

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861797

研究課題名(和文)免疫制御に働く転写因子IRF4ノックアウトマウスを用いた骨リモデリング機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of bone remodeling mechanism using transcription factor IRF4 knockout mouse acting on immune regulation

研究代表者

小原 悠 (KOHARA, Haruka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・特任研究員

研究者番号：70623825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：IFN-IRF系は主に免疫分野で注目・検討されている因子であり、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。その中で、IRFs の一つIRF8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IRF4の効果について検討した。マウス骨髄細胞をRANKL(またはTNF- α)存在下で培養し破骨細胞を形成したところNFATc1・IRF4のmRNA発現量は共に有意に増加した。この傾向は破骨細胞前駆細胞に対しても同様に認められた。破骨細胞分化初期に発現するNFATc1と共にIRF4の増加を認めることから、IRF4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 - interferon regulatory factors (IRFs) system 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. This tendency was similarly observed for bone marrow macrophages. These results suggest that IRF-4 may involve the regulation of osteoclastogenesis.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯学

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症や大理石病、骨 Paget 病など骨の代謝に変調をきたすことによってもたらされる病気がある。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、均衡が崩れることで上記疾病が生じることから、このメカニズムが解明されると代謝性骨疾患の治療法開発に寄与することが期待できる。

マクロファージに由来する破骨細胞によって骨の吸収は引き起こされる。誘導調節は RANKL 等の様々なサイトカインによって行われるが TNF- α 誘導による破骨細胞形成が IFN (interferon) - γ 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 によって誘導される。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。さて、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中で、先だって IRFs の一つである IRF-8 が破骨細胞形成に対して抑制的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の報告がある。

IRF-4 は T 細胞、B 細胞およびマクロファージ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 が骨代謝機構に与える影響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・成熟に対する IRF-4 の作用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* で確認する予定である。

3. 研究の方法

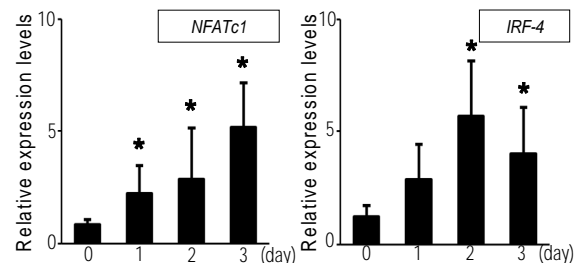
C57BL/6 マウス(8週、雄性)より採取した骨髄細胞から破骨細胞を分化させる上で IRF-4 の発現動態を *in vitro* にて確認する。骨髄細胞は採取後3日間 M-CSF 存在下で培養したのちに付着細胞を回収。さらに3日間培養した上で得られた付着細胞を破骨細胞前駆細胞として使用した。破骨細胞分化誘導に用いる因子は RANKL または TNF- α とした。

in vivo で解析を行うために IRF-4 遺伝子をノックアウトしたマウスを樹立。骨の表現型を野生型マウスと比較する。

4. 研究成果

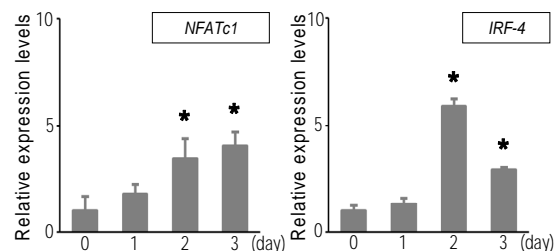
(1) マウスより得られた破骨細胞前駆細胞を M-CSF 100ng/ml および RANKL 100ng/ml 存在下で3日間培養することで破骨細胞形成を行った。形成過程において経時的に細胞を回収し real time RT-PCR にて mRNA の発現を確認した。

分化が進むに伴い *NFATc1* の mRNA 発現量は有意に増加している。それに伴って *IRF-4* も有意な発現量の上昇を認めた。



(2) 破骨細胞前駆細胞を M-CSF 100ng/ml および TNF- α 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- α 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こと。また RAW 細胞に対する遺伝子導入も芳しい状況でないため検討が進んでいない状態である。
in vitro にて差を認めていることからサンプル回収し次第、追加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 3 件)

Yoshimi T, Koga Y, Nakamura A, Fujishita A, Kohara H, Moriuchi E, Yoshimi K, Tsai CY, Yoshida N.

Mechanism of motor coordination of masseter and temporalis muscles for increased masticatory efficiency in mice.

J Oral Rehabil. 44(5):363-374(2017)

doi: 10.1111/joor.12491.

査読 [有]

Yoshimatsu M, Kitaura H, Fujimura Y, Kohara H, Morita Y, Yoshida N.

IL-12 Inhibits Lipopolysaccharide Stimulated Osteoclastogenesis in Mice.

J Immunol Res. 2015:214878(2015)

doi: 10.1155/2015/214878.

査読 [有]

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.

Scientific World Journal. 2014:617032(2014)

doi: 10.1155/2014/617032.

査読 [有]

〔学会発表〕(計 1 件)

小原悠, 増山律子

小腸上皮 ATP 分解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).

大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

〔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

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小原 悠 (KOHARA, Haruka)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学
系) ・特任研究員
研究者番号 : 70623825

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし