

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791561

研究課題名(和文) Blimp1によるIL-1の抑制制御を介した炎症と成長の恒常性制御

研究課題名(英文) Regulation of development and inflammation through regulating IL-1 expression by Blimp1

研究代表者

佐藤 結子 (Sato, Yuiko)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：70445443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：骨量は骨を吸収する破骨細胞と骨を形成する骨芽細胞との絶妙なバランスの上に規定されている。申請者はこれまでにBlimp1が破骨細胞において、その分化を促進すること、また破骨細胞特異的Blimp1欠損マウスでは、著しい破骨細胞の形成不全と骨量の増加を来すことを見いだした。また、血球系以外でBlimp1を欠失させると、著しく骨量が低下すること、また全身的に炎症が起こること等を見いだしている。

研究成果の概要(英文)：Bone volume is tightly controlled in a delicate balance between bone resorbing osteoclasts and bone forming osteoblasts. This applicant demonstrated that Blimp1 was required to promote osteoclast differentiation, and osteoclast specific Blimp1 conditional knockout mice exhibited significant inhibition of osteoclastogenesis accompanied with significant elevation of bone mass. This applicant also found that conditional inactivation of Blimp1 in cells other than blood cells resulted in significant reduction of bone mass and inflammatory phenotypes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨

### 1. 研究開始当初の背景

炎症の発動は、感染等の何らかの誘発因子の刺激により必要に応じて誘導され、その誘発因子の消退とともに炎症も消失すると考えられてきた。申請者は間葉系細胞に広く Cre を発現する Sox9 Cre マウスと、申請者らが破骨細胞分化に必須の役割を担うことを見いだしていた B Lymphocyte Induced Maturation Protein 1 (Blimp1) の flox マウスとの交配により作製した Blimp1 cKO マウスでは、全身的な皮膚の炎症や成長障害を来すことを見いだした。当初は、前述のごとく Blimp1 が破骨細胞で分化に必須の役割を有することを見いだしたことから、間葉系細胞側における Blimp1 の機能を解析することを検討していたが、思わぬ表現型の発見により方向を転換し、Blimp1 による炎症と成長の恒常性制御機構を解明することとした。また、今回作製した Sox9 Cre/Blimp1 cKO は、特に炎症の誘発因子を必要とすること無く炎症を発症すること、また、その際に血中の IL-1 のレベルが上昇することも見いだしており、間葉系細胞において Blimp1 は恒常的に IL-1 の発現を抑制することで、炎症を抑制することを見いだした。

### 2. 研究の目的

間葉系細胞において Blimp1 が IL-1 を恒常的に抑制することで、炎症の抑制と正常な成長に寄与することを証明することを目的とする。Sox9 Cre の発現範囲が広いため、どの細胞において Blimp1 が IL-1 の発現を抑制しているのか、それは直接的な抑制なのか、また IL-1 の発現誘導により直接成長も障害されるのか、という点についても解明したいと考えた。

### 3. 研究の方法

Sox9 Cre/Blimp1 cKO における炎症所見を、血清での各種炎症性サイトカイン濃度の解析や、皮膚などの各組織の組織解析から、また炎症系細胞の増勢の有無についてはフローサイトメトリー等を用いて解析する。また、成長障害については、Sox9 Cre/Blimp1 cKO の成長板軟骨の構成や配列を組織的に解析するとともに、BrdU の取り込み解析による増殖軟骨層における増殖活性の解析、またサフランin O あるいはアルシアンブルー染色により軟骨基質蛋白であるプロテオグリカンの産生について評価を行う。Blimp1 による IL-1 の発現制御機構の解析については、Sox9 Cre/Blimp1 cKO およびコントロールマウスから、間葉系に属する細胞あるいは組織を採取し、Blimp1、Sox9 ならびに IL-1 の発現を解析する。IL-1 の発現がコントロールマウスに比べて Sox9 Cre/Blimp1 cKO において有意に高い組織を同定し、転写抑制因子である Blimp1 が同組織において直接 IL-1 の発現を抑制しているかを、クロマチン免疫沈降法にて解析する。

Sox9 Cre/Blimp1 cKO の表現型が IL-1 の発現亢進によって説明し得るのかを Sox9 Cre/Blimp1 cKO を IL-1 欠損マウスと交配することで Sox9 Cre/Blimp1 cKO・IL-1 欠損マウスを作製し、Sox9 Cre/Blimp1 cKO にみられる表現型の回復が得られるかを解析する。

以上の解析により Blimp1 による IL-1 の持続的な抑制を介した炎症と成長制御について解明する。

### 4. 研究成果

炎症の解析では、Sox9 Cre/Blimp1 cKO では末梢血中の白血球数の増加があり、脾腫を認めること、血清レベルでは IL-1 レベルの上昇があること、また皮膚組織において組織の菲薄化等の炎症所見を認めることを見いだした。

組織別の IL-1 の発現解析では、炎症所見の顕著な皮膚組織において IL-1 の発現が Sox9 Cre/Blimp1 cKO においてコントロールより有意に高いことを見いだした。IL-1 の転写調節領域には Blimp1 のコンセンサスバインディングサイトを見いだしたことから、皮膚由来細胞株を用いて、抗 Blimp1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法を実施したところ、Blimp1 の IL-1 の転写調節領域へのリクルートを認めた。

成長障害については、成長軟骨の障害を認め、全身的な IL-1 レベルの上昇による軟骨細胞障害の可能性を考えた。

そこで、Sox9 Cre/Blimp1 cKO を IL-1 欠損マウスと交配し、Sox9 Cre/Blimp1 cKO・IL-1 欠損マウスの作製に取りかかったところ、感染事故にみまわれ、マウスのクリーンアップを余儀なくされ、現在仕切り直しの交配を始めているところである。本マウスの解析により、炎症性サイトカインの抑制的な制御機構の存在と、その正常な成長への貢献という新たな発見が期待されると考えている。また、Blimp1 はこれまでに我々が報告した破骨細胞分化と骨量制御のほか、B 細胞や T 細胞における分化制御、また生殖細胞分化への機能が報告されているが、炎症と成長制御という新たな機能を有することを証明できる可能性があると考えている。

### 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. Miyauchi Y, Sato Y, Kobayashi T, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Miyamoto K, Tando T, Morioka H, Matsumoto M, Chambon P, Johnson RS, Kato S, Toyama Y, Miyamoto

- T. HIF1 is required for osteoclast activation by estrogen deficiency in postmenopausal osteoporosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Oct 8;110(41):16568-73. 査読あり. doi: 10.1073/pnas.1308755110.
2. Miyamoto H, Katsuyama E, Miyauchi Y, Hoshi H, Miyamoto K, Sato Y, Kobayashi T, Iwasaki R, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Fujie A, Hao W, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T. An essential role for STAT6-STAT1 protein signaling in promoting macrophage cell-cell fusion. *J Biol Chem*. 2012 Sep 21;287(39):32479-84. 査読あり. doi: 10.1074/jbc.M112.358226.
3. Hoshi H, Hao W, Fujita Y, Funayama A, Miyauchi Y, Hashimoto K, Miyamoto K, Iwasaki R, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto H, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Kitagawa K, Nakayama KI, Kawamoto T, Sano M, Fukuda K, Ohsawa I, Ohta S, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Miyamoto T. Aldehyde-stress resulting from Aldh2 mutation promotes osteoporosis due to impaired osteoblastogenesis. *J Bone Miner Res*. 2012 Sep;27(9):2015-23. 査読あり. doi: 10.1002/jbmr.1634.
4. Miyauchi Y, Miyamoto H, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Hoshi H, Miyamoto K, Sato Y, Kobayashi T, Akiyama H, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T. Conditional inactivation of Blimp1 in adult mice promotes increased bone mass. *J Biol Chem*. 2012 Aug 17;287(34):28508-17. 査読あり. doi: 10.1074/jbc.M112.356634.
5. Miyamoto H, Suzuki T, Miyauchi Y, Iwasaki R, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Hoshi H, Hashimoto K, Yoshida S, Hao W, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Takeya M, Toyama Y, Miyamoto T. Osteoclast stimulatory transmembrane protein and dendritic cell-specific transmembrane protein cooperatively modulate cell-cell fusion to form osteoclasts and foreign body giant cells. *J Bone Miner Res*. 2012 Jun;27(6):1289-97. 査読あり. doi: 10.1002/jbmr.1575.
6. Yoshida S, Iwasaki R, Kawana H, Miyauchi Y, Hoshi H, Miyamoto H, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Nakagawa T, Miyamoto T. PDGFBB promotes PDGFR -positive cell migration into artificial bone in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 May 18;421(4):785-9. 査読あり. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.084.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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〕

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

佐藤 結子 (SATO YUIKO)  
慶應義塾大学・医学部・研究員  
研究者番号：70445443