdá se, že RANKL hraje klíčovou úlohu při vzniku erozí u pacientů s RA. T buňky v prostředí kloubního zánětu produkují velké množství prozánětlivých cytokinů, přesto inhibice RANKL cestou OPG nemá žádný vliv na tíži zánětlivé reakce. OPG pouze brání kostní ztrátě kortikální i trámčité a vzniku erozí v postižených kloubech. Velmi důležitým momentem je destrukce chrupavčitých struktur, která vede ke kolapsu chrupavky. Není zcela jasné, zdali destrukce chrupavky probíhá nezávisle na kostní ztrátě, anebo jestli je destrukce subchondrální kosti nepřímou podmíněna zničením chrupavky. OPG může chrupavku před erozí ochránit. RANKL-RANK jsou exprimovány na chondrocytech a přímo se účastní růstu a homeostázy chrupavky. Inhibice RANKL OPG může předejít destrukci chrupavky, kritickému a nevratnému momentu v patogenezi artritidy. Expresí RANKL je přítomna u zánětlivých buněk izolovaných ze synoviální tekutiny pacientů s RA a JIA, také pacientů s artrózou, zatímco OPG nebyl přítomen. Expresí RANKLu je také zvýšena u synoviálních fibroblastů ze zánětem postižených kloubů, které tak mohou indukovat osteoklastogenezi. RANKL signalizace z T buněk a synoviocytů je hlavním mediátorem destrukce kosti u artritidy lidí. Inhibice RANKL u pacientů s revmatoidní artritidou nemá žádný efekt na samotný zánětlivý děj, ale brání kostní ztrátě a vzniku erozí. Tato zjištění zároveň vysvětlují kostní ztrátu u mnoha dalších onemocnění s chronickou aktivací imunitního systému, jako je leukemie, chronické infekce včetně hepatitidy C, HIV, autoimunitní choroby, jako je diabetes mellitus, lupus erytematosus, alergie, astma, kostní metastázy. Kostní postižení může samo o sobě způsobit ireverzibilní změny, invaliditu, výrazné snížení kvality života a obrovské ekonomické náklady pro celou společnost. Inhibicí RANKL nelze u všech těchto onemocnění zasáhnout do progresu samotného onemocnění, ale výrazně zlepšit kvalitu života nemocných. Logicky přichází otázka: proč T buňky v našem těle, které jsou neustále aktivovány různými antigeny, nepůsobí kostní ztrátu? Mechanismem, který může působit proti RANKL mediované resorpci indukované aktivovanými T lymfocyty, je upregulace interferonu gamma v určitých subsetech T buněk. INF gamma blokuje RANKL indukovanou osteoklastogenezi cestou degradace TRAF 6. Dále T buňky uvolňují IL 12, který synergicky s IL 18 inhibuje formaci osteoklastů, dalším cytokinem s obdobným účinkem na osteoklastogenezi je IL-4. Určitá podskupina CD4+ T pomahačských buněk, konkrétně Th 17, které produkují IL-17, jsou zodpovědné za mnoho autoimunitních zánětlivých reakcí. IL-17 je potentní induktor exprese RANKL a vyskytuje se v synoviální tekutině pacientů s RA. Th17 jsou klíčovými mediátory kostní destrukce u pacientů s RA. Tyto buňky stimulují lokální zánět cestou IL-17, exprese RANKL a indukci exprese RANKL na osteoblastech a synoviálních fibroblastech, celkově tedy podporují vznik kostních erozí. Tento efekt Th17 je vyrovnáván působením Th1 a Th2 buněk, prostřednictvím jimi produkovaných INF gamma a IL4. Tzn., že snaha ovlivnit Th17, může být důležitý krok v prevenci vzniku kostních erozí asociovaných

s kostní destrukcí aktivovanou T buňkami u R [89–102] (obrázek 5, 6).

Objevení RANKL, jeho receptoru RANK, kompetitivního receptoru OPG jako klíčových regulátorů vývoje osteoklastů, jejich aktivace a zrání dalo příležitost k vývoji nových účinných léků. RANKL je produkován aktivovanými T buňkami, které tak mohou přímo indukovat osteoklastogenezi. Z těchto zjištění také vyplynulo částečné pochopení kostní ztráty asociované s onemocněními zahrnujícími imunitní systém. RANKL-RANK kontroluje vývoj prsní žlázy v těhotenství, formaci lymfatických uzlin, buněk thymu. Dále může být RANKL chybějícím článkem mezi slunečním světlem a Treg působenou imunosupresí. Inhibice RANKL se jeví být důležitým momentem v prevenci vzniku kostních a chrupavkových defektů u osteoporózy a artritidy (obrázek 7, 8).

Denosumab – inhibitor RANKL

Teprve krátkou dobu máme možnost používat v léčbě osteoporózy nový preparát, který cíleně zasahuje do procesu kostní remodelace, a to ve smyslu útlumu resorpce kosti. Jeho použití je tedy neefektivnější v případě vystupňované resorpce kosti, která není následována adekvátně zvýšenou novotvorbou. Je to zejména případ postmenopauzální osteoporózy a případ mužů léčených androgen deprivační terapií pro nemetastázující karcinom prostaty, která u těchto mužů vyvolává prudký nárůst kostní resorpce, vedoucí k rychlé a výrazné ztrátě kostní hmoty, vedoucí k nárůstu rizika zlomenin. Nový preparát denosumab je plně humánní monoklonální IgG2 protilátka proti RANKLu. Tento lék je prvním reprezentantem biologického léku v oblasti léčby osteoporózy, neboť je to protilátka proti členu superrodiny TNF alfa ligandů a receptorů. Po navázání denosumabu na RANKL v metabolicky aktivních oblastech kostních povrchů dochází k inhibici diferenciaci a aktivace osteoklastů, tedy k inhibici osteoresorpce, což má za následek snížení abnormálně zvýšené resorpce, snížení úbytku kostní hmoty a s ním spojeného nárůstu rizika nových zlomenin.

Účinek denosumabu byl prokázán v mnoha klinických studiích. Nejprve byl denosumab jednorázově aplikován 49 postmenopauzálním zdravým ženám. Toto podání vedlo k rychlému a hlubokému, na dávce závislému poklesu kostní resorpce. Tento efekt přetrvával téměř 6 měsíců. Pokles novotvorby nastal přibližně po měsíci od podání léku.

V další klinické studii byl denosumab podáván 412 postmenopauzálním ženám se sníženou hodnotou denzity kostního minerálu (T-skóre bederní páteře -1,8 až -4,0 SD, T-skóre total hip -1,8 až -3,5 SD). Tato studie byla randomizovaná, multicentrická, placebem kontrolovaná, s větví srovnání oproti aktivnímu komparátoru. Randomizace proběhla do několika dávkovacích režimů: jedenkrát za 3 měsíce byla podávána dávka 6 mg, 14 mg + mg; a 30 mg; jedenkrát za 6 měsíců byla podána dávka 14 mg, 60 mg, 100 mg, 210 mg. Aktivním komparátorem v jedné větvi byl alendronát podávaný jedenkrát týdně perorálně v dávce 70 mg. Po roce léčby došlo u žen léčených denosumabem k nárůstu hodnot BMD (denzita kostního minerálu, bone mineral density) v oblasti bederní páteře o 3,0–6,7 %, v oblasti proximálního femuru o 1,9–3,6 %. U žen v alendronátové větvi došlo k nárůstu hodnot BMD v oblasti bederní

páteře o 4,6 %, v oblasti proximálního femuru o 2,1 %. V placebové větvi došlo k poklesu hodnot BMD ve všech měřených lokalitách. Markery kostní resorpce klesly na minimum po 3 dnech od aplikace denosumabu a přetrvání tohoto účinku bylo na dávce závislé. I po extenzi této studie na 24 měsíců byly shledány obdobné výsledky. V dalším prodloužení této studie došlo k přerušení a znovuzavedení léčby denosumabem u stejně definované skupiny postmenopauzálních žen. Ženy, které byly v předchozím průběhu studie léčené denosumabem, v dvouleté extenzi dostaly subkutánně podaný denosumab v dávce 60 mg jedenkrát za 6 měsíců, nebo jim byla léčba na 12 měsíců přerušena a následně na 12 měsíců znovuzavedena, nebo jim již léčba denosumabem nebyla podána. V nárůstu BMD profitovaly nejvíce ženy na kontinuální čtyřleté léčbě denosumabem, kdy nárůst BMD v oblasti bederní páteře byl 9,4–11,8 %, v oblasti proximálního femuru 4,0–6,1 %. U pacientek, u kterých byla léčba definitivně ukončena, došlo k poklesu hodnot BMD v oblasti bederní páteře o 6,6 %, v oblasti proximálního femuru o 5,3 %, a to již v průběhu prvních 12 měsíců od přerušení léčby. Znovuzahájení léčby pak vedlo k opětovnému nárůstu hodnot BMD oproti vstupním hodnotám. Markery kostní resorpce při přerušení léčby jeví tendenci k návratu k původním vstupním hodnotám, při opětovném zahájení léčby došlo opět k jejich supresi [103–107].

Hlavní zlomeninovou studií, která byla provedena s denosumabem, byla studie FREEDOM (Fracture REduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis every 6 Moths). Další studií byla studie STAND (Study of Transitioning from Alendronate to Denosumab). V průběhu obou těchto studií byly provedeny kostní biopsie z lopaty kosti kyčelní. Ve studii FREEDOM byly vzorky odebrány po dvou nebo třech letech trvání léčby, ve studii STAND po 12 měsících léčby. Histomorfometrickou analýzou odebraných vzorků byla prokázána zcela normální mikroarchitektura trabekulární i kortikální kosti u pacientek léčených denosumabem. Byl prokázán signifikantní pokles resorpce i formace kosti oproti placebové větvi i oproti skupině léčené alendronátem [108,109].

Závěr

Vývoj humánní monoklonální protilátky proti RANKLu, denosumabu, představuje nový, vysoce účinný přístup v prevenci fragilních osteoporotických fraktur, skeletálních komplikací malignit a kostních erozí u revmatoidní artritidy. RANKL je krom osteoblastů hojně produkován aktivovanými T buňkami a synoviocyty u RA, zatímco receptor RANK je také exprimován monocyty/makrofágy a dendritickými buňkami. V preklinických a klinických studiích s pacienty s RA, kteří mají určitý stupeň imunoprese, RANKL inhibitory nemají signifikantní vliv na zánětlivý proces. V klinických studiích byla četnost infekcí, zhubných onemocnění a úmrtí obdobná pro skupinu léčenou denosumabem a skupinu placebovou. Blokáda RANKL/RANK signalizace nevede k imunitní dysfunkci. Inhibice RANKLu nemá vliv na průběh zánětlivé reakce mediované T buňkami u RA.

Literatura

1. Kanis JA, Burles N, Cooper C et al. European Guyance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2008; 19(4): 399–428.

2. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337–341.
3. Hofbauer LC, Schoppert M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004;292:490–495.
4. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclasts differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3540–3545.
5. Reid P, Holen I. Pathophysiological role of osteoprotegerin (OPG). *European Journal of Cell Biology* 2009;88:1–17.
6. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309–319.
7. Tsuda E, Goto M, Mochizuki S et al. Isolation of novel cytosine from human fibroblasts that specifically inhibit osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:137–143.
8. Viereck V, Grundker C, Blaschke S et al. Raloxifene concurrently stimulates osteoprotegerin and inhibits interleukin 6 production by human trabecular osteoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4206–4213.
9. Viereck V, Emons G, Lauck V et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:680–686.
10. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoids-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999;140:4382–4389.
11. Takayanagi H, Iizuka H, Juji T et al. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synovial cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:259–269.
12. Schett G, Middleton S, Bolon B et al. Additive bone protective effect of anabolic treatment when used in conjunction with RANKL and tumor necrosis factor inhibition in two rat arthritis models. *Arthritis Rheum* 2005;52:1604–1611.
13. Whyte MP. Paget's disease of bone and genetic disorders of RANKL/OPG/RANK/NF-kappaB signaling. *Ann NY Acad Sci* 2006;1068:143–164.
14. Mezquita-Raya P, de la Higuera M, Garcia DF et al. The contribution of serum osteoprotegerin to bone mass and vertebral fractures in postmenopausal women. *Osteoporosis Int* 2005;16:1368–1374.
15. Dobnig H, Hofbauer LC, Viereck V et al. Changes in the RANK ligand/osteoprotegerin system are correlated to changes in bone mineral density in bisphosphonate-treated osteoporotic patients. *Osteoporosis Int* 2006;17:693–703.
16. Messalli EM, Mainini G, Scaffa C et al. Raloxifene therapy interacts with serum osteoprotegerin in postmenopausal women. *Maturitas* 2007;56:38–44.
17. Martini G, Gennari L, Merlotti D et al. Serum OPG and RANKL levels before and after intravenous bisphosphonate treatment in Paget's disease of bone. *Bone* 2007; 40:457–463.
18. Feuerherm AJ, Borset M, Seidel C et al. Elevated levels of osteoprotegerin (OPG) and hepatocyte growth factor (HGF) in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2001;30:229–234.
19. Geusens PP, Landewe RB, Garnero P et al. The ratio of circulating osteoprotegerin to RANKL in early rheumatoid arthritis predicts later joint destruction. *Arthritis Rheum* 2006;54:1772–1777.
20. Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: Regulators of Immune Responses and Bone Physiology. *Ann NY Acad Sci* 2008;1143:123–150.
21. Anderson DM et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;390:175–179.
22. Wong BR et al. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 1997;272: 25190–25194.
23. Lacey DL et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165–176.
24. Yasuda H et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3597–3602.
25. Wong BR et al. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 1997;186:2075–2080.
26. Kartsogiannis V et al. Localization of RANKL (receptor activator of NF-kappaB ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone* 1999;25: 525–534.
27. Fata JE et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000;103:41–50.
28. Loser K et al. Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nat Med* 2006;12:1372–1379.
29. Schlondorff J, Lum L, Blobel CP. Biochemical and pharmacological criteria define two shedding activities for TRANCE/OPGL that are distinct from the tumor necrosis factor alpha convertase. *J Biol Chem* 2001;276:14665–14674.
30. Chesneau V et al. Catalytic properties of ADAM19. *J Biol Chem* 2003;278: 22331–22340.
31. Lynch CC et al. MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Can Cell* 2005;7:485–496.
32. Fata JE et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000;103:41–50.
33. Nakagawa N et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *BBRC* 1998;253:395–400.
34. Williamson E, Bilsborough JM, Viney JL. Regulation of mucosal dendritic cell function by receptor activator of NF-kappaB (RANK)/RANK ligand interactions: impact on tolerance induction. *J Immunol* 2002;169:3606–3612.
35. Gonzalez-Suarez E et al. RANK overexpression in transgenic mice with mouse mammary tumor virus promoter-controlled RANK increases proliferation and impairs alveolar differentiation in the mammary epithelia and disrupts lumen formation in cultured epithelial acini. *Mol Cell Biol* 2007;27:1442–1454.

36. Simonet WS et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309–319.
37. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* 2002;20:795–823.
38. Kong YY et al. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397:315–323.
39. Li J et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1566–1571.
40. Bucay N et al. 1998. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12:1260–1268.
41. Mizuno A et al. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/ osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:610–615.
42. Hughes AE et al. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat Genet* 2000;24:45–48.
43. Whyte MP et al. Expansile skeletal hyperphosphatasia: a new familial metabolic bone disease. *J Bone Miner Res* 2000;15:2330–2344.
44. Whyte MP, Hughes AE. Expansile skeletal hyperphosphatasia is caused by a 15-base pair tandem duplication in TNFRSF11A encoding RANK and is allelic to familial expansile osteolysis. *J Bone Miner Res* 2002;17:26–29.
45. Cundy T et al. A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype. *Hum Mol Genet* 2002;11:2119–2127.
46. Chong B et al. Idiopathic hyperphosphatasia and TNFRSF11B mutations: relationships between phenotype and genotype. *J Bone Miner Res* 2003;18:2095–2104.
47. Darnay BG et al. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1998;273:20551–20555.
48. Wong BR et al. The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem* 1998;273:28355–28359.
49. Wong BR, Josien R, Choi Y. TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J Leukoc Biol* 1999;65:715–724.
50. Galibert L et al. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem* 1998;273:34120–34127.
51. Lee ZH et al. Activation of c-Jun N-terminal kinase and activator protein 1 by receptor activator of nuclear factor kappaB. *Mol Pharmacol* 2000;58:1536–1545.
52. Ruocco MG et al. I{kappa}B kinase (IKK){beta}, but not IKK{alpha}, is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation-induced bone loss. *J Exp Med* 2005;201:1677–1687.
53. David JP et al. JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Sci* 2002;115:4317–4325.
54. Wagner EF. Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis* 2002;61(Suppl 2):ii40–ii42.
55. Yamamoto A et al. Possible involvement of IkappaB kinase 2 and MKK7 in osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand. *J Bone Miner Res* 2002;17:612–621.
56. Kenner L et al. Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects. *J Cell Biol* 2004;164:613–623.
57. Takayanagi H et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 2002;3:889–901.
58. Takayanagi H. Osteoimmunology: Sharp mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 2007;7:292–304.
59. Mao D et al. PLCgamma2 regulates osteoclastogenesis via its interaction with ITAM proteins and GAB2. *J Clin Invest* 2006;116:2869–2879.
60. Takayanagi H et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 2000;408:600–605.
61. Takayanagi H et al. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature* 2002;416:744–749.
62. Abu-Amer Y. IL-4 abrogates osteoclastogenesis through STAT6-dependent inhibition of NFkappaB. *J Clin Invest* 2001;107:1375–1385.
63. Koseki T et al. Role of TGF-beta family in osteoclastogenesis induced by RANKL. *Cell Signal* 2002;14:31–36.
64. Dougall WC et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999;13:2412–2424.
65. Kong YY et al. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397:315–323.
66. Li J et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1566–1571.
67. Koni PA et al. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity* 1997;6:491–500.
68. Alimzhanov MB et al. Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9302–9307.
69. Sobacchi C et al. Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. *Nat Genet* 2007;39:960–962.
70. Fu YX, Chaplin DD. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol* 1999;17:399–433.
71. Mebius RE. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol* 2003;3:292–303.
72. Kim D et al. Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *J Exp Med* 2000;192:1467–1478.
73. Lacey DL et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165–176.
74. Yasuda H et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/ osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3597–3602.
75. Josien R et al. TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2000;191:495–502.
76. Bachmann MF et al. 1999. TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *J Exp Med* 1999;189:1025–1031.
77. Fata JE et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000;103:41–50.
78. Hofbauer LC et al. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999;140:4367–4370.
79. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:139–176.
80. Kyewski B, Klein L. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 2006;24:571–606.
81. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6:345–352.
82. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:685–711.
83. Loser K et al. Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nat Med* 2006;12:1372–1379.
84. Kong YY et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402:304–309.
85. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996;85:307–310.
86. Panayi GS, Lanchbury JS, Kingsley GH. The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992;35:729–735.
87. Campagnuolo G, Bolon B, Feige U. Kinetics of bone protection by recombinant osteoprotegerin therapy in Lewis rats with adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:1926–1936.
88. Bolon B, Campagnuolo G, Feige U. Duration of bone protection by a single osteoprotegerin injection in rats with adjuvant-induced arthritis. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1569–1576.
89. Keffer J et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991;10:4025–4031.
90. Mori H et al. RANK ligand, RANK, and OPG expression in type II collagen-induced arthritis mouse. *Histochem Cell Biol* 2002;117:283–292.
91. Redlich K et al. Tumor necrosis factor alfa-mediated joint destruction is inhibited by targeting osteoclasts with osteoprotegerin. *Arthritis Rheum* 2002;46:785–792.
92. Romas E et al. Osteoprotegerin reduces osteoclast numbers and prevents bone erosion in collagen-induced arthritis. *Am J Pathol* 2002;161:1419–1427.
93. Nakashima T, Wada T, Penninger JM. RANKL and RANK as novel therapeutic targets for arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:280–287.
94. Takayanagi H et al. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synovial cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:259–269.
95. Oliveri MB et al. Vertebral compression fractures at the onset of acute lymphoblastic leukemia in a child. *Henry Ford Hosp Med J* 1991;39:45–48.
96. Stellan AJ et al. Bone loss in autoimmune chronic active hepatitis on maintenance corticosteroid therapy. *Gastroenterology* 1985;89:1078–1083.
97. Ebeling PR et al. Bone mineral density and bone turnover in asthmatics treated with long-term inhaled or oral glucocorticoids. *J Bone Miner Res* 1998;13:1283–1289.
98. Mahamed DA et al. G(-) anaerobes-reactive CD4+ T-cells trigger RANKL-mediated enhanced alveolar bone loss in diabetic NOD mice. *Diabetes* 2005;54:1477–1486.
99. Sato K et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006;203:2673–2682.
100. Harrington LE et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the Thelper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123–1132.
101. Park H et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1133–1141.
102. Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol* 2006;6:329–333.
103. McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB et al. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2006;354:821–831.
104. Miller PD, Bolognese MA, Lewiecki EM et al. Effect of Denosumab on bone density and turnover in postmenopausal women with low bone mass after long term continued, discontinued, and restarting of therapy: a randomized, blinded phase 2 clinical trial. *Bone* 2008;43:222–229.
105. Bone HG, Bolognese MA, Yuen CK et al. Effect of Denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:2149–2157.
106. Brown JP, Prince RL, Deal C et al. Comparison of the effect of Denosumab and Alendronate on BMD and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: a randomized blinded, phase 3 trial. *J Bone Miner Res* 2009;24:153–161.
107. Lewiecki EM, Miller PD, McClung MR et al. AMG 162 Bone Loss Study Group. Two year treatment with Denosumab (AMG 162) in randomised phase 2 study of postmenopausal women with low BMD. *J Bone Miner Res* 2007;22:1832–1841.
108. Kendler DL, Roux C, Benhamou CL et al. Effect of Denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women transitioning from alendronate therapy. *J Bone Miner Res* 2010;25:72–81.
109. Reid IR, Miller PD, Brown JP et al. Effect of Denosumab on bone histomorphometry: the FREEDOM and STAND studies. *J Bone Miner Res* 2010;25:2256–2265.