

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 16 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21791802

研究課題名（和文） Toll 様受容体リガンドの骨破壊機序に関する研究

研究課題名（英文） Mechanism of Toll-like receptor-mediated bone disruption

研究代表者

森脇 佐和子（MORIWAKI SAWAKO）

（独）国立長寿医療研究センター・遺伝子蛋白質解析室・研究員

研究者番号：90399593

研究成果の概要（和文）：Toll 様受容体リガンドの破骨細胞誘導能について検討した。TLR2 リガンドの単独刺激で破骨細胞は分化するが、TLR4 リガンドの単独刺激では分化が起こらない。TLR4 下流に存在する TRIF/TRAM 経路から産生される IFN- β が分化の抑制因子として作用している可能性がある。今回 TRIF/TRAM 経路を遮断する実験を行ったが、破骨細胞誘導に変化は認められなかった。TLR4 を介した破骨細胞分化では、IFN- β 以外の抑制要因の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Several Toll-like receptor (TLR) ligands including LPS are enhancer for pathological osteoclast formation. TLR2 ligand can induce osteoclast formation without any other osteoclastogenic factor. By contrast, TLR4 ligand is insufficient to induce osteoclast formation by itself. TLR4 signaling is composed of two pathways: MyD88-dependent pathway and TRIF/TRAM pathway associated with the introduction of IFN-inducible genes. Since it is considered that IFN- β which is generated by activation of TLR4 suppresses differentiation of osteoclast, we attempted to block the TRIF/TRAM pathway with various methods. However, osteoclastogenesis was not induced by TLR4 ligand stimulation. These results indicate the possibility that another unknown element is implicated in TLR4-dependent osteoclastogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔病理学

1. 研究開始当初の背景

近年の破骨細胞研究は急速な進展をみせ、骨・関節疾患の病態理解、予防・治療法の開発に重要な情報を提供してきた。しかしながら、病的な骨破壊はその病態により様々な様相を呈し、未だ知られざる機序が存在する。通常、破骨細胞は骨芽細胞が産生する破骨細胞誘導因子(RANKL)の刺激を受け、成熟破骨細胞へと分化し骨吸収能を発現する。しかし病的環境下では、内因性のTNF- α や外因性の細菌由来成分によっても破骨細胞誘導が起こる。

破骨細胞誘導作用を持つ細菌由来成分の一つであるLPSは、歯槽骨の破壊をもたらすことや、関節炎モデルマウスに注入することで重篤な炎症を引き起こさせることができる非常に強力な骨破壊因子である。LPSは免疫反応に重要なToll様受容体4(TLR4)のリガンドとして同定されており、破骨細胞誘導もTLR4のシグナル系を介した作用と考えられる。しかしながら、TLR4を発現するマクロファージや未成熟な破骨細胞前駆細胞に対して、LPSは直接的な誘導活性を示さず、RANKLの存在下で初めて分化誘導活性を示すという特徴をもつことがわかった。

一方、我々の研究結果から、TLR2のリガンドとして用いられるPam3CSK4(Pam3)の場合、RANKL非存在下でも破骨細胞前駆細胞(マクロファージ)から成熟破骨細胞への分化誘導能を示すことが明らかとなった。両シグナル経路はリガンドの特異性が異なることを除いては、ほぼ同じ細胞内因子を介した伝達経路であり、破骨細胞誘導に関する両者の違いに関する研究は未だ十分理解されていない。

2. 研究の目的

異なるToll様受容体を介した破骨細胞誘導機序の違いを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞分化誘導

マウスマクロファージ細胞株RAW264.7またはマウス骨髄由来マクロファージ(BMM)を用いた。細胞を至適濃度以下のRANKLで刺激または未刺激後、TLRリガンドを添加した。分化誘導された破骨細胞は酒石酸耐性酸ホスファターゼ(TRAP)染色により検出した。

(2) 産生サイトカインの検討

TLRリガンド刺激により産生されたサイトカイン(IL-1 β , IL-6, TNF- α)は、ELISA法を用いて測定した。

(3) ノックダウン細胞の作製

RAW264.7細胞にIRF-3, IRF-7およびTicam2

に対するsiRNAを導入し、ノックダウン細胞を作製した。

(4) 破骨細胞分化に関する遺伝子発現
細胞からRNAを抽出し、破骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現を、RT-PCR法を用い確認した。

