

機関番号：3 2 6 2 2

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：2 0 3 9 0 4 7 4

研究課題名 (和文) 生理的骨改造および炎症性骨破壊における転写因子 IRF-8 の機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of the transcription factor IRF-8 in physiological bone remodeling and inflammatory bone destruction

研究代表者

高見 正道 (TAKAMI MASAMICHI)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：80307058

研究成果の概要 (和文)：破骨細胞の分化制御因子の同定は、細胞分化メカニズムの解明や骨疾患の治療方法の開発に役立つ。我々は、IRF-8 という転写因子が破骨細胞の分化を抑制する役割を担い、それを欠損したマウスは骨粗鬆症を発症することを見いだした。さらに IRF-8 による分化抑制の分子メカニズムを解明し、その結果を Nature Medicine 誌 (15:1066-1071,2009) に発表した。これらの成果は今後の生命科学研究や骨疾患などの医療に貢献すると期待される。

研究成果の概要 (英文)：Identification of osteoclast differentiation regulatory factors will be beneficial for understanding the mechanisms of cellular differentiation and the development of treatment methods for bone diseases. We found that a transcription factor IRF-8 plays a role of suppressing osteoclast differentiation and IRF-8 deficient mice exhibit severe osteoporosis. We also revealed molecular mechanism of the inhibitory action of IRF-8 and published the results in Nature Medicine (15: 1066-1071, 2009). This finding will contribute to biological research and medicine including bone diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：骨代謝・組織再生・免疫

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、炎症、細胞分化、IRF-8、RANKL、炎症、免疫、遺伝子、Toll-like receptor、歯周病、歯

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は骨吸収を担う唯一の細胞であり、骨の恒常性を維持するのに不可欠である。しかし、歯周病や骨粗鬆症などの病的な条件下ではその数が増加し、過度の吸収による骨量減少をもたらす原因となる。したがって、破骨細胞の分化を制御する分子を同定すれば、破骨細胞分

化のメカニズムや骨破壊を伴う疾患の治療に大きく役立つことが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、破骨細胞の分化調節を担う新しい因子を同定し、その機能について疾患との関連も含め詳細に解明することを目的とした。すでに網羅的な遺伝子解析の結果より、Interferon regulatory factor (IRF)-8 という転写

因子が破骨細胞の分化調節を担うことを示唆する結果を得ている。そこで、破骨細胞分化および炎症性骨破壊と IRF-8 の関係について解析をおこなった。

3. 研究の方法

1) IRF-8 欠損マウスの骨解析: μ CT および包埋組織切片を用いて骨密度や細胞種を解析した。

2) IRF-8 による破骨細胞分化抑制メカニズムの解明: 破骨細胞の前駆細胞に IRF-8 遺伝子を強制的に発現させ、破骨細胞分化に及ぼす影響を解析した。また、NFATc1 と IRF-8 の分子間相互作用について、免疫沈降法などを用いて解析した。

3) IRF-8 と炎症性骨破壊の関係解明: 細菌の構成成分である LPS を野生型および IRF-8 欠損マウスの頭蓋骨に投与し、炎症性骨破壊の程度を比較した。

4. 研究成果

1) IRF-8 による破骨細胞分化抑制メカニズム: IRF-8 を破骨細胞の前駆細胞に強制的に発現させると分化が抑制された。さらに、IRF-8 が破骨細胞分化に必須の NFATc1 に結合することによって、NFATc1 の発現と機能を抑制することを明らかにした。これは IRF-8 が破骨細胞分化を抑制する機能を担っていることを示唆する。

2) 骨の恒常性維持における IRF-8 の機能: IRF-8 欠損マウスの骨を解析したところ、破骨細胞数の増加による重篤な骨粗鬆症を発症していた。また、このマウスの骨髄細胞から調整した破骨細胞の前駆細胞は野生型のそれに比べ有意に高い破骨細胞への分化ポテンシャルをもっていた。これらの結果は IRF-8 が破骨細胞分化を抑制し、骨量減少を防いでいることを示唆する。

