

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870674

研究課題名(和文) IRF-8による破骨細胞の抑制機構とメカニカルストレスの関係

研究課題名(英文) Relationship of the suppression mechanism in osteoclasts by IRF-8 and the mechanical stress

研究代表者

長谷川 紘也 (HASEGAWA, HIROYA)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：00635899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨代謝において骨吸収を担う破骨細胞に対し、歯列矯正のようなメカニカルストレスを付与した際に、メカニカルストレスが直接的に破骨細胞に対し影響を及ぼしているかを検討した。その結果、破骨前駆細胞様細胞RAW264.7細胞に一過性のメカニカルストレスを付与するとIRF-8のmRNAが減少しNFATc1のmRNAが増加した。しかし、時間が経過すると分化の負の因子であるIRF-8が増加することで一過性のメカニカルストレスでは分化は促進しないことが分かった。しかし、持続的なメカニカルストレスが付与されると細胞質中にNFATc1が増加すると考えられ、分化が亢進しやすくなることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, found possibility the osteoclasts responsible for bone resorption in bone metabolism is increase osteoclast differentiation by mechanical stress such as orthodontics. Osteoclast precursor cell-like cells 'RAW264.7 cells' was decreased IRF-8mRNA by transiently of mechanical stress and increased NFATc1mRNA. However, After applying transiently mechanical stresses, Increased by IRF-8 with time was suppressed osteoclast differentiation. If continuous mechanical stress is applied is considered to NFATc1 in the cytoplasm increases, suggesting that differentiation is easily was enhanced.

研究分野：歯科矯正学分野

キーワード：破骨細胞 メカニカルストレス IRF-8 NFATc1

1. 研究開始当初の背景

骨代謝において、骨吸収を担う破骨細胞の過度な活性化や分化は骨粗鬆症やリウマチ等の疾患を悪化させる。近年、転写因子 Interferon regulatory factor 8 (IRF-8) が破骨細胞分化に必須の Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic1 (NFATc1) の発現と機能を負に抑制することが Zhao B. ら (Zhao B, Takami M, et al. Nat Med, 2009) によって報告され、IRF-8 が破骨細胞分化を抑制する機能を担っていることが示唆されている。

私は臍臓より精製クローニングされた分子量約 28kDa のプロテアーゼで、血清カルシウム降下作用をもつカルデクリンを用いて、破骨細胞の分化と成熟破骨細胞の骨吸収を抑制することを報告 (Hasegawa H, et al. J Biol Chem, 2010, Tomomura M, Hasegawa H, et al. J Biol Chem, 2012) してきた。カルデクリンは破骨細胞分化および成熟破骨細胞の機能亢進を RANKL 刺激から生じるシグナル伝達の一部を阻害することで骨吸収を抑制する可能性が示唆されている。

RANKL から生じる正のシグナル伝達系については多くの研究がされており、そのメカニズムも年々詳細に分かりつつある。近年、RANKL 刺激により抑制される負のシグナル伝達系についても解析が進んできているが、正と負のシグナル伝達系の相関についてはほとんど研究がされていない。IRF-8 とカルデクリンはともに破骨細胞分化を抑制するタンパク質ではあるが、その作用機序は全く異なっている。破骨細胞分化のシグナル伝達系には RANK - NFATc1 シグナル伝達系に代表される正のシグナル伝達と RANK- IRF-8 シグナル伝達系に代表される負のシグナル伝達系の 2 つのシグナル伝達系が存在する。Zhao B. らは RANKL により IRF-8 の活性が弱まると報告 (Zhao B, et al. J Exp Med, 2012) しているが、正のシグナル伝達系と負のシグナル伝達系の関連性は不明である。破骨細胞分化を制御するうえで、正と負のシグナル伝達系バランスを解明することは重要なことであると考えられる。

また、矯正治療時にはワイヤーやエラストックチェーンで歯に力をかけて歯の移動を促している。歯の移動には歯槽骨のリモデリングが亢進することで歯の移動が達成される。このようにメカニカルストレスが付与された環境下では破骨細胞にはどのような影響があるのかは不明である。そこで、メカニカルストレスが付与された時の破骨細胞分化に対する影響を、IRF-8 および NFATc1 の変化を検討し、破骨細胞分化を抑制する IRF-8 とメカニカルストレスの関係を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、破骨細胞の分化を負に制御する IRF-8 と破骨細胞分化のマスター因子であ

る NFATc1 に着目し、メカニカルストレスによる破骨細胞の分化に対する影響について IRF-8 および NFATc1 の変化を観察することで明らかにすることを目的にした。

3. 研究の方法

(1) メカニカルストレスによる IRF-8 および NFATc1 の変化について :

免疫染色を行い、IRF-8 および NFATc1 を可視化し比較した。また RT-PCR およびリアルタイム PCR で IRF-8 mRNA および NFATc1 mRNA の変化を検討した。

(2) メカニカルストレスの付与による破骨細胞関連因子への影響 :

リアルタイム PCR で破骨細胞関連因子のカテプシン K、DC-STAMP、TRAP、OSCAR、MMP9 の mRNA の変化を検討した。

(3) メカニカルストレスの力の大きさによる IRF-8 および NFATc1 への影響 :

付与するメカニカルストレスを数 ~ 10 倍程度に増加して IRF-8 mRNA および NFATc1 mRNA を比較した。

実験に用いた細胞はマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を用いた。遠心後、8、24 時間で細胞を回収し、IRF-8、NFATc1 およびカテプシン K の mRNA 発現量を RT-PCR およびリアルタイム PCR で比較検討した。

4. 研究成果

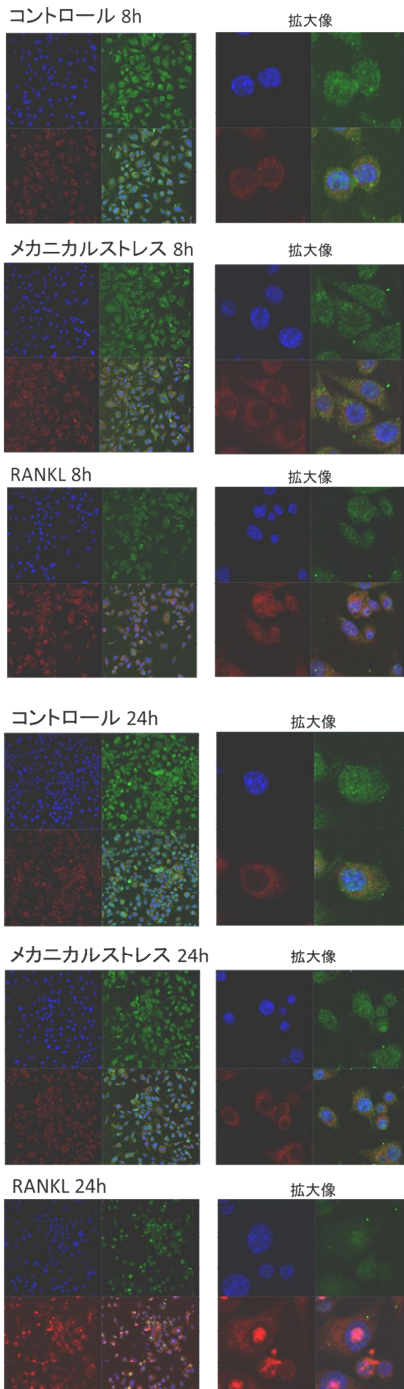
(1) メカニカルストレスの付与方法

メカニカルストレスは、計画当初はスライドチャンバー (日本ジェネティクス社製) に注射筒をシリコンチューブでつなぎ、水圧によって付与する予定であった。しかし、プラスチック製のため、圧をかけるとチャンバーにたわみが生じた。また、注射筒を接続し、培養液で満たしたため、二酸化炭素濃度を一定に保つことも出来ず、細胞の培養に苦慮した。そこで、別な方法を模索し、ペリスタポンプによるシェアストレス等を検討した結果、遠心機による遠心圧を利用することが本研究においては最適であると考えられた。遠心圧は回転数を調整し歯の移動の際に最適矯正力とされる $10\text{g}/\text{cm}^2$ になるように調整した。

