

Table 2 Questionnaire regarding practical training

時間数	実施学年	実習方法	担当診療科
1.		歯科麻酔に関する医療面接	
2.		麻酔管理計画 (対診書作成含む)	
3.		バイタルサインの測定 (モニタリング機器の取り扱いを含む)	
4.		注射法	
5.		一次救命処置	
6.		二次救命処置	
		1) 二次救命処置	
		2) 器具を用いた気道確保法	
7.		浸潤麻酔	
8.		伝達麻酔	
9.		モニタリングによる全身管理	
10.		精神鎮静法	
		1) 笑気吸入鎮静法	
		2) 静脈内鎮静法	
11.		全身麻酔法	
12.		その他	

2. 実習

1. 実習時間と実習方法 (Fig. 3, Table 3)

1) 総実習時間

実習時間の平均は 36.6 ± 24.6 時間 (12~120 時間) であった。大学によって大きな差がみられた。

2) 歯科麻酔に関する医療面接

実習時間の平均は 68.1 ± 86.4 分 (0~320 分) であった。1校が320分と突出して多かった。実習を行っている大学は18校で見学実習が13校と最も多く、その他に座学実習、相互実習、シミュレーション実習などを行っていた。

3) 麻酔管理計画 (対診書作成含む)

実習時間の平均は 106.2 ± 163.8 分 (0~900 分) であった。実習を行っていない大学が7校あった。15時間ほどかけている大学が1校あったが、実症例の計画立案と発表が行われていた。

4) バイタルサインの測定 (モニタリング機器の取り扱いを含む)

実習時間の平均は 159.7 ± 98.8 分 (60~420 分) で、すべての大学で行われていた。実習形式は学生相互実習が主体で4年生、5年生と2学年にわたり行っている大学が12校あった。3つの学年で行われている大学は2校であった。

5) 注射法

実習時間の平均は 93.4 ± 84.5 分 (0~360 分) であった。実施していない大学が7校あった。実習形式では相互実習 (10校) とシミュレーション実習 (9校) が多かつ

た。実習内容として、筋肉注射、静脈路確保、アレルギー検査法などがあった。

6) 一次救命処置

実習時間の平均は 235.2 ± 111.4 分 (60~510 分) で、すべての大学で行われていた。実習形式はすべてシミュレーション実習で、4年生と5年生など2学年にわたり行っている大学が14校と最も多かった。3つの学年にわたって行っている大学が4校あった。

7) 二次救命処置 (ICLS, ACLS)

実習時間の平均は 52.2 ± 106.4 分 (0~540 分) であった。実施していない大学が16校あった。実施していた13大学において6大学がシミュレーション実習、7大学が座学実習であった。シミュレーション実習ではマネキンとPCによるシミュレーターの使用やビデオ供覧が行われていた。

8) 器具を用いた気道確保法

実習時間の平均は 74.5 ± 55.6 分 (0~180 分) であった。実施していない大学が7校あった。方法としてはシミュレーション実習が行われていた。

9) 浸潤麻酔

実習時間の平均は 152.5 ± 169.7 分 (30~900 分) であった。相互実習が20校と最も多かった。シミュレーション実習を行った後、自験や相互実習を行っている大学もあった。自験は口腔外科や他科で抜歯などの歯科治療の実習の際に行われていた。

