

令和 5 年 4 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10381

研究課題名（和文）I型インターフェロンが顎顔面の形態形成に及ぼす影響

研究課題名（英文）Role of Type I Interferon in craniofacial morphogenesis

研究代表者

早野 暁 (Hayano, Satoru)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：20633712

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：骨芽細胞分化誘導培地にて培養したヒト間葉系幹細胞へのI型インターフェロン添加により、骨芽細胞の細胞数減少と基質形成能の抑制がみられ、実験群での骨芽細胞分化マーカーの変化が見られた。加えて、JAK-STAT経路を介して誘導されるネクロプトーシス関連タンパクの発現も確認できた。JAK-STAT阻害薬を添加することで、上記の変化が抑制されたことから、I型インターフェロンがネクロプトーシスを主体とした細胞死を引き起こすと同時に、骨芽細胞分化へ影響を与えることが示唆され、JAK-STAT経路阻害薬によりそれらを抑制できる可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨は体を支え、運動の軸となる臓器であり、骨代謝や形成の異常は様々な病気の原因となる。これまでに骨代謝や骨形成に関わる様々な因子が解明されてきたが、I型インターフェロン(IFN-I)が骨芽細胞や骨形成に与える影響については未解明である。先天性自己免疫疾患でありIFN-Iの機能更新が生じるSingleton-Merten症候群患者では末端部に骨吸収が生じることから、IFN-Iが骨代謝に何らかの影響を与えることは知られているが、その分子生物学的機序は不明である。本研究は、このような希少疾患の病態解明のみならず、IFNを利用した創薬や骨代謝異常を示す疾患に対する新規治療法開発に繋がることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Human mesenchymal stem cells were cultured in the osteogenic induction media. Type I interferon recombinant protein was administrated into the medium. Type I interferon reduced the number of osteoblasts and suppressed the ability to form substrates, and changed the osteoblast differentiation markers in the experimental group. In addition, the expression of proteins associated with necroptosis induced via the JAK-STAT pathway was also confirmed. The administration of a JAK-STAT inhibitor suppressed the above changes, suggesting that type I interferon causes necroptosis-based cell death and affects osteoblast differentiation at the same time. It was also suggested that JAK-STAT pathway inhibitors may suppress them.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：I型インターフェロン

1. 研究開始当初の背景

骨は体を支え、運動の軸となる臓器であり、骨代謝や形成の異常は様々な病気の原因となる。これまでに骨代謝や骨形成に関わる様々な因子が解明されてきたが、I型インターフェロン(IFN-I)が骨芽細胞や骨形成に与える影響については未解明である。Singleton-Merten Syndrom(以下 SMS)は稀な常染色体優性の先天性自己免疫疾患であり、恒常的にI型インターフェロン(IFN-I)が過剰産生される疾患である。興味深いことに、SMS罹患者では手指骨や歯槽骨など、末端骨の進行性の骨融解が見られる。このことからIFN-Iが骨代謝において何らかの重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

SMSはIFIH1遺伝子のミスセンス変異により引き起こされる症候群であることが知られている。IFIH1遺伝子によりコードされるMDA5はRIG-IとともにRIG-I様受容体ファミリーを形成し、細胞内でのウイルスセンサーとしての役割を果たしている。SMSにおけるIFIH1遺伝子のミスセンス変異はウイルス感染がない状態でもMDA5をはじめとするRIG-I様受容体ファミリーを活性化させ、その結果、恒常的にIFN-Iが過剰産生される。これまでに、IFN-I、特にIFN- β は破骨細胞分化において必須の転写因子であるc-Fosの発現を妨害することから、破骨細胞分化に対して抑制的に働くことが報告されている。そのため骨吸収を抑制し骨形成に働くと考えられている一方で、骨芽細胞に対してはその影響に関する研究が殆どなされておらず、詳細は明らかとなっていないのが現状である。

IFN-Iに関しては以前より細胞死の1つであるアポトーシスとの関連が示唆される一方で、近年ネクロプトーシスと呼ばれる細胞死への関与も示唆されている。

アポトーシスは炎症反応を誘発しないプログラムされた細胞死であり、システインプロテアーゼファミリーであるカパーゼにより制御されることが知られている。一方、ネクロプトーシスはアポトーシスと同様に分子に制御される細胞死であるが、ネクロトーシスと同じく細胞膜の破綻と細胞質内容物の放出を伴うことから炎症反応が生じることが知られている。IFN-IはJAK-STAT経路と呼ばれる情報伝達経路を介してMLKLを活性化しこのネクロプトーシスを引き起こしていると示唆されている。

以上のことから、我々はSMSでみられる進行性の骨吸収が、IFN-Iが細胞死を含む何らかの経路で骨芽細胞の機能を抑制することによって引き起こされているのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

骨代謝におけるIFN-Iの役割を解明することを本研究の目的とする。特に今回の研究ではSMSにみられる、IFN-Iの過剰生産に着目した。健康者由来の間葉系幹細胞を用いたin vitro実験を通して、IFN-Iの機能亢進による進行性の骨形成不全の発生機序を解明する。これにより、SMSにおける骨形成不全の発生機構解明と、その治療法開発の礎としていくことを目的とした。

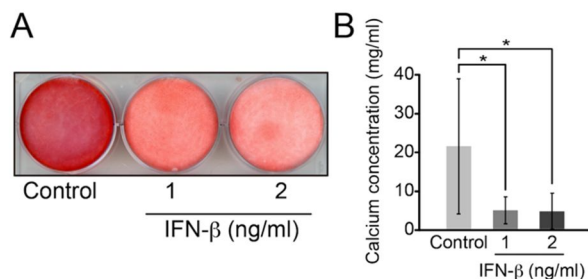
3. 研究の方法

当院に来院した健康な患者から無傷の乳歯を採取した。採取した乳歯から歯髄を摘出し、そこから未分化間葉系幹細胞を単離し、これを骨芽細胞への分化誘導培地で培養した。分化誘導培地へIFN- β リコンビナントタンパクとJAK-STAT経路の阻害薬であるルキソリチニブを添加し、それぞれ対照群と比較した。

骨芽細胞への分化に関してリアルタイムPCR法を用いて比較し、基質形成能に関してはアリザリンレッド染色とカルシウム濃度の測定により比較した。JAK-STAT経路の活性化の評価に対してはmixed lineage kinase ligand (MLKL)タンパクの発現量をウェスタンブロット法により比較した。また、アポトーシスに関してはDNAの断片化をTUNEL染色で、細胞死に関連するタンパクの発現をウェスタンブロット法により比較した。ネクロプトーシスに関する評価の方法としてはPropidium iodide (PI)染色を用いた。

4. 研究成果

始めに、IFN- β の濃度を定めるため抜去乳歯歯髄から単離した間葉系幹細胞幹細胞に対する毒性実験を行った。LD50を調べた結果、0.8 ng/mlであった。この結果から本研究で用いるIFN- β 濃度は、1 ng/mlおよび2 ng/mlとした。間葉系幹細胞幹細胞から骨芽細胞への分化誘導培地へIFN- β のリコンビナントタンパクを添加した群(実験群)と添加していない(対照群)を比較したところ、実験群においてアリザリンレッド染色における石灰化の抑制と、分化培地中のカルシウム濃度が低下していることが確認された(右図)。これに関して、細胞数の減少に起因するものであるのか、あるいは細胞分化に影響があるのかを比較した。細胞数の減少と骨芽細胞分化マーカー



一の発現の両方が変化していることが明らかとなった。骨芽細胞分化に関しては、実験群における骨芽細胞分化マーカーが変化し、また、ルキソリチニブの添加によりそれが改善したことから、IFN- γ による JAK-STAT 経路の活性化が骨芽細胞分化にも影響を与えることが示唆された。

前述の骨芽細胞分化マーカーの変化に関しては、ALP が低下している一方で、Osteocalcin や BSP は上昇するという結果が得られたが、その詳細の解明は今後の課題として残された。

細胞数の減少に関しては、実験群では骨芽細胞の増殖能に変化がないものの細胞数が減少していることがわかった。遺伝子解析の結果、Caspase9 の発現上昇がみられる一方で TUNEL 染色による DNA の断片化に有意差はなく、炎症反応において特異的なマーカーである IL-6 の有意な上昇が同時に確認された。さらに、実験群でのリン酸化 MLKL の増加が確認されたことから、IFN- γ によってアポトーシスとネクロトーシスが同時に生じている可能性が示された。

JAK-STAT 経路の阻害薬であるルキソリチニブを添加したところ、リン酸化 MLKL の発現と IL-6 の抑制がみられたことから、JAK-STAT 経路を阻害することで IFN- γ によるネクロトーシスを抑制することができる可能性が示された。しかし、ルキソリチニブ添加群で Caspase 9 は改善しなかった。つまり、IFN- γ による細胞数の減少はネクロトーシスを主体としたものである可能性が示唆された。

以上のことから、IFN- γ の恒常的な過剰産生は、ネクロトーシスを主体とした骨芽細胞死を引きおこし、同時に骨芽細胞への分化にも影響を与える。それにより、SMS においては IFN- γ の亢進が骨粗鬆症や歯槽骨吸収が引き起こされる可能性が示唆された。また、JAK-STAT 経路阻害薬によりそれらを抑制できる可能性が示唆された。

現在、上記の内容を学術雑誌に投稿中であるが、今後の計画としては、今回明らかにすることの出来なかった骨芽細胞分化へ与える影響の詳細や骨芽細胞死に関する分子機序について、更なる検討を行っていく必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyazaki T., Zhao Z., Ichihara Y., Yoshino D., Imamura T., Sawada K., Hayano S., Kamioka H., Mori S., Hirata H., Araki K., Kawauchi K., Shigemoto K., Tanaka S., Bonewald L. F., Honda H., Shinohara M., Nagao M., Ogata T., Harada I., Sawada Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 Mechanical regulation of bone homeostasis through p130Cas-mediated alleviation of NF- B activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaau7802
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aau7802	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukui Yuko, Hayano Satoru, Kawanabe Noriaki, Wang Ziyi, Shimada Akira, Saito Megumu K., Asaka Isao, Kamioka Hiroshi	4. 巻 71
2. 論文標題 Investigation of the molecular causes underlying physical abnormalities in Diamond Blackfan anemia patients with <i>RPL5</i> haploinsufficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 803 ~ 813
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13168	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Weng Yao, Wang Ziyi, Fukuhara Yoko, Tanai Airi, Ikegame Mika, Yamada Daisuke, Takarada Takeshi, Izawa Takashi, Hayano Satoru, Yoshida Kaya, Kamioka Hiroshi, Okamura Hirohiko	4. 巻 47
2. 論文標題 <sc>0 GlcNAcylation</sc> drives calcium signaling toward osteoblast differentiation: A bioinformatics oriented study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioFactors	6. 最初と最後の頁 992 ~ 1015
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/biof.1774	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田中 敦子、早野 暁、井澤 俊、永田 倭代、上岡 寛
2. 発表標題 インターフェロン が骨芽細胞分化に及ぼす影響
3. 学会等名 第42回 骨形態計測学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoru Hayano, Atsuko Tanaka, Kaori Tabata, and Hiroshi Kamioka
2. 発表標題 DENTAL AND CRANIOFACIAL CHARACTERISTICS OF A PATIENT WITH SINGLETON-MERTEN SYNDROME
3. 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹本 史子、早野 暁、上岡 寛
2. 発表標題 Regional Odontodisplasia症例における頭蓋顔面領域の特徴的所見
3. 学会等名 第63回中四国矯正歯科学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福井 裕子、早野 暁、斎藤 潤、嶋田 明、川邊 紀章、上岡 寛
2. 発表標題 ダイヤモンド・ブラックファン貧血における軟骨形成不全とRPL5変異に起因する細胞死との関連
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoru Hayano, Noriaki Kawanabe, Yuko Fukui, Hiroshi Kamioka
2. 発表標題 THE RELATION BETWEEN CHONDRODYSPLASIA AND RPL5-ASSOCIATED CELL DEATH IN PATIENTS WITH DIAMOND-BLACKFAN ANEMIA
3. 学会等名 95th European Orthodontic Society Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井 裕子、早野 暁、斎藤 潤、嶋田 明、川邊 紀章、上岡 寛
2. 発表標題 RPL5ハプロ不全を伴うダイヤモンド・ブラックファン貧血患者における形態異常の分子病態について
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川邊 紀章 (Kawanabe Noriaki) (00397879)	岡山大学・医歯薬学域・准教授 (15301)	
研究分担者	宝田 剛志 (Takarada Takeshi) (30377428)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------