4. 研究成果

(1) TLRリガンドによる破骨細胞の分化誘導

TLR4とTLR2を介した破骨細胞分化誘導およびサイトカイン産生について検討を行った。

破骨細胞分化誘導には、RAW264.7細胞またはBMMを用いた。細胞を至適濃度以下のRANKLで刺激後、LPSまたはPam3を添加するといずれもTRAP陽性多核細胞が多数誘導された。次に、LPSまたはPam3のみを細胞に添加したところ、TRAP陽性多核細胞はPam3刺激のみで誘導された。この誘導は、BMMよりもRAW264.7細胞でより顕著であった。一方、LPS刺激のみではTRAP陽性多核細胞の形成が見られなかった。

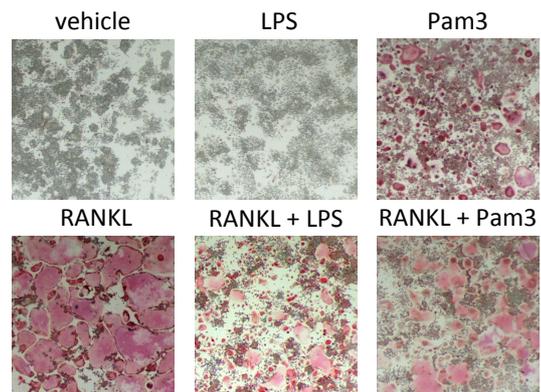


図: RAW264.7細胞による破骨細胞誘導

これらの分化誘導系で産生されたサイトカイン(IL-1 β , IL-6, TNF- α)についてELISA法を用いて測定した。RANKLのみで刺激した場合と比較した結果、至適濃度以下のRANKL刺激後にLPS刺激またはLPS単独で刺激した細胞は、いずれのサイトカインも著しく高値であった。一方Pam3は、単独刺激ではいずれのサイトカインもLPSと同様に高値を示したが、RANKLで前処理した場合はRANKLの単独刺激の場合と同程度の低い産生量であった。

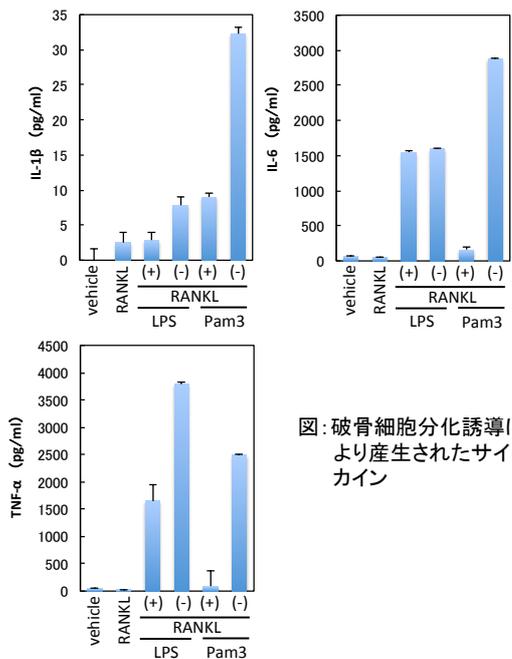


図:破骨細胞分化誘導により産生されたサイトカイン

(2) TRIF/TRAM 経路の関与

TLR を介した破骨細胞形成は、受容体下流に存在する MyD88 から TRAF6 を介するシグナル伝達経路が活性化され、分化が誘導されると考えられている。両リガンドは、認識する受容体が異なるだけで、細胞内のシグナル伝達経路は同様である。しかしながら、TLR4 には MyD88 を経由する経路の他に、TRIF/TRAM 経路と呼ばれるものが存在する。この経路が活性化されることにより、いくつかのインターフェロン (IFN) やケモカインが産生されることが明らかとなっている。中でも IFN-β は、破骨細胞誘導に対し抑制的に働くことが知られており、LPS 単独で破骨細胞前駆細胞を刺激した場合は、IFN-β が産生されることで破骨細胞誘導が抑制されていると考えられた。

そこで、TRIF/TRAM 経路を遮断することで、破骨細胞誘導に変化が見られるかどうか検討した。

RAW264.7 細胞を用い、細胞内アダプター因子である TRAM (Ticam2)、または IFN 産生に関与する転写因子 IRF-3、IRF-7 を標的としたノックダウン細胞を作製した。各細胞を至適濃度以下の RANKL で刺激した後、LPS または Pam3 を添加すると、いずれも TRAP 陽性の破骨細胞様細胞が誘導された。Ticam2 のノックダウン細胞においては、同条件で破骨細胞分化を誘導した場合、他の細胞に比べ破骨細胞誘導の亢進が認められた。次に、IRF-3 と IRF-7 の両方をノックダウンした細胞で検討したが、単独でノックダウンした場合と比較し、とくに変化は認められなかった。このことから、TLR4 を介した破骨細胞誘導の抑制作用には、シグナル経路上流に位置する TRAM

の関与が強いことが示唆された。

各 siRNA によるノックダウン細胞を LPS または Pam3 のみで刺激した場合、Pam3 では単核の TRAP 陽性破骨細胞様細胞が誘導されたが、LPS では変化が認められなかった。

そこで、TLR リガンドのみで刺激した細胞について、破骨細胞分化に関与するマーカー遺伝子の発現を調べた。その結果、破骨細胞分化に必須の転写因子である c-fos は、いずれの刺激によっても発現上昇していることが分かった。しかし、LPS 刺激による IFN-β の発現は、コントロール群に比べ低下したが、ノックダウン細胞でも確認された。またこの細胞では、TRAP の顕著な発現変化は認められなかった。

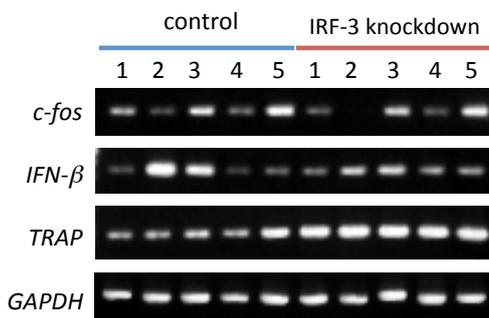


図:TLRリガンド刺激による破骨細胞分化関連遺伝子の発現

line1: 0 h
line2: LPS刺激 2 h, line3: LPS刺激 6 h
line4: Pam3刺激 2 h, line5: Pam3刺激 6 h

次に、TRIF 阻害剤を用い、TRIF/TRAM 経路の阻害を試みた。破骨細胞分化誘導実験において細胞を TLR リガンドのみで刺激した場合、各ノックダウン細胞と同様に、LPS では TRAP 陽性細胞が認められなかった。TLR リガンドまたは RANKL で刺激した細胞について、破骨細胞分化マーカー遺伝子の発現を調べた結果、LPS は Pam3 刺激と同じく c-fos の発現亢進が確認できたが、TRAP については明らかな発現上昇が確認できなかった。また IFN-β は、LPS 刺激によりわずかながら発現が亢進していることが確認された。

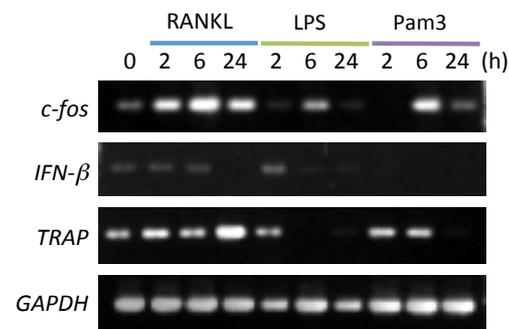


図:破骨細胞分化関連遺伝子の発現

TRIF/TRAM 経路の阻害においても、LPS 刺激で著しい破骨細胞分化誘導効果は確認できなかった。しかしながら、LPS の刺激により c-fos 遺伝子の発現が上昇することから、LPS 刺激のみでも破骨細胞分化へ方向付ける刺激が与えられていると考えられる。TLR4 と TLR2 を経由した破骨細胞分化の違いは、これまでの報告から、TRIF/TRAM 経路から誘導される IFN- β の影響が強いと考えていたが、今回の研究では破骨細胞分化を途中で遮断する他の要因が存在することを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森脇 佐和子 (MORIWAKI SAWAKO)

(独) 国立長寿医療研究センター・遺伝

子蛋白質解析室・研究員

研究者番号：90399593

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし