

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15757

研究課題名(和文) 内分泌攪乱物質ダイオキシン受容体AhRによる骨代謝調節機構解明への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to analyze the regulatory mechanism of bone metabolism by dioxin receptor AhR

研究代表者

井澤 俊 (IZAWA, Takashi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・助教

研究者番号：30380017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞におけるAhRの発現調節やAhRによる破骨細胞形成の詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い。本研究では、AhRの発現はマクロファージから破骨細胞分化における転写因子c-Fosの発現上昇と同じ比較的早い分化ステージで上昇し、骨恒常性を制御する因子となることが明らかとなった。さらに、AhRによる破骨細胞分化にはRANKLシグナルを介したc-Fosの転写活性、ミトコンドリア生合成にはPPAR- $\alpha$ のコアクチベーターであるPGC-1 $\beta$ を介した2つの独立した下流のシグナル伝達経路が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The mechanism underlying the regulation of AhR expression in osteoclasts and the signaling pathway through which AhR controls osteoclastogenesis remain unclear. We found that the expression of AhR in bone marrow-derived osteoclasts was upregulated by RANKL at an earlier stage. Osteoclast differentiation mediated by the AhR signaling pathway was also regulated in a RANKL/c-Fos-dependent manner. AhR controls osteoclast differentiation via c-Fos/NFATc1 and mitochondrial biogenesis through PGC-1 $\beta$ .

研究分野：歯学

キーワード：歯学 歯科矯正学 骨代謝学 免疫学

#### 1. 研究開始当初の背景

ダイオキシン受容体として知られる転写因子 AhR (aryl hydrocarbon receptor) は、様々な組織に発現がみられ、最近になって一部の免疫細胞にも高発現していることが明らかになってきている。これまで AhR が Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) シグナルを介した破骨細胞形成においても重要であることが報告されているものの、破骨細胞における AhR の発現調節や AhR による破骨細胞形成の詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い。

#### 2. 研究の目的

本研究は AhR 欠損マウスの血球系由来であるマクロファージおよび破骨細胞の機能を詳細に解析し、破骨細胞活性化因子として知られている RANKL シグナルと AhR シグナルのシグナルクロストークの解明によるマクロファージから破骨細胞への分化や活性化・維持機構を明らかにする。さらに、骨折などの病的状況下での AhR の影響解明および新たな骨系統疾患の診断や治療法の開発を目的とする。

#### 3. 研究の方法

- (1) 実験動物：AhR ノックアウトマウス (AhR KO) および対照マウス (WT) を用いた。
- (2) マイクロ CT 解析：AhR KO マウスおよび WT の大腿骨を分離しマイクロ CT にてマウス間で顎関節を含む全身の関節および骨格の骨密度を詳細に解析し、生体内、特に骨代謝における AhR システムの意義を探索。
- (3) 病理組織学的解析：AhR KO マウスの大腿骨部を摘出・脱灰後、H&E 染色、TRAP 染色、サフラニン・トルイジンブルーによる染色を行い骨組織の形態解析を実施する。また各種免疫染色により骨折や RA に関与する分子の同定を実施する。
- (4) マウス破骨細胞誘導：マウス大腿骨骨髓腔から骨髓細胞を採取し、洗浄後、10%FBS 含有  $\alpha$ -MEM にて  $5 \times 10^5$ /ml の細胞濃度となるよう調節し、100 mm dish に播種した。マウスリコンビナント M-CSF を添加した培地にて、7 日間培養し、破骨細胞へと分化誘導した。
- (5) マウス破骨前駆細胞誘導：破骨細胞誘導と同様に、マウス骨髓細胞を採取し、M-CSF 添加培地にて 3 日間培養後、さらに M-CSF および RANKL 添加培地にて 3-4 日間培養し、破骨前駆細胞へと分化誘導した。
- (6) 上記のプロトコールにより得られた試料をもとに、骨吸収活性測定 (Pit assay)、RT-PCR 分析、蛍光免疫染色を実施した。

