

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792297

研究課題名(和文) 転写因子 IRF - 4 による骨リモデリング制御機構の解明

研究課題名(英文) The analysis of the bone remodeling control mechanism by transcription factor IRF-4

研究代表者

小原 悠 (KOHARA, Haruka)

長崎大学・大学病院・医員

研究者番号：70623825

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)：IFNは転写因子IRFsによって誘導され、このIFN-IRF系は主に免疫分野で注目・検討されている因子である。IRFsは感染症・炎症性疾患・癌化の制御等への関与が報告されているのだが、IRFs の一つIRF-8が破骨細胞形成抑制性に働くことが報告された。本研究では、破骨細胞形成におけるIRF-4の効果について検討した。マウス骨髄細胞をRANKL(またはTNF- $\alpha$ )存在下で培養し破骨細胞を形成したところNFATc1・IRF-4のmRNA発現量は共に有意に増加した。破骨細胞分化初期に発現するNFATc1と共にIRF-4の発現増加を認めることから、IRF-4が破骨細胞形成に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Interferon (IFN) is induced by interferon regulatory factors (IRFs) which act as a transcription factor. This factor is related to immunoreactions. Recently IRF-8, which is one of the IRFs, 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 IRF-4 on RANKL- (or TNF-alpha-) induced osteoclastogenesis. Bone marrow cells from mice were cultured with M-CSF and RANKL. During osteoclastogenesis, the expression level of NFATc1 and IRF-4 mRNA were increased significantly. Moreover, the same dynamic state was shown also in osteoclastogenesis under M-CSF and TNF-alpha existence. These results suggest that IRF-4 may involve the regulation of osteoclast precursors.

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：歯学

## 1. 研究開始当初の背景

骨代謝に変調をきたす病気として骨粗鬆症や大理石病、骨 Paget 病などがある。骨の恒常性は骨吸収と骨形成のバランスで保たれており、バランスが崩れることでこれら疾病が生じる。すなわち、このメカニズムを解明すれば代謝性骨疾患の治療法開発に役立つと期待される。

骨吸収はマクロファージに由来する破骨細胞によって引き起こされ、RANKL や TNF- $\alpha$  によって誘導される。誘導調節は様々なサイトカインによって行われるが TNF- $\alpha$  誘導による破骨細胞形成が IFN (interferon) - $\gamma$  によって抑制されることを確認している (Kohara et al, Immunol Lett. 2011)。

IFN は転写因子 IRF によって誘導され、この IFN-IRF 系は主に免疫分野で注目・検討されている因子である。IRFs は感染症・炎症性疾患・癌化の制御等への関与が報告されているのだが、先だって IRFs の一つ IRF-8 が破骨細胞形成抑制性に働くことが報告された。一方、IRF-4 は多発性骨髄腫に関係していると報告された。

IRF-4 は T 細胞、B 細胞、マクロファージおよび樹状細胞などの免疫担当細胞に限局して発現する興味深い因子である。破骨細胞はマクロファージに由来し、また多発性骨髄腫は臨床的に骨症状を有することから、IRF-4 が破骨細胞に対し何らかの作用を示していることが疑われるも報告はない。

## 2. 研究の目的

IRF-4 と骨代謝機構の相関・制御機構を明らかにすることを最終目的とする。本研究では骨代謝、特に破骨細胞の分化・成熟に対して IRF-4 の与える影響の検討を行うこととした。

まず破骨細胞分化時の IRF-4 発現動態を *in vitro* にて確認する。その後 IRF-4 をノックアウトしたマウスにて *in vivo* での動態を確認する予定である。

## 3. 研究の方法

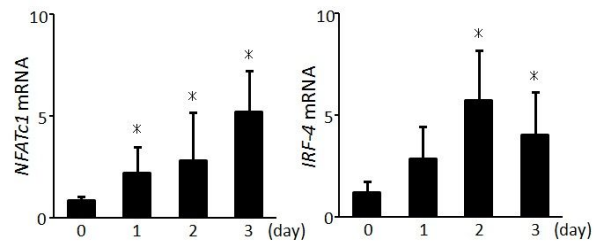
マウス (C57BL/6) の骨髄培養から破骨細胞形成を行う方法で IRF-4 の発現動態を確認する。骨髄細胞は M-CSF 100ng/ml 存在下で 3 日間培養したのちに付着細胞を回収し、さらに 3 日間培養した細胞を破骨細胞前駆細胞として使用した。

IRF-4 遺伝子をノックアウトしたマウスを樹立し野生型マウスと表現系を比較検討する。

## 4. 研究成果

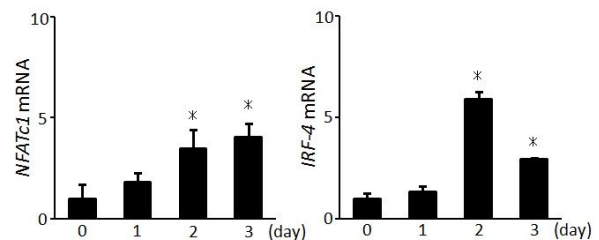
(1) マウスの破骨細胞前駆細胞を M-CSF 100ng/ml および RANKL 100ng/ml 存在下で 3 日間培養し破骨細胞形成を行った。経時的に細胞を回収し real time RT-PCR にて mRNA の発現を確認した。

*NFATc1* の mRNA 発現量は有意に増加し、*IRF-4* も有意な発現量の上昇を認めた。



(2) M-CSF 100ng/ml および TNF- $\alpha$  100ng/ml 存在下で培養することで破骨細胞形成を行い、同様の実験を行った。

TNF- $\alpha$  刺激でも *NFATc1*、*IRF-4* の mRNA 発現量は有意に増加し RANKL 刺激同様の動態を示した。



(3) IRF-4 ノックアウトマウスが実験に使用できる段階にないため *in vivo* の検討事項が確認できていない。 *in vitro* にて差を認めていることからサンプル回収し次第継続して検討を行っていく予定である。

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4件)

Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Sugisawa H, Kohara H, Yoshimatsu M, Takano-Yamamoto T.  
Effect of cytokines on osteoclast formation and bone resorption during mechanical force loading of the periodontal membrane  
The Scientific World Journal.  
2014:1-7(2014)  
査読 [有]

Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Kohara H, Yoshimatsu M, Takano-Yamamoto T.  
Immunological reaction in TNF- $\alpha$ -mediated osteoclast formation and bone resorption *in vitro* and *in vivo*  
Clinical and Developmental Immunology.  
2013:1-8(2013)  
査読 [有]

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  
Archives of Oral Biology.  
57(1):36-43(2012)  
査読 [有]

Kohara H, Kitaura H, Yoshimatsu M, Fujimura Y, Morita Y, Eguchi T, Yoshida N.  
Inhibitory Effect of Interferon- $\gamma$  on Experimental Tooth Movement in Mice  
Journal of Interferon & Cytokine Research.  
32(9):426-431(2012)  
査読 [有]

〔学会発表〕(計5件)

小原悠, 増山律子  
小腸上皮 ATP 文会系によるカルシウム吸収調節機序の検討.  
第32回日本骨代謝学会学術集会.(2014年7月24日~26日). 大阪

小原悠, 北浦英樹, 吉松昌子, 藤村裕治, 森田幸子, 吉田教明

矯正学的歯の移動時における歯根吸収に対する IFN- $\gamma$  の影響.  
第72回日本矯正歯科学会大会.(2013年10月7日~9日). 松本

Kohara H, Kitaura H, Yoshimatsu M, Fujimura Y, Morita Y, Eguchi T, Yoshida N.  
IFN- $\gamma$  inhibits mechanical stress-induced osteoclastogenesis and bone resorption.  
Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. (2012年10月12日~15日), Minneapolis, MN, USA

小原悠, 北浦英樹, 吉松昌子, 藤村裕治, 森田幸子, 吉田教明  
メカニカルストレスに対する歯根周囲組織における IFN- $\gamma$  の影響.  
第71回日本矯正歯科学会大会.(2012年9月26日~28日). 盛岡

小原悠, 北浦英樹, 吉松昌子, 森田幸子, 藤村裕治  
メカニカルストレスに対する IFN- $\gamma$  の発現およびその影響.  
第30回日本骨代謝学会学術集会.(2012年7月19日~21日). 新宿

〔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〕  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小原 悠 ( KOHARA HARUKA )

長崎大学・病院・医員

研究者番号：70623825