(2) メカニカルストレスによる IRF-8 および NFATc1 の変化について

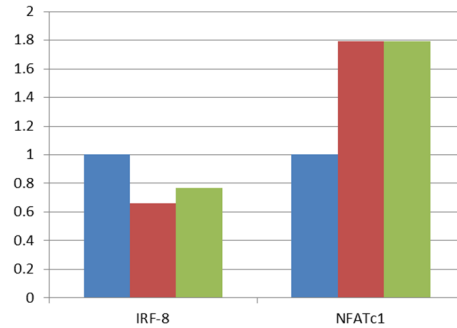
RAW264.7 細胞にメカニカルストレスを付与後、8 時間および 24 時間後に固定し、IRF-8 および NFATc1 の特異的抗体を用いて免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM5 Exciter) を用いて観察した。コントロール群では、8 時間・24 時間ともに IRF-8 が細胞質中に均一に認められ、NFATc1 はほとんど確認出来なかった。一方、RANKL 添加群は 8 時間で IRF-8 の減少および NFATc1 の増加が認められた。

24 時間後にはさらにその傾向が強くなり、NFATc1 の著明な増加を認めた。メカニカルストレス群では、8 時間後には IRF-8 は減少したが 24 時間経過後には IRF-8 はコントロールとほぼ同程度まで増加が認められ、NFATc1 もコントロールとほぼ同程度まで減少した。RT-PCR、リアルタイム PCR でもメカニカルストレスを付与すると、8 時間後には IRF-8 の mRNA は減少し、NFATc1 の mRNA の増加が認められたが、24 時間経過後には IRF-8 の mRNA はコントロールとほぼ同程度まで増加が認められ、NFATc1 の mRNA は減少した。



(図) 免疫染色結果
(上段・左) 青：核
(上段・右) 緑：IRF-8

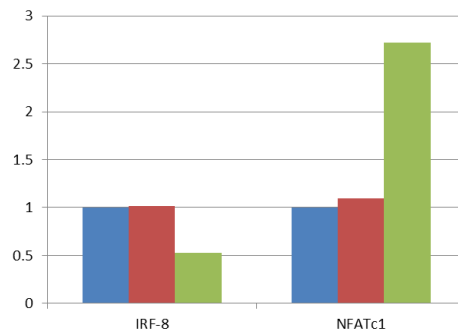
(下段・左) 赤：NFATc1
(下段・右) 重ね合わせ



(表 1) メカニカルストレスを付与後 8 時間でのリアルタイム PCR 結果

* グラフのバーの解説 (以下、共通)

- (青) コントロール群...「培養液のみで培養を継続した群、RANKL 非添加、メカニカルストレスは付与していない」
- (赤) メカニカルストレス付与群...「メカニカルストレス付与後、培養液のみで培養を継続した群、RANKL は非添加」
- (緑) RANKL 添加群...「再度培養を始める際に RANKL を添加して培養を継続した群、メカニカルストレスは付与していない」



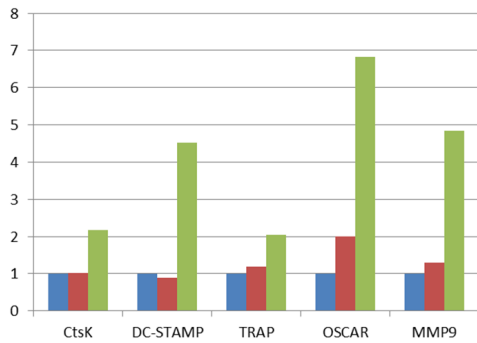
(表 2) メカニカルストレスを付与後 24 時間でのリアルタイム PCR 結果

(3) メカニカルストレスの付与による破骨細胞関連因子への影響

RANKL を添加すると破骨細胞分化は促進する。そのため、破骨細胞関連因子においても RANKL 非添加群に比べ 8 時間後ではカテプシン K、DC-STAMP がわずかに上昇しているものの MMP9 以外にほとんど大きな変化は認められなかったが、24 時間後では、RANKL 非添加群に比べ DC-STAMP で 4 倍以上、OSCAR では 6 倍以上の増加を認めた。

しかし、メカニカルストレス群では 8 時間後、24 時間後ともに大きな変化を認めず、破骨細胞分化には影響しないことが示された。

このことから、一過性のメカニカルストレスでは、時間経過に伴って IRF-8 が増加することで破骨細胞分化が抑制されていると推察される。

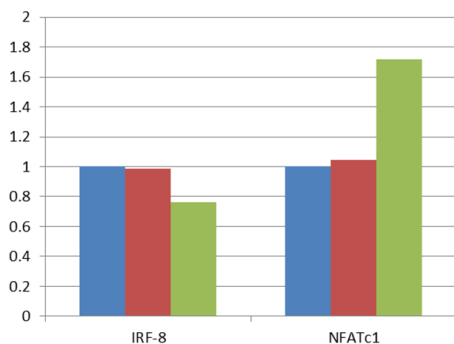


(表3)メカニカルストレスを付与後24時間でのリアルタイムPCR結果

(4) メカニカルストレスの力の大きさによる IRF-8 および NFATc1 への影響

付与するメカニカルストレスの大きさによって IRF-8 の減少および NFATc1 の増加に変化がみられるかを検討した。

そこで、10g/cm²の10倍である100g/cm²を付与し、IRF-8 および NFATc1 の変化を検討した。その結果、予想に反し大きな違いは認められず、破骨細胞は「メカニカルストレス付与の有無」には反応するものの、力の大きさはほとんど関係がないと考えられた。



(表4)10倍のメカニカルストレスを付与後24時間でのリアルタイムPCR結果

以上より、破骨前駆細胞では一過性のメカニカルストレスによって IRF-8 は減少し NFATc1 が増加した。しかし、時間経過とともに分化の負の因子である IRF-8 が増加し分化は促進されなかった。

そのため持続的なメカニカルストレスが付与されることで細胞質中の IRF-8 が減少し細胞質中に NFATc1 が増加することで、NFATc1 の核内移行が行われやすい環境が生まれると考えられ、持続的なメカニカルストレスによって破骨細胞は分化が促進しやすくなることが示唆された。

<引用文献>

Zhao B, Takami M, et al. Nat Med ,2009
 Hasegawa H, et al. J Biol Chem ,2010 ,
 Tomomura M, Hasegawa H, et al. J Biol Chem ,2012

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1件)

田中恵理, 真野樹子, 松本美樹, 長谷川 紘也, 瀬川千花子, 品川玲, 富田至保, 箕田碧, 奥結香, 重松久夫, 坂下英明, 須田直人. Platelet-rich-plasma (PRP) を用いた片側性唇顎口蓋裂児における顎裂部二次骨移植の術後評価. Orthodontic Waves, 査読有, 41, 111-120, 2015

[学会発表](計6件)

東金由莉, 能勢なつみ, 長谷川 紘也, 須田直人. 精神遅滞を伴う歌舞伎症候群の矯正治療例. 第74回日本矯正歯科学会. 2015年11月18-20日, 福岡市

友村明人, 長谷川 紘也, 田村暢章, 須田直人, 友村美根子. 血清カルシウム効果因子カルデクリンは RANKL による細胞膜ラフと画分の Fyn の活性化を抑制して破骨細胞の分化を抑制する. 第87回日本生化学会大会, 2014年10月15-18日, 京都

長谷川 紘也, 須田直人, 友村明人. 成熟破骨細胞の細胞内骨格に対するカルデクリンの影響. 第56回歯科基礎医学学会学術大会・総会. 2014年9月25-27日, 福岡市

長谷川 紘也. 成熟破骨細胞の細胞内骨格構築に対するカルデクリンの影響. 明海歯科医学会第23回学術大会. 2014年6月5日, 坂戸市

長谷川 紘也, 友村美根子, 友村明人, 須田直人. バイオイメージングによる破骨細胞のシグナル解析. 第72回日本矯正歯科学会. 2013年10月7-9日, 松本市

Tomomura A, Hasegawa H, Suda N, Sakagami H, Tomomura M. Serum Calcium-decreasing Factor, Caldecrin, Inhibits RANKL-Formation in Mature Osteoclasts via Suppression of the Src Signaling Pathway. 35th Annual Meeting The American Society for Bone and Mineral Research, 2013年10月4-7日, Minneapolis, USA

[図書](計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

なし

取得状況（計 0 件）

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 紘也 (HASEGAWA, Hiroya)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：00635899

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし