

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791001

研究課題名(和文) H0-1 と転写抑制因子 Bach1 による破骨細胞分化制御の解明とその治療応用

研究課題名(英文) Research into the role of H0-1 and its repressor Bach1 on osteoclastogenesis

研究代表者

浜 真麻 (HAMA, Maasa)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：70574169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞分化や炎症性骨破壊における誘導型ヘム分解酵素H0-1と転写抑制因子Bach1の関わりについて、恒常的にH0-1が高発現したBach1欠損マウスを用いて解析した。破骨細胞分化早期のH0-1発現低下が分化に必要であり、そのH0-1発現は転写抑制により制御され、Bach1の他にp38alphaリン酸化も関与していることを明らかにした。また、TNFalpha刺激炎症性骨破壊モデル及び抗コラーゲン抗体誘導関節炎モデルにおいて、Bach1欠損マウスで、破骨細胞数の減少、骨破壊の抑制、関節炎の軽減が得られた。H0-1発現制御を介した新規治療法は関節リウマチの炎症や骨破壊を抑制し得る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Bone destruction of rheumatoid arthritis (RA) is caused by abnormally activated osteoclasts. It is suggested that induction of heme oxygenase (HO)-1 is beneficial for the treatment of RA by reducing inflammation. The objective of this study is to clarify the influence of HO-1 and its repressor Bach1 on osteoclastogenesis and inflammatory bone loss. Through in vitro osteoclastogenesis experiments using bone marrow derived macrophages from Bach1 deficient mice, we demonstrate that down-regulation of HO-1 transcription, in which Bach1 as well as p38alpha is involved, is essential for the early stage of osteoclastogenesis. TNFalpha-induced inflammatory bone destruction and arthritis induced by collagen antibody are both reduced in Bach1 deficient mice. These findings support the hypothesis that up-regulation of HO-1 or inhibition of Bach1 activity represent promising therapeutic strategies for rheumatoid arthritis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：関節リウマチ 破骨細胞 H0-1 Bach1

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチ (RA)は、多関節炎とそれに引き続いて起こる関節破壊を特徴とした慢性炎症性疾患であり、破骨細胞の異常な活性化による局所の骨破壊と全身性の骨粗鬆症の進行が認められる。

(2) 誘導型ヘム分解酵素 heme oxygenase (HO)-1 は、抗酸化、抗炎症など細胞保護作用を有する。RA の病態における HO-1 の関わりについては、以下のことが報告されていた。

RA 患者の滑膜マクロファージでは HO-1 が高発現しており、RA 患者由来滑膜細胞株に HO-1 発現を誘導すると炎症性サイトカインの産生が抑制される (Kobayashi H, et al, Arthritis Rheum, 2006) 。 HO-1 に対応する *HMOX1* 遺伝子のプロモーター領域中の GT 配列リピート長が RA 罹患率や関節破壊進行速度と関連する (Rueda B, et al. Arthritis Rheum. 2007; Wagners FA, et al, Arthritis Rheum. 2008) 。 HO-1 誘導剤 hemin が破骨細胞分化を抑制する (Zwerina J, et al. FASEB J. 2005) 。

(3) HO-1 の発現は主に転写促進因子 nuclear factor erythroid-derived 2 related factor 2 (Nrf2) と転写抑制因子 BTB-and-CNC-homology-1 (Bach1)が HO-1 エンハンサーE1, E2 の Maf-recognition elements (MARE)に競合的に結合することにより制御されるが、単球系細胞では Bach1 がその制御の主役である (Miyazaki T, Hama M, et al. Cancer Sci. 2010) 。

(4) HO-1 の発現が各組織・細胞で恒常的に高い Bach1 欠損マウスの寿命は同種野生型と同程度であり、種々の病的環境に抵抗性である。以上の背景より、HO-1 発現制御を介した新規治療法により RA の炎症や骨破壊を抑制し得る可能性があると考え、本研究では HO-1 発現制御を目的とした治療の分子標的候補として Bach1 に着目した。

## 2. 研究の目的

本研究は、HO-1 とその転写抑制因子である Bach1 が、破骨細胞分化や関節炎に伴う関節破壊にどのように関与するかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

HO-1 を恒常的に高発現する Bach1 欠損マウスを用い、同種野生型マウスとの比較実験を施行した。

- (1) 両マウスより採取した骨髄由来マクロファージに M-CSF, RANKL 刺激を加え破骨細胞分化を誘導し、分化の程度と分化に関わる因子の発現・機能を比較した。
- (2) TNFalpha 刺激による炎症性骨破壊モデル及び、抗コラーゲン抗体誘導関節炎モデルで、骨破壊の程度や破骨細胞数、関節炎の程度などを比較した。

## 4. 研究成果

平成 24 年度の研究開始以前に、Bach1 欠損マウスを用いた in vitro の解析から以下のことを明らかにしていた。

骨髄マクロファージから破骨細胞への分化段階の早期に HO-1 の発現抑制が起こること

HO-1 高発現で破骨細胞分化が抑制されること

HO-1 発現抑制は Bach1 を介した転写抑制以外に Bach1 非依存性の制御もあること  
これらの結果をもとに、本研究では以下の検討を行った。

- (1) RANKL 刺激後の HO-1 転写抑制における Bach1 以外の候補因子の検討：

Bach1 と相同性の高い転写因子 Bach2 が、B 細胞において HO-1 発現調節に関わるという報告 (Watanabe-Matsui M, et al. Blood 2011) があり、Bach2 の関与について検討した。Bach2 欠損マウス由来骨髄マクロファージでは野生型と同程度、Bach1/Bach2 ダブル欠損マウス骨髄マクロファージでは Bach1 欠損と

同程度に RANKL 刺激後の HO-1 転写が抑制されることから, Bach2 は HO-1 発現に影響しないと判断した (図 1)。

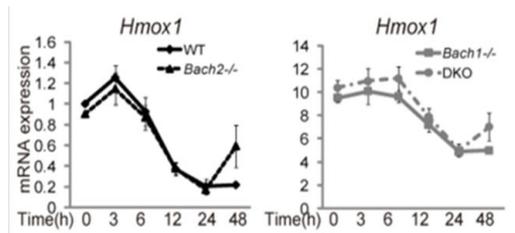


図 1. 野生型, Bach1 欠損, Bach2 欠損, Bach1/Bach2 欠損マウス由来骨髄マクロファージへの RANKL 刺激後の HO-1 発現の経時変化

p38alpha 阻害剤 SB203580 を添加すると, RANKL 刺激後の HO-1 発現低下が起こらず, 破骨細胞分化が濃度依存性に阻害されることから, p38alpha のリン酸化が HO-1 転写抑制に関与していることを確かめた (図 2)。

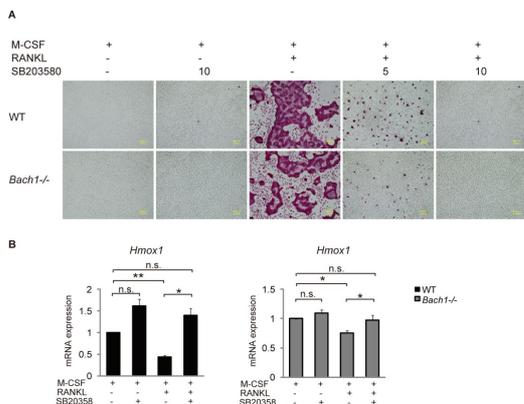


図 2. p38alpha 阻害剤 SB203580 による RANKL 刺激後 HO-1 発現低下抑制と破骨細胞分化抑制

## (2) 炎症性骨破壊モデルマウスの解析:

通常飼育環境下の Bach1 欠損, 野生型マウスの骨形態, 破骨細胞数は, マイクロCT や組織学的検討で差異を認めなかった。

TNFalpha 投与後の頭蓋骨を組織学的に評価したところ, Bach1 欠損では破骨細胞数が少なく, 骨破壊が抑制された (図 3)。

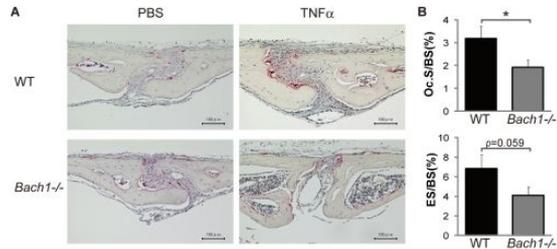


図 3. TNFalpha 刺激による炎症性骨破壊

抗コラーゲン抗体により関節炎を誘導すると, Bach1 欠損マウスで関節炎の程度が軽減され, 関節破壊も抑制される傾向にあった。

一連の研究において, HO-1 高発現が破骨細胞分化や関節炎, 炎症性関節破壊を抑制することを, *in vitro*, *in vivo* の実験で確かめた。また本研究にて, 破骨細胞分化開始に HO-1 発現抑制が必要であることが示唆されたが, 近年, Bach1-HO-1 系が骨髄単核細胞から単球/マクロファージへの分化に関わるとの報告も出された (So AY, Blood. 2012)。これらから, HO-1 発現制御を介した新規治療法は RA の炎症や骨破壊を抑制し得る可能性があるとともに, Bach1-HO-1 系は単球系細胞の関わる病態形成に深く関わっていると考えられ, HO-1 発現制御機構の解析が他の病態の解析にもつながることが期待される。

## 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 1 件)

Hama M, Kirino Y, Takeno M, Takase K, Miyazaki T, Yoshimi R, Ueda A, Itoh-Nakadai A, Muto A, Igarashi K, Ishigatsubo Y. Bach1 regulates osteoclastogenesis via both heme oxygenase-1 dependent and independent pathways. *Arthritis Rheum.* 2012;64(5):1518-28. 査読有

[学会発表](計 2 件)

Hama M, et al. Bach1 regulates osteoclastogenesis via heme oxygenase-1 dependent and independent pathways. American College of Rheumatology 75th Annual Scientific Meetings, Nov 6<sup>th</sup> 2011, Chicago, IL, poster.

浜 真麻, 桐野洋平, 高瀬 薫, 吉見竜介,  
上田敦久, 岳野光洋, 石ヶ坪良明: Heme  
oxygenase(HO)-1 とその転写抑制因子  
Bach1 による破骨細胞分化の制御. 第 55  
回日本リウマチ学会総会・学術集会: 神  
戸, 2011 年 7 月 16 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~naika1/graduate\\_achieve\\_supplement001.html](http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~naika1/graduate_achieve_supplement001.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浜 真麻 (HAMA, Maasa)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号: 70574169