

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 4 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592606

研究課題名（和文） 破骨細胞形成作用制御に関わる SHIP の解析

研究課題名（英文） Analysis of SHIP related to osteoclastogenesis

研究代表者

吉松 昌子 (YOSHIMATSU MASAKO)

長崎大学・病院・助教

研究者番号：20420630

研究成果の概要（和文）：

SHIP は発見当初免疫系に関する因子として紹介されたが、近年 M-CSF と RANKL で誘導される破骨細胞前駆細胞の増殖において負に制御していることが報告された。本研究では TNF- α の誘導する破骨細胞形成における SHIP の効果について検討した。SHIP^{+/+} と SHIP^{-/-} マウスの骨髄細胞を M-CSF と TNF- α 存在下で培養し破骨細胞形成様相を比較した。TRAP 陽性細胞数は SHIP^{+/+} マウスと比較して SHIP^{-/-} マウスの方が有意に増加した。このことから SHIP は TNF- α の誘導する破骨細胞前駆細胞の増殖を負に制御している可能性があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

SH2-containing inositol-5'-phosphatase (SHIP), which is related to immunoreaction, has been reported to negatively regulate the proliferation of osteoclast precursors induced by macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and ligand for receptor activator of nuclear factor kappa B (RANKL). In this study, we investigated the effects of SHIP on TNF- α -induced osteoclastogenesis. Bone marrow cells from SHIP^{+/+} and SHIP^{-/-} mice were cultured with M-CSF and TNF- α . The number of TRAP-positive cells was significantly increased in SHIP^{-/-} cells compared with SHIP^{+/+} cells. These results suggest that SHIP may negatively regulate the proliferation of osteoclast precursors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：SHIP、TNF- α 、破骨細胞、矯正歯科

1. 研究開始当初の背景

SHIP は発見当初、免疫系に関する因子として紹介された (Liu et al., Semin. Immunol. 1997)。近年、免疫系のシグナルが骨代謝に関与していることがわかってきており、その SHIP が、破骨細胞形成と骨吸収能を負に制御しているという研究が Takeshita らによって報告された (Takeshita et al., Nat. Med. 2002)。SHIP^{-/-}マウスにおいて、破骨細胞が増加し、重篤な骨粗しょう症となった。また、マウスの関節炎モデルにおいて、SHIP が骨破壊の抑制に貢献しているとの報告もある (Zhou et al., J. Immunol. 2006)。我々がこれまで研究を続けてきた TNF- α は、炎症性の骨吸収に重要な働きをしていることから、SHIP が TNF- α の関わる破骨細胞分化、増殖、骨吸収機能過程に関わりがあるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

矯正治療は、骨の吸収と添加という生体反応を利用して行われる。骨の吸収における破骨細胞の形成や活性、増殖、生存維持には、RANKL や M-CSF、TNF- α 、その他多くのサイトカインが関わっていることが知られている。また、サイトカインが受容体を介して細胞内にシグナルを伝達するにはさらに様々な因子が関わっている。その中で、近年注目されている SHIP は、破骨細胞形成に関して負の作用を示しながら、生体の骨量維持のために重要な役割を果たしているという。しかしながらその作用はいまだ不明な点が多い。本研究の目的は、SHIP と我々がこれまで研究を進めてきた TNF- α の関わる破骨細胞形成との関わりを解明することである。

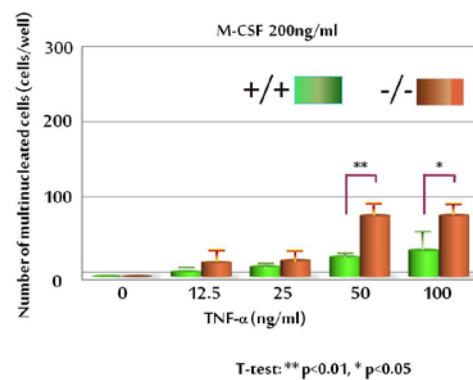
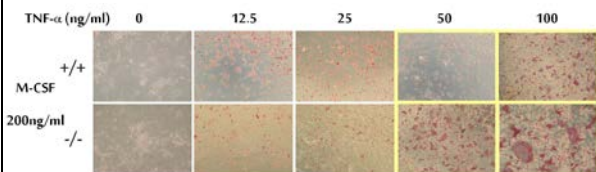
3. 研究の方法

- ① SHIP^{+/+}と SHIP^{-/-}マウスの骨髄細胞培養により破骨細胞形成を行う方法で、SHIP の有無による形成、骨吸収能の相違を比較検討する。
- ② マウスの大腿骨、頭蓋縫合部において SHIP の有無による破骨細胞形成の様相を比較検討する。
- ③ 矯正学的歯の移動における SHIP の役割を検討する。
- ④ マウスの骨髄細胞培養により、SHIP のかわかる TNF- α の細胞内シグナル伝達に関与する因子をスクリーニングし、SHIP の標的分子を探索する。

4. 研究成果

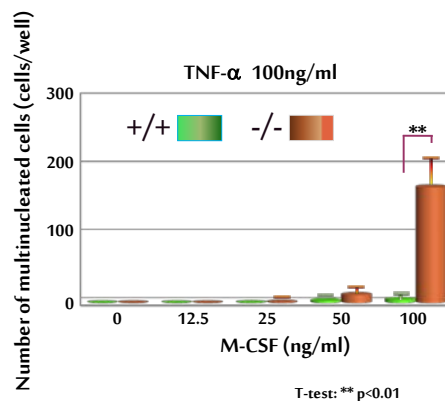
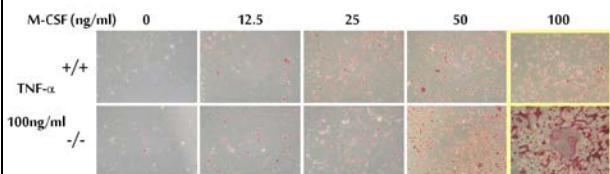
(1) マウス骨髄細胞に M-CSF 200 ng/ml と様々な濃度の TNF- α を添加して 4 日間培養し破骨細胞形成様相を比較

TNF- α を 50 または 100 ng/ml 添加した時、SHIP^{-/-}マウスの破骨細胞数は SHIP^{+/+}と比較して有意に増加した。



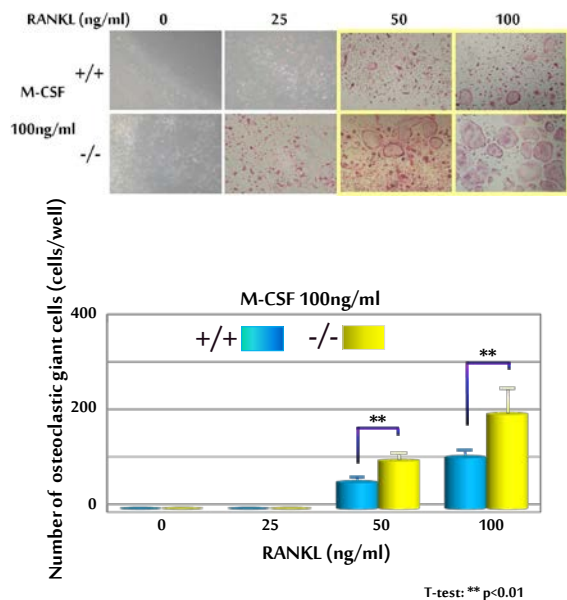
(2) マウス骨髄細胞に TNF- α 100 ng/ml と様々な濃度の M-CSF を添加して 4 日間培養し破骨細胞形成様相を比較

M-CSF を 100 ng/ml 添加した時、SHIP^{-/-}マウスの破骨細胞形成量は SHIP^{+/+}と比較して有意に増加した。



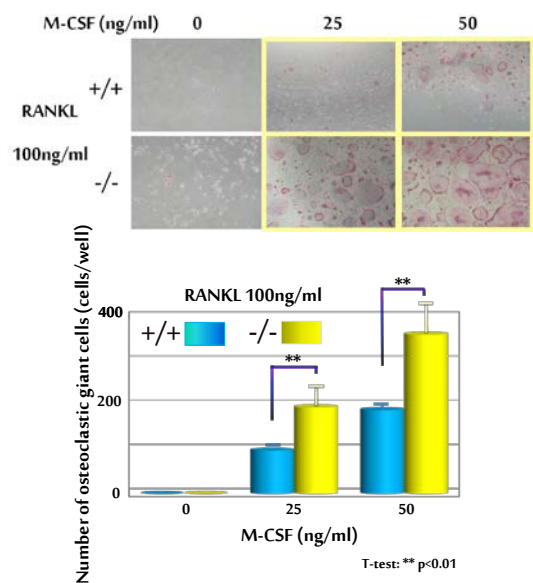
(3) マウス骨髄細胞に M-CSF 100 ng/ml と様々な濃度の RANKL を添加して 4 日間培養し破骨細胞形成様相を比較

RANKL を 50 または 100 ng/ml 添加した時、SHIP^{-/-}マウスの破骨細胞形成量は SHIP^{+/+}と比較して有意に増加した。



(4) マウス骨髄細胞に RANKL 100 ng/ml と様々な濃度の M-CSF を添加して 4 日間培養し破骨細胞形成様相を比較

M-CSF を 25 または 50 ng/ml 添加した時、SHIP^{-/-}マウスの破骨細胞形成量は SHIP^{+/+}と比較して有意に増加した。



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 14 件)

① Yoshimatsu M, Kitaura H, Fujimura Y, Eguchi T, Kohara H, Morita Y, Yoshida N: IL-12 inhibits TNF-alpha induced osteoclastogenesis via a T cell-independent mechanism in vivo. *Bone*. 45 (5) : 1010 - 1016 (2009)

② Fujimura Y, Kitaura H, Yoshimatsu M, Eguchi T, Kohara H, Morita Y, Yoshida N: Influence of bisphosphonates on orthodontic tooth movement in mice. *Eur J Orthod*. 31 (6) : 572 - 577 (2009)

③ Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Eguchi T, Kohara H, Jang I, Morita Y, Yoshida N: An M-CSF receptor c-Fms antibody inhibits mechanical stress-induced root resorption during orthodontic tooth movement in mice. *Angle Orthod*. 79 (5) : 835 - 841 (2009)

④ Gonzales C, Hotokezaka H, Arai Y, Ninomiya T, Tominaga J, Jang I, Hotokezaka Y, Tanaka M, Yoshida N: An in vivo 3D micro-CT evaluation of tooth movement after the application of different force magnitudes in rat molar. *Angle Orthod*. 79 (4) : 703 - 714 (2009)

⑤ Gonzales C, Hotokezaka H, Matsuo KI, Shibazaki T, Yozgatian J, Darendeliler MA, Yoshida N: Effects of steroidal and nonsteroidal drugs on tooth movement and root resorption in the rat molar. *Angle Orthod*. 79 (4) : 715 - 726 (2009)

⑥ Shibazaki T, Yozgatian JH, Zeredo JL, Gonzales C, Hotokezaka H, Koga Y, Yoshida N: Effect of celecoxib on emotional stress and pain-related behaviors evoked by experimental tooth movement in the rat. *Angle Orthod*. 79 (6) : 1169 - 1174 (2009)

⑦ Morita Y, Kitaura H, Yoshimatsu M, Fujimura Y, Kohara H, Eguchi T, Yoshida N: IL-18 inhibits TNF-alpha-induced osteoclastogenesis possibly via a T cell-independent mechanism in synergy with IL-12 in vivo. *Calcif Tissue Int*. 86 (3) : 242 - 248 (2010)

⑧ Gonzales C, Hotokezaka H, Darendeliler MA, Yoshida N: Repair of root resorption 2 to 16 weeks after the application of continuous forces on maxillary first molars in rats: a 2- and 3-dimensional quantitative evaluation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 137 (4) : 477 - 485

(2010)

⑨ Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Kohara H, Morita Y, Aonuma T, Fukumoto E, Masuyama R, Yoshida N, Takano-Yamamoto T: IL-12- and IL-18-mediated, nitric oxide-induced apoptosis in TNF- α -mediated osteoclastogenesis of bone marrow cells. *Calcif Tissue Int.* 89(1) : 65 - 73 (2011)

⑩ Kohara H, Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Morita Y, Eguchi T, Masuyama R, Yoshida N: IFN- γ directly inhibits TNF- α -induced osteoclastogenesis in vitro and in vivo and induces apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions. *Immunol Lett.* 30 (137) : 53 - 61 (2011)

⑪ Sirisootorn I, Hotokezaka H, Hashimoto M, Gonzales C, Luppanapornlarp S, Darendeliler MA, Yoshida N: Tooth movement and root resorption; The effect of ovariectomy on orthodontic force application in rats. *Angle Orthod.* 81 (4) : 570 - 577 (2011)

⑫ Gonzales C, Hotokezaka H, Karadeniz EI, Miyazaki T, Kobayashi E, Darendeliler MA, Yoshida N: Effects of fluoride intake on orthodontic tooth movement and orthodontically induced root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 139 (2) : 196 - 205 (2011)

⑬ Yoshimatsu M, Kitaura H, Fujimura Y, Kohara H, Morita Y, Eguchi T, Yoshida N: Inhibitory effects of IL-12 on experimental tooth movement and root resorption in mice. *Arch Oral Biol.* 57(1) : 36-43 (2012)

⑭ Kimura K, Kitaura H, Fujii T, Hakami ZW, Takano-Yamamoto T: Anti-c-Fms antibody inhibits lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis in vivo. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 64 (2) : 219 - 227 (2012)

〔学会発表〕(計 16 件)

① Yoshimatsu M, Kitaura H, Fujimura Y, Kohara H, Morita Y, Eguchi T, Takano-Yamamoto T, Yoshida N: IL-12 inhibits TNF- α mediated osteoclastogenesis via a T cell-independent mechanism in vivo. Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. (20090911-20090915). Denver, USA

② Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Kohara H, Morita Y, Eguchi T, Yoshida N, Takano-Yamamoto T: IL-12- and IL-18-mediated nitric oxide induces apoptosis in TNF- α -induced

osteoclastogenesis of bone marrow cells. Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. (20090911-20090915). Denver, USA

③ Fujimura Y, Kitaura H, Yoshimatsu M, Kohara H, Morita Y, Eguchi T, Takano-Yamamoto T, Yoshida N: Effect of bisphosphonates on orthodontic tooth movement in mice. Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. (20090911-20090915). Denver, USA

④ Morita Y, Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Kohara H, Eguchi T, Takano-Yamamoto T, Yoshida N: IL-18 inhibits TNF- α -induced osteoclastogenesis in synergy with IL-12 in vivo. Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. (20090911-20090915). Denver, USA

⑤ Kohara H, Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Morita Y, Eguchi T, Takano-Yamamoto T, Yoshida N: IFN- γ -mediated nitric oxide inhibits proliferation of M-CSF-dependent bone marrow macrophages. Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. (20090911-20090915). Denver, USA

⑥ 北浦英樹、山本照子: 炎症性サイトカインであるTNF- α による破骨細胞形成に対するTh1 サイトカインの作用について. 第6回東北大学バイオサイエンスシンポジウムおよび第14回学際ライフサイエンスシンポジウム.(20090616). 仙台

⑦ 北浦英樹、藤村裕治、吉松昌子、小原悠、森田幸子、江口俊子、吉田教明、山本照子: TNF- α による破骨細胞形成に対してのT細胞のかかわりについての検討. 第68回日本矯正歯科学会大会.(20091116-20091118). 福岡

⑧ 森田幸子、北浦英樹、吉松昌子、藤村裕治、小原悠、江口俊子、吉田教明: IL-18による矯正学的歯の移動と歯根吸収の及ぼす影響について. 第68回日本矯正歯科学会大会.(20091116-20091118). 福岡

⑨ 吉松昌子、北浦英樹、藤村裕治、小原悠、森田幸子、江口俊子、吉田教明: IL-12の破骨細胞形成抑制作用におけるT細胞の関与について. 第68回日本矯正歯科学会大会.(20091116-20091118). 福岡

⑩ 小原悠、北浦英樹、吉松昌子、藤村裕治、森田幸子、江口俊子、吉田教明: IFN- γ 誘導性のNOによるM-CSF依存性破骨細胞前駆細胞の増殖抑制効果. 第68回日本矯正歯科学会

大会. (20091116-20091118). 福岡

⑪吉松昌子、北浦英樹、藤村裕治、小原悠、森田幸子、江口俊子、吉田教明：矯正学的歯の移動時におけるIL-12の作用について. 第69回日本矯正歯科学会大会. (20100927-20100929). 横浜

⑫小原悠、北浦英樹、吉松昌子、藤村裕治、森田幸子、江口俊子、吉田教明：矯正学的歯の移動に対するIFN- γ の発現およびその影響. 第69回日本矯正歯科学会大会. (20100927-20100929). 横浜

⑬森田幸子、北浦英樹、吉松昌子、藤村裕治、小原悠、江口俊子、吉田教明：IL-18のTNF- α 誘導破骨細胞形成抑制作用におけるT細胞の関与の検討. 第69回日本矯正歯科学会大会. (20100927-20100929). 横浜

⑭Kohara H, Kitaura H, Yoshimatsu M, Fujimura Y, Morita Y, Eguchi T, Yoshida N: Effects of IFN- γ on tooth movement. Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society. (20111017-20111020). Nagoya, Japan

⑮Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Kohara H, Morita Y, Aonuma T, Fukumoto E, Yoshida N, Takano-Yamamoto T: IL-12- and IL-18-mediated nitric oxide induced apoptosis in TNF- α -mediated osteoclastogenesis. Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society. (20111017-20111020). Nagoya, Japan

⑯Yoshimatsu M, Kitaura H, Fujimura Y, Kohara H, Morita Y, Eguchi T, Yoshida N: Effects of SHIP on TNF-alpha-induced osteoclastogenesis. Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society. (20111017-20111020). Nagoya, Japan

[その他]

ホームページ等

<http://ortho.dh.nagasaki-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉松 昌子 (MASAKO YOSHIMATSU)

長崎大学・病院・助教

研究者番号：20420630

(2) 研究分担者

北浦 英樹 (HIDEKI KITAURA)

東北大学・病院・講師

研究者番号：60295087

吉田 教明 (NORIAKI YOSHIDA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40230750

(3) 連携研究者

藤村 裕治 (YUJI FUJIMURA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70448504