3) 炎症性骨破壊における IRF-8 の機能: マウスの頭蓋骨に LPS を投与したところ、野生型および IRF-8 欠損マウスにおいて破骨細胞の増加による骨破壊が誘導された。骨破壊の程度は IRF-8 欠損マウスの方が野生型よりも重篤であった。これは、IRF-8 が炎症性骨破壊を抑制する機能を担っていることを示唆する。

以上より、我々は IRF-8 が NFATc1 との相互作用を介して破骨細胞形成を抑制していること、さらに、骨代謝および骨疾患においても IRF-8 は防御的な役割を担っていることを明らかにした。

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 12 件)

*CA: corresponding author

- ① Yoshimura K, Miyamoto Y, Yasuhara R, Maruyama T, Akiyama T, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Tsunawaki S, Tachikawa T, Baba K, Kamijo R. Monocarboxylate transporter-1 is required for cell death in mouse chondrocytic ATDC5 cells exposed to interleukin-1 β via late-phase activation of nuclear factor κ B and expression of phagocyte-type NADPH-oxidase. (査読有) *Journal of Biological Chemistry* (in press)
- ② Tachi, K., Takami, M. (CA), 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. (2011) (査読有) *Tissue Engineering - Part A*, 17 (5-6), pp. 597-606.
- ③ Tachi, K., Takami, M. (CA), 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. (2010) (査読有) *Cell and Tissue Research*, 342 (2), pp. 213-220.
- ④ Hasegawa, S.-I., Yonezawa, T., Ahn, J.-Y., Cha, B.-Y., Teruya, T., Takami, M., Yagasaki, K., Nagai, K., Woo, J.-T. Honokiol inhibits osteoclast differentiation and function in vitro. (2010) (査読有) *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33 (3), pp. 487-492.

- ⑤ Takami, M. (CA), Mochizuki, A., Yamada, A., Tachi, K., Zhao, B., Miyamoto, Y., Anada, T., Honda, Y., Inoue, T., Nakamura, M., Suzuki, O., Kamijo, R. Osteoclast differentiation induced by synthetic octacalcium phosphate through receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblasts. (2009) (査読有) *Tissue Engineering - Part A*, 15 (12), pp. 3991-4000.
- ⑥ Zhao, B., Takami, M. (CA), Yamada, A., Wang, X., Koga, T., Hu, X., Tamura, T., Ozato, K., Choi, Y., Ivashkiv, L.B., Takayanagi, H., Kamijo, R. Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. (2009) (査読有) *Nature Medicine*, 15 (9), pp. 1066-1071.
- ⑦ Yasuhara, R., Miyamoto, Y., Takami, M., Imamura, T., Potempa, J., Yoshimura, K., Kamijo, R. Lysine-specific gingipain promotes lipopolysaccharide- and active-vitamin D3-induced osteoclast differentiation by degrading osteoprotegerin. (2009) (査読有) *Biochemical Journal*, 419 (1), pp. 159-166.
- ⑧ Yamada, A., Suzuki, D., Miyazono, A., Oshima, K., Kamiya, A., Zhao, B., Takami, M., Donnelly, R.P., Itabe, H., Yamamoto, M., Kimura, S., Kamijo, R. IFN- γ down-regulates Secretoglobin 3A1 gene expression. (2009) (査読有) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379 (4), pp. 964-968.
- ⑨ Kawatani, M., Okumura, H., Honda, K., Kanoh, N., Muroi, M., Dohmae, N., Takami, M., Kitagawa, M., Futamura, Y., Imoto, M., Osada, H. The identification of an osteoclastogenesis inhibitor through the inhibition of glyoxalase I. (2008) (査読有) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105 (33), pp. 11691-11696.
- ⑩ 高見正道「破骨細胞分化の制御機構」(2011) (査読有) *生化学* 83 (2) pp. 110-114.
- ⑪ Jimi, E., Takami, M., Hiraga, T., Nakamura, I., Urade, M., Miyamoto, Y. The light and dark side of bisphosphonates. (2009) (査読有) *Journal of Oral Biosciences*, 51 (4), pp. 177-187.
- ⑫ 高見正道「Toll-like receptor による破骨細胞の分化制御」(2008) (査読無) *口腔組織培養学会誌*, 17:27-33.
- [学会発表] (計 20 件)
- ① 高見正道, 望月文子, 舘 慶太, 山田 篤, 宮本洋一, 本田義知, 馬場一美, 井上富雄, 中村雅典, 穴田貴久, 鈴木 治, 上條竜太郎 : Octacalcium phosphate (OCP) による破骨細胞の分化誘導機序. 昭和大学歯学部ハイテク・リサーチ・センター平成 21 年度研究成果発表会, 東京, 2010 年 3 月
- ② 高見正道, 望月文子, 舘 慶太, 宮本阿礼, 佐藤 華, 岡本正人, 新谷 悟, 井上富雄, 馬場一美, 上條竜太郎 : 扁平上皮癌細胞、破骨細胞およびその前駆細胞に発現する Toll-like receptor の種類とその機能. 昭和大学歯学部口腔癌包括的研究センター平成 21 年度公開シンポジウム, 東京, 2010 年 3 月
- ③ 高見正道 : BMP の骨形成誘導を促進す

る因子の同定と骨欠損修復への応用. 昭和大学共同研究 平成 21 年度研究成果発表会, 東京, 2010 年 3 月

④ Takami M.: (ワークショップ) Regulation of bone homeostasis by interferon regulatory factor 8 (IRF-8). 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月

⑤ Takami M.: (講演) Vitamin D and innate immune system: roles of dendritic cells in autoimmune diseases including psoriasis. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Fukuoka, Japan, December 2009

⑥ Takami M., Zhao B, Yamada A, Wang X, Koga T, Hu X, Tamura T, Ozato K, Choi Y, Ivashkiv LB, Takayanagi H., Kamijo R.: Interferon regulatory factor 8 modulates bone homeostasis by suppressing osteoclast formation. 第 26 回内藤コンファレンス, 徳島, 2009 年 11 月

⑦ Tachi K, Takami M., Sato H, Miyamoto A, Mochizuki A, Zhao B, Inoue T, Shintani S, Nakamura M, Baba K, Kamijo R.: TGF-BETA strongly enhances BMP-2-induced ectopic bone formation. American Society for Bone & Mineral Research 31st Annual Meeting, Denver Colorado, USA, September 2009

⑧ 高見正道, 趙 宝紅, 山田 篤, Wang X, 古賀貴子, Hu X, 田村智彦, Ozato K, Choi Y, Ivashkiv L, 高柳 広, 上條竜太郎: 転写因子 IRF-8 による骨恒常性の調節. 昭和大学歯学部ハイテク・リサーチ・センター平成 20 年度

研究成果発表会, 東京, 2009 年 3 月

⑨ 高見正道: (シンポジウム) 破骨細胞に対するビスホスホネートの作用機序. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会 サテライトシンポジウム, 東京, 2008 年 9 月

⑩ 高見正道: (シンポジウム) Interferon regulatory factor 8 (IRF8)による破骨細胞分化の調節. 第 29 回日本炎症・再生医学会, 東京, 2008 年 7 月

⑪ 高見正道: (講演) 破骨細胞分化の分子メカニズム -細胞に見る免疫と骨代謝の接点-. 第 28 回昭和歯学会総会, 東京, 2008 年 6 月

⑫ 高見正道: (講演) 破骨細胞分化における転写因子 IRF8 の役割. 第 7 回松本ボーンフォーラム, 松本, 2008 年 5 月

[図書] (計 1 件)

① Takahashi, N., Udagawa, N., Kobayashi, Y., Takami, M., Suda, T. Cells of Bone: Osteoclast Generation. (2008) *Principles of Bone Biology, Third Edition* (共著): Academic Press, 173-190.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

昭和大学歯学部口腔生化学ホームページ
<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高見 正道 (TAKAMI MASAMICHI)
昭和大学・歯学部・講師
研究者番号：80307058

(2) 研究分担者

上條 竜太郎 (KAMIJO RYUTARO)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号：70233939

(2) 研究分担者

高柳 広 (TAKAYANAGI HIROSHI)
東京医科歯科大学・医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号：20334229

(3) 連携研究者

田村 智彦 (TAMURA TOMOHIKO)
横浜市立大学・医学部・教授
研究者番号：50285144

(3) 連携研究者

山田 篤 (YAMADA ATSUSHI)
昭和大学・歯学部・講師
研究者番号：50407558