

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791801

研究課題名（和文） 炎症性骨破壊における toll-like receptor の生理的役割の解明

研究課題名（英文） Study on the physiological roles of toll-like receptors in inflammatory bone destruction

研究代表者

望月 文子 (MOCHIZUKI AYAKO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：10453648

研究成果の概要（和文）：

破骨細胞の分化制御因子の同定とその機能解析は、炎症性骨疾患の治療方法の開発に役立つ。我々は、破骨細胞の分化過程における遺伝子発現の変化を網羅的に解析し、signal transducers and activators of transcription (STAT) 5 という転写因子が破骨細胞分化を抑制する可能性を見出した。現在、論文投稿の準備中で、これらの成果は今後の骨代謝研究や炎症性骨疾患などの医療の発展に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：

Identification and characterization of osteoclastogenesis regulatory factors will be useful for development of therapeutic approach for inflammatory bone diseases. We found that signal transducers and activators of transcription (STAT) 5, which is a transcription factor has the potential to play an important role for suppressing osteoclast differentiation. These results will contribute to development for bone metabolism research and medicine for inflammatory diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：骨、破骨細胞、樹状細胞、細胞分化、炎症、免疫、Toll-like receptor、RANKL

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は骨吸収能を持つ細胞で、骨組織の恒常性を維持するのに重要な役割を担っている。しかし、歯周病や関節リウマチなどの炎症を伴った骨疾患に罹患すると、破骨細胞の数が増加し、異常に活性化した状態となって、骨量減少を引き起こす。したがって、破骨細胞の分化を制御することで病的な骨

吸収を阻止することが可能となり、炎症性骨疾患の治療法の開発に寄与できる可能性がある。

(1) 炎症性骨疾患における破骨細胞の役割
高齢化が進行する我が国では、加齢に伴い発症する骨粗鬆症患者だけでなく、関節リウマチや歯周病などの炎症性骨疾患に罹患す

る患者が増加しており、ホルモンバランスの不均衡や自己免疫疾患、あるいは様々な炎症性サイトカインによって病的な骨破壊が誘発される。これらの骨代謝疾患は日常生活に支障を来し、患者のQOLは著しく低下する。このように、骨代謝疾患の治療法の開発は急務であり、そのためには骨吸収を担う細胞である破骨細胞の分化・形成制御機構を解明することが重要であると考えられる。

(2) 破骨細胞分化制御因子

骨は体の支持のほか、造血やカルシウムの貯蔵など多様な役割を担っている。この組織は骨吸収を担う破骨細胞と骨を作る骨芽細胞による骨形成のバランスによって恒常性が維持されている。破骨細胞分化は骨芽細胞が産生するRANKLと呼ばれる因子によって誘導され、破骨細胞の分化の初期段階では転写因子であるNFATc1遺伝子の発現が上昇し、様々な破骨細胞関連遺伝子の発現を促進する。また最近、Interferon regulatory factor (IRF) 8と呼ばれる転写因子がNFATc1の発現を阻害することによって破骨細胞分化を制御することが明らかとなった (Zhao B et al., *Nat Med*, 15(9):1066-71, 2009)。このように、破骨細胞分化は様々な因子が関与し制御されていることが示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、破骨細胞の分化を調節する新規の因子を同定するため、その機能について詳細に解析することを目的とした。網羅的な遺伝子発現解析を行った結果、signal transducers and activators of transcription (STAT) 5 という転写因子が破骨細胞の分化調節の一端を担っている可能性が示唆された。

3. 研究の方法

マウス骨髄細胞をM-CSFというサイトカインで刺激し、骨髄細胞由来のマクロファージを誘導した。そのマクロファージを破骨細胞分化誘導因子であるRANKLというサイトカインで刺激し、破骨細胞の分化を誘導した。このとき、RANKLで刺激していないマクロファージ、マクロファージをRANKLで刺激して24、48、72時間後のそれぞれの細胞からtotal RNAを抽出し、マイクロアレイ (GeneChip, Affimetrix社製) を用いて破骨細胞の分化過程における遺伝子発現パターンの変化を網羅的に解析した。候補遺伝子群に関して、Real-time PCR法を用いて、その結果をもとに、候補遺伝子群の発現変化を確認するとともに、経時的発現変化を詳細に検討した。

上記の結果を基に、破骨細胞の分化を調節している候補遺伝子群について、候補遺伝子

の強制発現および発現抑制を行い、破骨細胞分化に対する影響を検討した。

4. 研究成果

マクロファージをRANKLで刺激して破骨細胞分化を誘導し、各分化段階における遺伝子の発現様式をマイクロアレイ法により網羅的解析を行った結果、いくつかの候補遺伝子に着目した。その中で、signal transducers and activators of transcription (STAT) 5に着目した。STAT5は樹状細胞の分化に必須な転写因子であるIRF8の発現を上流で制御している転写因子で、STAT5もIRF8同様、樹状細胞の分化に重要な転写因子として報告された。(Esashi E et al., *Immunity*, 28(4):509-520, 2008.)。一方、ZhaoらによってIRF8は破骨細胞分化を負に制御していることが明らかにされたことから (Zhao B et al., *Nat Med*, 15(9):1066-71, 2009)、STAT5はIRF8の発現を制御して破骨細胞分化を制御していることが予想された。

破骨細胞分化誘導に対するSTAT5の作用を検討するために、STAT5 inhibitorを破骨細胞分化誘導系に作用させ、効果を検討した。その結果、破骨細胞分化に対してほとんど影響を及ぼさなかった。一方、破骨細胞分化抑制因子であるGM-CSFを破骨細胞分化誘導系に作用させると破骨細胞分化は完全に抑制されるが、このときSTAT5 inhibitorを同時添加するとGM-CSFによる破骨細胞分化抑制が一部解除されることがわかった。以上のことから、STAT5は破骨細胞分化が負に傾くときに制御する因子であることが示唆された。今後、更なる解析を行う予定である。

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6件)

- ① Miyamoto A, Takami M, Matsumoto A, Mochizuki A, Yamada T, Tachi K, Shibuya I, Nakamachi T, Shioda S, Baba K, Inoue T, Miyamoto Y, Yim M, Kamijo R. R848, a toll-like receptor 7 agonist, inhibits osteoclast differentiation but not survival or bone-resorbing function of mature osteoclasts. *Cytotechnology*, 2012 Feb 23.
- ② Matsuo E*, Mochizuki A*, Nakayama K, Nakamura S, Yamamoto T, Shioda S, Sakurai T, Yanagisawa M, Shiuchi T, Minokoshi Y, Inoue T. Decreased Intake of Sucrose Solutions in Orexin

- Knockout Mice. *J Mol Neurosci*, 43: 217-224, 2011. (原著：査読有)
*These authors contributed equally to this work.
- ③ Tachi K, Takami M, Sato H, Mochizuki A, Zhao B, Miyamoto Y, Tsukasaki H, Inoue T, Shintani S, Koike T, Honda Y, Suzuki O, Baba K, Kamijo R. Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced ectopic bone formation by transforming growth factor- β 1. *Tissue Eng Part A*, 17: 597-606, 2011. (原著：査読有)
- ④ Tachi K, Takami M, Zhao B, Mochizuki A, Yamada A, Miyamoto Y, Inoue T, Baba K, Kamijo R. Bone morphogenetic protein 2 enhances mouse osteoclast differentiation via increased levels of receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblasts. *Cell Tissue Res*, 342(2): 213-220, 2010. (原著：査読有)
- ⑤ Gemba-Nishimura A, Inoue T, Nakamura S, Nakayama K, Mochizuki A, Shintani S, Yoshimura S. Properties of synaptic transmission from the reticular formation dorsal to the facial nucleus to trigeminal motoneurons during early postnatal development in rats. *Neuroscience*, 166: 1008-1022, 2010. (原著：査読有)
- ⑥ Kamijo R, Zhao B, Mochizuki A, Takami M. Involvement of transcription factor IRF-8 in bone metastasis of cancer. *The Waksman Foundation of Japan*, Tokyo, 2010. (著書：査読無)
- [学会発表] (計 9 件)
- ① Inoue T, Nakamura S, Gemba-Nishimura A, Nonaka M, Yoshida A, Mochizuki A, Nakayama K. Electrophysiological and morphological properties of premotor neurons targeting jaw-closing and jaw-opening motoneurons. NANOSYMPOSIUM; Orofacial Systems: Respiration, Communication, and Feeding; Theme D: Sensory and Motor Systems, Neuroscience 2011, Washington, DC, 2011/11/12-16
- ② 野中睦美、西村晶子、中山希世美、中村史朗、望月文子、飯島毅彦、井上富雄. 三叉神経運動ニューロンには三叉神経運動核周囲の様々な部位からの入力収束する. 日本顎口腔機能学会第 47 回学術大会, 神戸 2011/10/22
- ③ Nonaka M, Inoue T, Nishimura A, Nakayama K, Mochizuki A, Nakamura S, Yoshimura S, Iijima T. Properties of synaptic transmission from regions surrounding the trigeminal motor nucleus to trigeminal motoneurons in neonatal rats. 8th IBRO world congress of neuroscience Florence, 2011/07/18
- ④ 望月文子、松尾英子、中山希世美、中村史朗、井上富雄. Orexin knockout mice は蔗糖溶液摂取量が減少する. 日本顎口腔機能学会第 46 回学術大会, 仙台 2011/05/29
- ⑤ 中村史朗、望月文子、中山希世美、井上富雄:顎運動制御機構におけるプレモーターニューロンの形態学および電気生理学的解析. 昭和大学大学院歯学研究科・口腔癌包括的研究センター平成 22 年度合同シンポジウム東京 2011/03/26
- ⑥ 宮本阿礼、高見正道、望月文子、井上富雄、上條竜太郎:口腔癌と免疫システムの相互作用の解明. 昭和大学大学院歯学研究科・口腔癌包括的研究センター平成 22 年度合同シンポジウム, 東京 2011/03/26
- ⑦ Matsuo E, Mochizuki A, Nakayama K, Nakamura S, Yamamoto T, Shioda S, Sakurai T, Inoue T. Decreased sucrose intake and locomotor activity in orexin knockout mice. the 89th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research Meeting Location, San Diego 2011/03/19
- ⑧ 中山希世美、望月文子、西村晶子、井上富雄. 新生マウス 脳幹摘出標本におけるリズム的な顎運動の誘発. 日本顎口腔機能学会第 45 回学術大会, 埼玉 2010/11/06
- ⑨ 中山希世美、望月文子、井上富雄. 三叉神経中脳路核ニューロンにおけるオレキシンの作用. 第 7 回 GPCR 研究会, 東京 2010/05/11

[その他]

昭和大学歯学部口腔生理学ホームページ
<http://www.showa-u.ac.jp/sch/dent/major/oralphys/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

望月 文子 (MOCHIZUKI AYAKO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：10453648

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：