#### 4. 研究成果

(1) AhR KO マウス大腿骨部のマイクロ CT 像：8 週齢および 16 週齢の AhR KO マウスでは同週齢の対照マウスと比較して、大腿骨部での海綿骨密度や皮質骨厚が亢進し、骨硬化様の

所見が認められた。また、骨密度、骨梁幅、骨梁数が有意に増加し、骨梁間隔が有意に減少した。また関節表面の粗造化がみられた。(2) AhR KO マウス大腿骨の破骨細胞活性亢進：AhR KO マウス大腿骨部の TRAP 陽性破骨細胞数をカウントした結果、WT マウスと比較して著しい TRAP 活性亢進がみられ骨粗鬆症様の所見が確認された。

(3) 本研究では、AhR の発現はマクロファージから破骨細胞分化における転写因子 c-Fos の発現上昇と同じ比較的早い分化ステージで上昇し、骨恒常性を制御する因子となることが明らかとなった。さらに、AhR による破骨細胞分化には RANKL シグナルを介した c-Fos の転写活性、ミトコンドリア生合成には PPAR- $\gamma$  のコアクチベーターである PGC-1 を介した 2 つの独立した下流のシグナル伝達経路が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(4) また、近年の疫学的研究により、タバコ煙中には AhR を活性化しうる有害物質 BaP (benzo [a] pyrene) が極めて高レベル含まれており、喫煙によって生体内の AhR は活性化され、炎症関連の病態である骨粗鬆症や関節リウマチとの関連が示唆される。そこで in vitro においてマウス骨髓より培養した前破骨細胞に BaP による刺激を行ったところ AhR/c-Fos シグナル伝達経路が破骨細胞分化調節に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、AhR 欠損マウスでは、骨折の病的状況下において仮骨部への破骨細胞の集積が少なく、その結果、仮骨部のリモデリング不全により骨折治癒が遅延することを見出した。以上のことから、RANKL/AhR/c-Fos シグナル経路が破骨細胞分化において重要な役割を果たし、骨代謝疾患における治療標的となることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

1. Mori H, Matsumoto K, Kawai N, Izawa T, Horiuchi S, Tanaka E. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 査読有, Vol. 151, 2017, 793-803. doi:10.1016/j.ajodo.2016.03.034.
2. Mino A, Izawa T, Shinohara T, Mori H, Yasue A, Tomita S, Tanaka E. Roles of hypoxia inducible factor-1 in the temporomandibular joint. *Arch Oral Biol* 査読有, Vol. 73, 2017, 274-281. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.10.028.
3. Izawa T, Arakaki R, Mori H, Tsunematsu T, Kudo Y, Tanaka E, Ishimaru N. The nuclear receptor AhR controls bone homeostasis by regulating osteoclast differentiation via the RANK/c-Fos signaling axis. *J Immunol* 査読有, Vol. 197, 2016, 4639-4650. doi:

- 10.4049/jimmunol.1600822.
4. **Izawa T**, Mori H, Shinohara T, Mino-Oka A, Hutami IR, **Iwasa A**, **Tanaka E**. Rebamipide attenuates mandibular condylar degeneration in a murine model of TMJ-OA by mediating a chondroprotective effect and by downregulating RANKL-mediated osteoclastogenesis. *PLoS One* 査読有, Vol. 11, 2016, e0154107. doi: 10.1371/journal.pone.0154107.
  5. Shinohara T, **Izawa T**, Mino A, Mori H, **Iwasa A**, Inubushi T, Yamaguchi Y, **Tanaka E**. Hyaluronan metabolism in overloaded temporomandibular joint. *J Oral Rehabil* 査読有, Vol.43,2016,921-928. doi: 10.1111/joor.12443.
  6. Nakayama Y, Matsui S, Noda K, Yamazaki M, Iwai Y, Matsumura H, **Izawa T**, **Tanaka E**, Ganss B, Ogata Y. Amelotin gene expression is temporarily being upregulated at the initiation of apoptosis induced by TGFb1 in mouse gingival epithelial cells. *Apoptosis* 査読有, Vol.21, 2016, 1057-1070. doi: 10.1007/s10495-016-1279-5.
  7. Mansjur KQ, Kuroda S, **Izawa T**, Maeda Y, Sato M, Watanabe K, Horiuchi S, **Tanaka E**. The Effectiveness of Human Parathyroid Hormone and Low-Intensity Pulsed Ultrasound on the Fracture Healing in Osteoporotic Bones. *Annals of Biomedical Engineering* 査読有, Vol 44, 2016,2480-2488. doi:10.1007/s10439-015-1533-y
  8. **Izawa T**, Rohatgi N, Fukunaga T, Wang QT, Silva MJ, Gardner MJ, McDaniel ML, Abumrad NA, Semenkovich CF, Teitelbaum SL, Zou W. ASXL2 Regulates Glucose, Lipid, and Skeletal Homeostasis. *Cell Reports* 査読有, Vol.11, 2015, 1625-1637. doi: 10.1016/j.celrep.2015.05.019.
  9. Mori H, **Izawa T**, **Tanaka E**. Smad3 deficiency leads to mandibular condyle degradation via the sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P3 signaling axis. *The American Journal of Pathology* 査読有, Vol.185, 2015, 2742-2756. doi:10.1016/j.ajpath.2015.06.015.
- [学会発表](計18件)
1. Hutami IR, **Izawa T**, Mori H, Shinohara T, Mino-Oka A, **Iwasa A**, **Tanaka E**. Fas/S1P1 signaling controls temporomandibular joint subchondral bone remodeling in autoimmune-arthritis. 95<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, Mar 25, 2017, San Francisco, CA, USA (Moscone Convention Center).
  2. Mori H, **Izawa T**, Shinohara T, Mino-Oka A, Sato M, Hichijo N, **Iwasa A**, Hutami IR, **Tanaka E**. Effect of Rebamipide administration on TMJ-OA model mouse. 95<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, Mar 24, 2017, San Francisco, CA, USA (Moscone Convention Center).
  3. Hutami IR, **Izawa T**, Mori H, **Iwasa A**, Shinohara T, Mino-Oka A, **Tanaka E**. The role of osteoclast in the spontaneously developed temporomandibular joint arthritis of the MRL/lpr mice. The 75<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society, Nov 9, 2016, Tokushima, Tokushima (Asty Tokushima).
  4. **Izawa T**, Mori H, Shinohara T, Mino-Oka A, Hutami IR, **Iwasa A**, **Tanaka E**. Rebamipide attenuates mandibular condylar degeneration in a murine model of TMJ-OA by mediating a chondroprotective effect and by downregulating RANKL-mediated osteoclastogenesis. 13<sup>th</sup> Meeting of Bone Biology Forum, Aug 19, 2016, 千葉県幕張市(クロスウエーブ幕張).
  5. 岩浅 亮彦、森 浩喜、**井澤 俊**、篠原 丈裕、三野 彰子、佐藤 南、堀内 信也、田中 栄二:不正咬合患者における顎関節症の臨床統計学的調査. 第29回日本顎関節学会総会・学術大会、2016年7月18日、神奈川県足柄下郡(湯本富士屋ホテル).
  6. 篠原 丈裕、**井澤 俊**、岩浅 亮彦、森 浩喜、三野 彰子、犬伏 俊博、田中 栄二:変形性顎関節症モデルマウス下顎頭におけるヒアルロン酸代謝機構の役割. 第29回日本顎関節学会総会・学術大会、2016年7月18日、神奈川県足柄下郡(湯本富士屋ホテル).
  7. 三野 彰子、**井澤 俊**、篠原 丈裕、森 浩喜、田中 栄二: HIF-1 +/-マウスを用いた変形性顎関節症における HIF-1α の機能解析. 第29回日本顎関節学会総会・学術大会、2016年7月18日、神奈川県足柄下郡(湯本富士屋ホテル).
  8. 佐藤 博子、**井澤 俊**、森 浩喜、岩浅 亮彦、木内 奈央、堀内 信也、田中 栄二: Le Fort III 型骨延長術後に上下顎骨移動術を施行した Apert 症候群の1例. 第59回中・四国矯正歯科学会大会、2016年7月7日、高知県高知市(県民文化ホール).
  9. Mori H, **Izawa T**, **Tanaka E**. Role of Rho-GTP/S1P/Smad3 Signaling on the Pathogenesis of TMJ-OA. IADR, Jun 24, 2016, Seoul, Korea (COEX).
  10. **井澤 俊**、森 浩喜、田中 栄二: S1P/Smad3

- シグナルを介した顎関節における変形性関節症の病態解明. 第 7 回骨バイオサイエンス研究会、2016 年 6 月 4 日、岡山県岡山市(岡山コンベンションセンター).
11. **井澤 俊**、森 浩喜、篠原 丈裕、三野 彰子、塩田 智子、**岩浅 亮彦**、**田中 栄二**：変形性顎関節症モデルマウスにおけるレパミピドの治療効果の検討. 第 74 回日本矯正歯科学会大会、2015 年 11 月 18-20 日、福岡県福岡市(福岡国際会議場).
  12. 森 浩喜、**井澤 俊**、三野 彰子、**岩浅 亮彦**、内田 玲子、**田中 栄二**：S1P/Smad3 シグナルクロストークを介した変形性顎関節症の病態メカニズムの解明. 第 74 回日本矯正歯科学会大会、2015 年 11 月 18-20 日、福岡県福岡市(福岡国際会議場).
  13. 三野 彰子、**井澤 俊**、篠原 丈裕、森 浩喜、森 博世、**岩浅 亮彦**、**田中 栄二**：マウス下顎頭軟骨の形成、維持における HIF-1 の機能解析. 第 74 回日本矯正歯科学会大会、2015 年 11 月 18-20 日、福岡県福岡市(福岡国際会議場).
  14. 篠原 丈裕、**井澤 俊**、三野 彰子、森 浩喜、七條 なつ子、犬伏 俊博、**田中 栄二**：実験的な変形性顎関節症モデルマウス下顎頭におけるヒアルロン酸の役割. 第 74 回日本矯正歯科学会大会、2015 年 11 月 18-20 日、福岡県福岡市(福岡国際会議場).
  15. Mori H, **Izawa T**, **Tanaka E**. Smad3 deficiency leads to mandibular condyle degradation via the Sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P3 signaling axis. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) Annual Meeting, Oct 9-12, 2015, Seattle, WA, USA (Washington State Convention Center).
  16. 白井 愛実、川合 暢彦、森 博世、七條 なつ子、Bayarsaikhan Od、篠原 丈裕、**井澤 俊**、木内 奈央、**田中 栄二**：徳島大学病院矯正歯科における顎変形症患者の臨床統計学的検討(第 2 報). 第 58 回中・四国矯正歯科学会大会 2015 年 7 月 12 日、香川県高松市(サンポートホール高松).
  17. **井澤 俊**、森 浩喜、篠原 丈裕、**岩浅 亮彦**、**田中 栄二**：変形性顎関節症モデルマウスにおけるレパミピドの治療効果の検討. 第 28 回日本顎関節学会総会・学術大会 2015 年 7 月 4-5 日、愛知県名古屋市(名古屋国際会議場).
  18. 森 浩喜、**井澤 俊**、**田中 栄二**：変形性顎関節症の病態形成における S1P/Smad3 シグナルの役割. 第 28 回日本顎関節学会総会・学術大会 2015 年 7 月 4-5 日、愛知県名古屋市(名古屋国際会議場).

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

井澤 俊 (IZAWA, Takashi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教  
研究者番号：30380017

### (2)研究分担者

田中 栄二 (TANAKA, Eiji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号：40273693

岩浅 亮彦 (IWASA, Akihiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教  
研究者番号：90746025