10) 伝達麻酔

実習時間の平均は 125.2 ± 160.3 分 (0~900 分) であつ

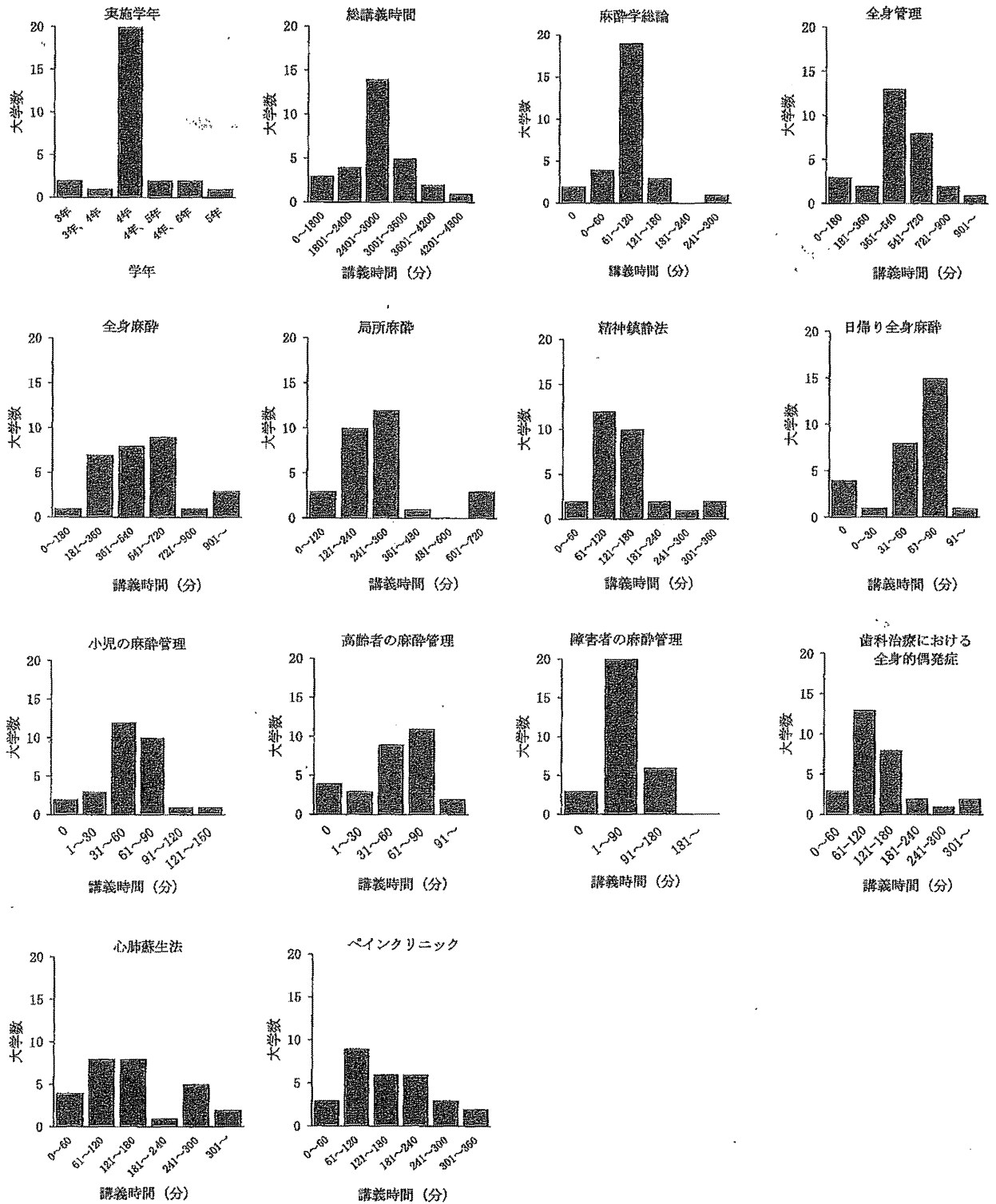


Fig. 1 Results of questionnaire regarding lectures

た、相互実習を行っている大学が14校と約半数を占めた。相互実習を行っていない大学ではシミュレーション実習や実際の症例見学が行われていた。シミュレーション

実習を行った後、自験や相互実習を行っている大学もあった。自験は口腔外科や他科で抜歯などの歯科治療の実習の際に行われていた。

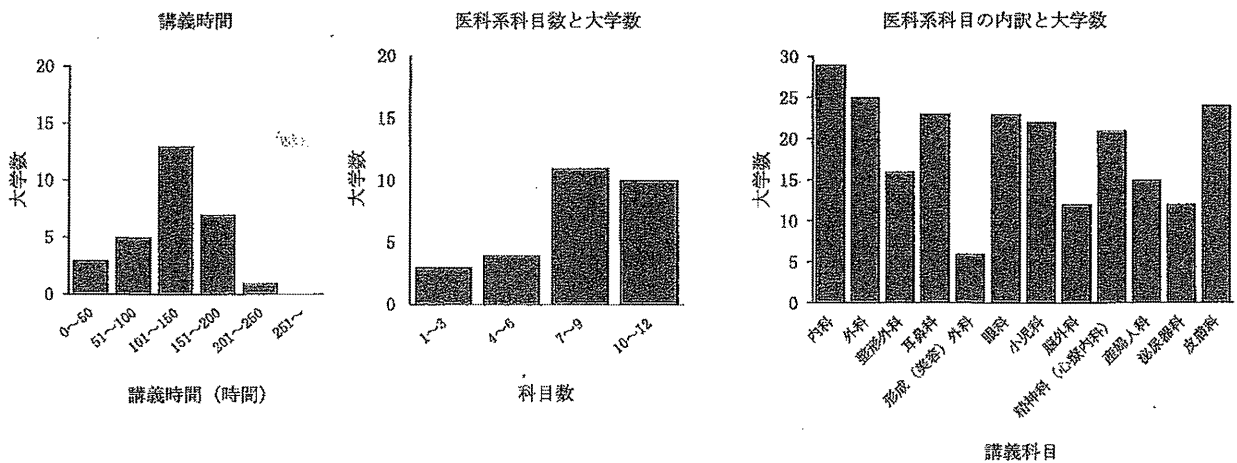


Fig. 2 Results of questionnaire regarding lectures on medical department

11) モニタリングによる全身管理

実習時間の平均は 143.8±176.0 分 (0~630 分) で、実施していない大学が 10 校あった。自験を行っている大学もあった。

12) 笑気吸入鎮静法

実習時間の平均は 119.8±101.6 分 (0~540 分) であった。学生相互実習を行っている大学が 22 校と多く、それ以外では見学実習が行われていた。

13) 静脈内鎮静法

実習時間の平均は 253.6±488.1 分 (0~2,700 分) であった。相互実習を行っている大学はなく、行っている大学では見学実習が多かった。

14) 全身麻酔法

実習時間の平均は 494.5±517.0 分 (60~2,400 分) で大学間に大きな差が認められた。ほとんどが見学実習であったが、1 校のみ症例がないときにシミュレーション実習が行われていた。マスク換気と喉頭展開のみではあるが自験を行っていた大学もあった。

15) その他

ペインクリニック見学や救急薬品解説などが行われていた。

16) 実施学年について

主に 4 年生と 5 年生の複数の学年で行われていたが、4 年生から 5 年生、5 年生から 6 年生の 2 学年にわたって行っている大学もあった。バイタルサインの測定、一次救命処置は複数の学年で行っている大学が多く、なかには 3 つの学年で行っている大学もあった。

17) 実習担当診療科

実習担当科はほとんど歯科麻酔科であったが、歯科麻酔科以外では浸潤麻酔や伝達麻酔は口腔外科や他の診療科で歯科治療の実習の際に行われていた。

IV. 考 察

歯科麻酔学教育については、歯科医学教育に必要な最小限度の内容と範囲を体系的に明示し、教育上の基準を定めた歯科医学教授要綱³⁾やその行動目標である歯学教育モデル・コア・カリキュラムなどに基づいて行われ、適宜改訂されている¹⁾。臨床研修の必修化、共用試験の開始により歯科医学教育だけでなく歯科麻酔学教育に関する環境は大きく変化してきている。共用試験は診療参加型実習の充実を図り、社会の求める優れた歯科医師を育成するために臨床実習開始前に行うもので、平成 18 年より開始されたが、大学による歯学教育に大きな影響を及ぼしている。臨床実習に関しては記憶主体の学習、見学型の臨床実習、基本的診療能力の不足、科目担当教員まかせの教育内容と学生評価などの問題点を解決し、一連の臨床の流れを一人の患者で経験できるような診療参加型実習を行うことが推奨されている。最近では文部科学省による「自験」の定義の再確認と臨床実習取り組み状況のフォローアップにより、より適切な臨床実習が行われるようになってきている⁴⁾。

大学にとどまらず、社会においても歯科医学を取り巻く環境は大きく変化してきている。患者の高齢化や生活習慣病の増加など社会情勢の変化を受け、歯科医療における全身管理の重要性が認識されるようになってきた。さらに平成 12 年の一次救命処置ガイドラインの改訂(ガイドライン 2000)以来、一次救命処置講習会に参加する歯科医師の増加や平成 20 年の歯科外来診療環境体制加算の制定⁵⁾なども安全な歯科医療に貢献している。これらの流れを受け大学の歯学教育、特に歯科麻酔学教育においても医療安全や全身管理が重要視されるようになってきた。

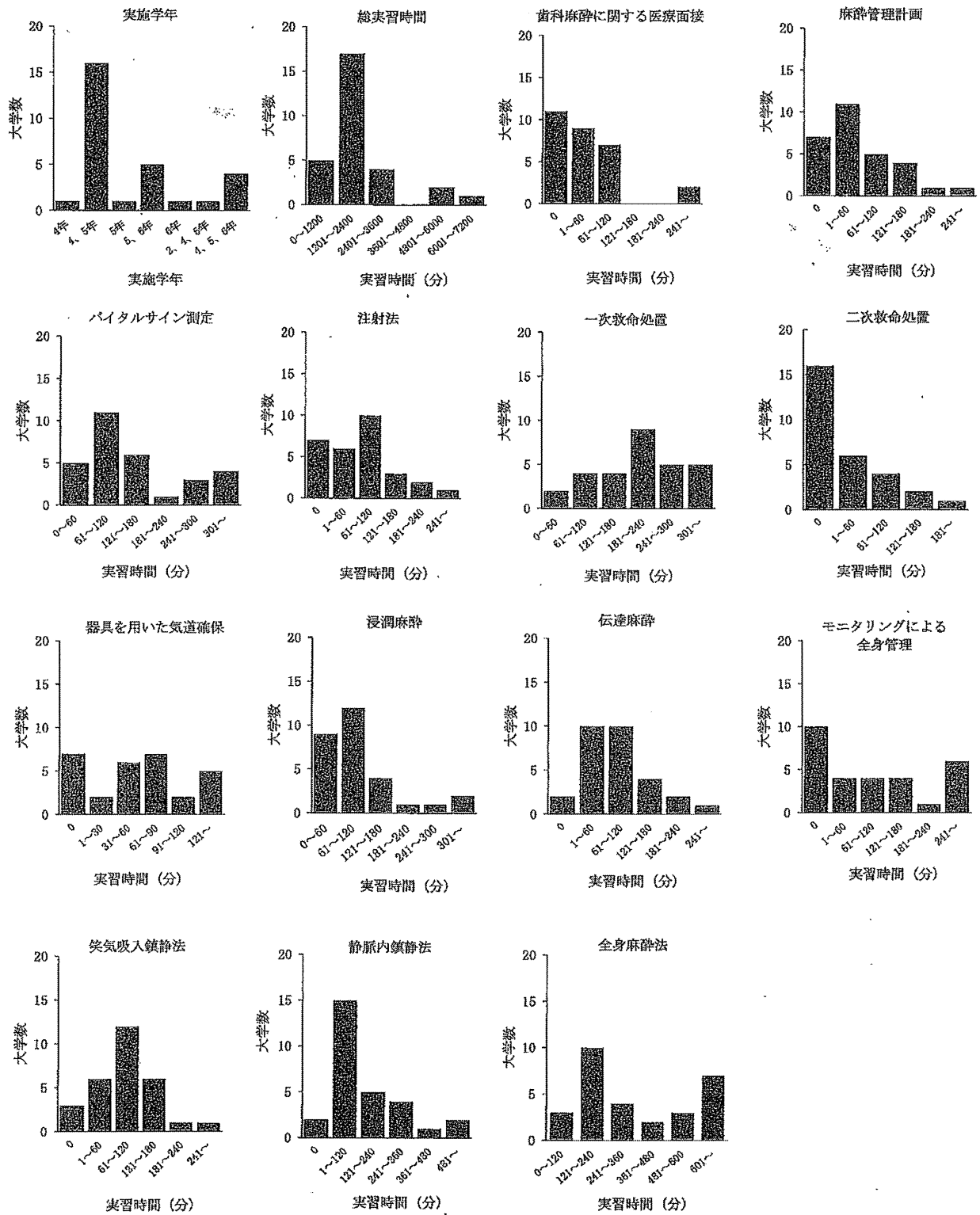


Fig. 3 Results of questionnaire regarding practical training

Table 3 Training methods used for practical training

実習項目	実習形式
歯科麻酔に関する医療面接 麻酔管理計画	見学, 座学, 相互, シミュレーション実習 シミュレーション実習
バイタルサインの測定	自験, 相互実習
注射法	相互実習, シミュレーション実習
一次救命処置	シミュレーション実習
二次救命処置	シミュレーション実習, 座学実習
器具を用いた気道確保法	シミュレーション実習
浸潤麻酔	自験, 相互実習, シミュレーション実習
伝達麻酔	相互実習, シミュレーション実習
モニタリングによる全身管理	見学
笑気吸入鎮静法	相互実習
静脈内鎮静法	見学
全身麻酔法	見学, シミュレーション実習
その他	相互実習, 見学

学生教育においては昭和59年の歯科麻酔学教授要綱に全身管理の項目が初めて記載され⁶⁾, それ以後, 歯科麻酔学教育において重要な項目となった。歯科医療においても全身管理の重要性については広く認識されるようになってきており, 全身管理が可能な歯科医師の養成には歯科麻酔学の卒前教育は不可欠となっている。また, 歯科医師の麻酔科研修や救急研修においても歯科麻酔学の卒前教育が十分に行われていることが前提になっている⁷⁾。

しかし, 前述したように全国の歯学部・歯科大学における歯科麻酔学の卒前教育に関する本格的な調査はこれまでに行われたことがなかった。今回, 日本歯科麻酔学会卒前教育ワーキンググループでアンケート形式での実態調査を行うことになり, 各大学の歯科麻酔学卒前教育担当者の協力を得て有用な知見を得ることができた。

講義に関しては項目では大学間に大きな差は認められず, コア・カリキュラムの項目はほとんど講義されていた。各大学で採用している歯科麻酔学の教科書は何種類かあり必ずしも同一ではないが, 項目に関してはどの教科書もほぼ同じであり, ほとんどの項目の講義が行われていた。ただ小児, 障害者, 高齢者の麻酔管理に関する講義を単独の項目として行っていない大学もあった。小児歯科, 障害者歯科, 高齢者歯科などで行われている, あるいは時間の関係で他の項目のなかで講義が行われているためと考えられる。講義時間に関しては大学間で顕著な差が認められた。歯科麻酔学の講義時間は各大学の教育方針や学部教育の時間をもとに決められていることも理由の一つと考えられる。歯科麻酔学教育と関係の深い医科系科目講義に関してはどの大学でも実施されていたが, 総時間数や実施科目には顕著な差が認められた。

医学部がある大学と単科大学で特にこのような差がみられていたが, 大学に所属する医師数や併設診療科の数が影響していると考えられる。モデル・コア・カリキュラムでは歯科医療に必要な医学的知識 (E-4-6) という項目があり, 「歯科医師に必要な全身疾患 (内科疾患) を理解する」という目標が定められている。最近の歯科医師国家試験では内科疾患など出題数が増加傾向にあるが, 内科疾患の知識は歯科医療にとっても必須であり, 今後も医科系科目の講義は増加していくと考えられる。

実習に関しても講義時間と同様に実習時間で大学間に大きな差が認められた。アンケートに示した実習項目はほとんどの大学で実施されていたが, 実習形式には差が認められた。大学や診療科の方針, 設備, 教員数, 臨床実習を受け入れる患者数などが大きく影響していると考えられる。臨床実習での歯科医療行為の条件として, 侵襲性のそれほど高くない, 一定のものに限られること, 患者らの同意を得て実施することが示されることなどが挙げられている⁷⁾。侵襲性のある項目では歯学教育モデル・コア・カリキュラムのなかで水準が示されており, 歯科麻酔学実習に関連する項目も水準1から水準4まで示されている⁸⁾。歯科麻酔学は専門性が高く, 特に実習に関しては水準の高い項目もあり, 学生の実習項目は制限されがちである。近年患者の権利の意識の高まり, 医の倫理や生命倫理的な配慮の必要性から臨床の場のみにとどまらず臨床実習においてもインフォームドコンセントを行って同意を得るようになってきており, 実習に影響を与えていると考えられる。今回の調査でも多くの大学ではモデル・コア・カリキュラムの水準に準拠して行っていたが, 実習形式には差があった。水準3の静脈内鎮静法や水準4の全身麻酔に関しては見学のみで, 気管挿

管はマネキンによる実習が行われていた。

浸潤麻酔に関しては、自験、相互実習、シミュレーション、見学など実習方式はさまざまであった。伝達麻酔は自験や相互実習を行っている大学は少なかったが、学生同士の相互実習における偶発症の問題があると考えられる。島田ら⁹⁾の報告によると、下顎孔伝達麻酔実習において、局所麻酔実習を行っていたのは28校中25校で、伝達麻酔実習と浸潤麻酔実習の両方行っていたのは16校、下顎孔伝達麻酔実習のみは2校であったという。また、そのなかで全身偶発症は20例、局所的偶発症は16例発症しており、実習の同意を得ていたのは3校であったという。今回は実習に関して同意を得ているかは調査していないが、同意書をとっている大学は以前より増加していると思われる。今後の検討項目である。伝達麻酔はモデル・コア・カリキュラムでは水準2であるが、偶発症の発症を避けるためにシミュレーション実習を行っている大学も多いと考えられる。局所麻酔は歯科麻酔だけでなく口腔外科系実習、保存修復実習、クラウンブリッジ実習でも実施できることが行動目標で挙げられている⁹⁾。そのため講義は歯科麻酔科で行われているのに実習は他科で実施されている大学もあり、講義と実習の連携の必要性があると考えられる。

一次救命処置とバイタルサインの測定は複数の学年で行っている大学が多かった。高石ら¹⁰⁾は歯学部学生と卒直後歯科医師に対して行った救急蘇生教育に対する調査で学年が進むにつれ知識が低下していくことを報告している。共用試験対策としても行われていると考えられるが、これらの基本的知識と技術は歯科医師にとって重要であり、複数の学年で実施されていることは望ましい状況と考えられる。

注射法では静脈穿刺は相互実習とシミュレーション実習いずれも実施していない大学が約1/3あったが、静脈穿刺は緊急時の対応でも重要であり、静脈穿刺ができない場合は治療法の選択も限られる。水準2であることを考えるともう少し実施してもよいのかもしれない。過去に実態調査が30年前に行われているが¹¹⁾、今後検討が必要と考えられる。全身麻酔に関しては水準4であり、ほとんど見学実習であったのは当然の結果といえる。医学部においては全身麻酔シミュレーターなどを学生教育に活用している大学もあり有用性が報告されている¹²⁾。しかし、高価であり普及は容易ではない。今回の調査において侵襲が大きい実習に関してはシミュレーション実習を行っている大学が多かった。文部科学省も一連の臨床の流れを一人の患者で経験することの必要性を重要視しているが、自験症例が十分に確保できない場合はシミュレーション実習を行うことを推奨しており、今後さらに増加していく可能性がある⁵⁾。患者の全身管理にあ

たっては、一般的な管理法だけでなく有病者や高齢者の管理法を経験することは重要である。しかし、学生実習で配当される患者はさまざまであり、健康な患者も多く、有病者や高齢者の症例を全員が経験することは困難である。これを解決するために大学によっては麻酔計画立案などのシミュレーション実習を行って効果を上げている大学もある¹³⁾。

モニタリングによる全身管理実習を行っていない大学が10校あったが、歯科麻酔科が担当せず担当診療科で行われる、あるいは実習時間の関係上省略されることが理由と考えられる。二次救命処置に関しても実習を行っているのは約半数で、実習を行っていてもその半数は座学実習であった。必須の目標でないため省略されることやシミュレーション機器が十分に設置されていないことなどが理由と考えられる。

歯科医療において歯科麻酔学は専門性が高く、卒後に歯科麻酔に関する教育を受ける機会は少ないため、歯科麻酔学の卒前教育はさらに重要性を増す。静脈内鎮静法に関しても学習や見学により有用性について理解が深まることで、将来の普及につながっていくことが期待できる。また、学生時代の医療安全に関する教育は卒後の医療安全の啓発にも有用である。

今回の調査では講義時間や実習時間、実習形式で大学間の差が大きかった。学生への講義や実習に関しては、文部科学省も大学それぞれの理念に基づく特色ある教育を推奨しており、講義や実習の時間数に差が生じるのは避けられない。しかし、歯科麻酔学の卒前教育は全身管理ができる有能な歯科医師の育成に必要な不可欠である。講義と実習に関して時間数、項目、実習方法の基準を作成し、歯科麻酔学教育の標準化を図る、あるいはミニマムリクワイアメントを作成する必要があると考えられた。

V. 結 語

現在、全国の歯学部・歯科大学で行われている歯科麻酔学の講義や実習の実態をある程度把握することができた。ほとんどの大学で必要な講義と実習が行われていたが、時間数や内容において大学間に差が認められた。今回の結果をもとに各大学で講義と実習の時間や内容について再検討する材料になれば幸いである。

大変ご多忙のなか、実態調査にご協力いただきました各大学の先生方に厚くお礼申し上げます。

本論文のすべての著者に開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 日本歯科医学教育学会白書作成委員会編集：歯科医学教育白書 2011年版 (2009~2011年), 日本歯科医学教育学会, 東京, 2012.
- 2) 金子 譲：歯科医師の麻酔科研修のガイドライン策定に関する研究, 平成 13 年度総括研究報告書, 2002, 1-21.
- 3) 歯科大学学長・歯学部長会議編集：平成 19 年改訂歯科医学教授要綱, 医歯薬出版, 東京, 2007, 60-80.
- 4) 高等教育局医学教育課：歯学教育の現状と課題 (平成 25 年度国立大学歯学部長・歯学部附属病院長会議), www.mext.go.jp/component/a_menu/.../1341471_13.pdf
- 5) 歯科外来診療環境体制加算の施設基準, 平成 20 年厚生労働省告示第 59 号.
- 6) 東理十三雄：歯科における全身管理の当為—歯科麻酔学の使命—, 日歯麻誌, 2005, 33(3), 349-356.
- 7) モデル・コア・カリキュラム改訂に関する連絡調整委員会およびモデル・コア・カリキュラム改訂に関する専門研究委員会編：歯学教育モデル・コア・カリキュラム—教育内容ガイドライン—, 平成 22 年度改訂版.
- 8) 平成 23 年度先導的の大学改革推進委託事業「医学・歯学教育の改善・充実に関する調査研究」歯学調査研究チーム編：歯学教育モデル・コア・カリキュラム—教育内容ガイドライン—, 平成 22 年度改訂版, 診療参加型臨床実習コア・カリキュラム事例集.
- 9) 島田利加子, 野口いづみ, 高野宏二, 笹尾真美, 関田俊介, 深山治久：下顎孔伝達麻酔実習のアンケート調査による検討, 日歯麻誌, 2005, 33(1), 95-99.
- 10) 高石和美, 富岡重正, 中條信義：歯学部学生と卒直後歯科医師に対する救急蘇生教育後の知識およびアンケート調査, 日歯麻誌, 2006, 34(1), 39-44.
- 11) 石橋 肇, 江川裕之, 吉村宅弘：注射法の歯学教育における現状 (第 1 報) アンケート調査から, 日歯麻誌, 1985, 13(1), 16-21.
- 12) 坂口嘉郎, 富永昌宗, 高橋成輔：医学生教育における高機能患者シミュレータの活用, 日臨麻会誌, 2004, 24(7), 322-326.
- 13) 瀬尾憲司, 照光 真, 田中 裕, 弦巻 立, 倉田行伸：歯学部登院前における麻酔計画立案実習の歯科麻酔学教育効果に関する考察, 日歯麻誌, 2012, 40(1), 31-35.

Questionnaire Survey Regarding Dental Anesthesiology Education for Undergraduates

Undergraduate Education Working Group of the Japanese Dental Society of Anesthesiology
 Shogo TANIGUCHI, Tatsuya ICHINOHE, Masahiko SHIMADA, Shigeharu JOH,
 Kazuna SUGIYAMA, Hitoshi NIWA, Takuya MIYAWAKI, Kazu-ichi YOSHIDA
 and Junichiro KOTANI (previous member)

Abstract

An Undergraduate Education Working Group of the Japanese Dental Society of Anesthesiology conducted a questionnaire survey regarding dental anesthesiology education in dentistry departments and dental universities throughout Japan. After an initial trial survey of the 8 universities to which the committee members belonged, the questionnaire was revised and then distributed to the persons in charge of dental anesthesiology education at 29 universities throughout Japan between May and August, 2013. The questionnaire was divided into 2 sections regarding practical training (13 items, including length of training, year of students, and training method) and lectures (12 items, including number of lectures and year of

students). Lectures on dental anesthesiology education were performed at all the universities, but the lecture times varied among the universities. Most of the lectures were delivered during the fourth year of university. Training in dental anesthesiology was also performed at all the universities, but the training times and the items and contents of the training varied widely among the universities. Most of the training sessions occurred during the fourth and fifth years of university. Simulation training was the most common practice method. The questionnaire results suggest that standardization of lecture times and contents as well as practices for both lectures and practical training should be considered.

Address correspondence to :

Shogo TANIGUCHI

Department of Dental Anesthesiology, Section of
 Diagnostic and General Care, Fukuoka Dental College,
 2-15-1, Tamura, Sawara-ku, Fukuoka 814-0193, Japan

評価に特化した組織である。米国以外には韓国の Korean Institute of Dental Education and Evaluation (KIDEE) がある。

認証評価を行う場合には、評価側、受審側にとっても同一の枠組みが必要であり、認証評価基準 accreditation standards と呼ばれる。認証評価の方法はほぼ類似している。すなわち、認証評価基準に従って、各プログラムが自己評価報告書を作成し、その内容を立証する根拠資料とともに認証評価組織に提出する。自己評価報告書に基づいて、外部評価者による視察が行われ、視察報告書(案)が作成され、各プログラムからの反応があった後に、認証結果が確定されて、公表されるというものである。

認証結果が及ぼす影響については、英国の場合、国家試験がなく、GDCに歯科医師として登録されるためには、GDCにより認証された歯科大学を卒業していることが必須である。仮にも認証が取り消された歯科大学が出た場合には影響は深刻である。米国の場合には歯科医師免許登録要件は各州政府が決めることになっているが、歯学教育、筆記試験、臨床試験の3要件があり、ほぼすべての州が歯学教育の要件として、CODAに認証されたプログラムを修了していることを挙げている。

以上のように歯科医学教育認証評価については、各国の歴史的背景や状況に応じて、それぞれの制度を発展・維持している。認証結果の影響力が大きいほど、それに割かれる時間やエネルギーは歯科大学側にとっても、認証評価実施組織にとっても大きなものとなる。

歯科医学教育認証評価トライアル修正版における 評価項目・基準・観点・視点の紹介

一戸達也

近年、教育の質の保証が強く求められ、2004年4月から国公立のすべての高等教育機関は7年以内に1度、文部科学大臣の認証を受けた評価機関による評価(認証評価)を受審することが義務づけられた。認証評価には機関別認証評価と専門分野別認証評価とがあり、後者は法科大学院などで実施されている。医歯薬学系でも、社会に有為な人材を輩出するという、アウトカム基盤型教育の観点から後者がより重要になっており、薬学教育評価機構は2013年度から薬学教育の専門分野別認証評価を本格実施している。

歯学領域では、現在、文部科学省の補助金により、東京医科歯科大学・新潟大学・九州歯科大学・大阪歯科大学・東京歯科大学の5校が幹事校となっており、2012年度から5年計画で歯学教育の専門分野別認証評価のトライアルが行われている。昨年度は、九州歯科大学と大阪歯科

表1 歯学教育認証評価項目(案) 平成27年度版

1. 教育の理念及び目標 (1)
2. 学生の受け入れ (2)
3. 歯学教育課程の内容・方法・環境 (4)
4. 患者への配慮と臨床能力の確保 (2)
5. 成績評価と卒業認定 (2)
6. 教員組織 (2)
7. 点検・評価 (2)

()内の数は各項目に含まれる評価基準の数を示す。

大学がトライアルとしての専門分野別認証評価を受審し、歯学教育認証評価制度などの実施に関する調査研究WGが立案した評価項目などによって自己点検評価書を作成して、それに基づいて実地調査を受けた。この経験と全国歯科大学・歯学部のご意見を踏まえてWGで評価項目などをブラッシュアップし、今年度は新潟大学と東京歯科大学がトライアルとしての認証評価を受審することになっている。

評価項目は、表1に示す7項目からなっている。括弧内の数字は含まれる評価基準の数を示す。各評価基準には具体的な観点と視点が記載され、これらに基づいて自己点検評価書を作成することになる。評価項目のうち、2はアドミッションポリシー、3と4はカリキュラムポリシー、5はディプロマポリシーを具現化した内容である。そして、歯学教育の特性から、カリキュラムポリシーのうち特に臨床実習に関連した部分を4として独立させている。なお、これらの評価項目などについては、「歯学教育認証制度等の実施に関する調査研究」のホームページ(<http://www.cermed.jp/index.html>)で公開されているので、参照していただきたい。

歯学教育の専門分野別認証評価とは、高いコンピテンシーをもった歯科医師を輩出するためのカリキュラムを大学が責任をもって構築し、そして実際にそのような人材が輩出されているのかどうかを、これらの評価項目に基づいて評価し、その教育カリキュラムを認証するということである。わが国の歯科医学教育が国民の目線でも国際的にも十分に信頼に足るものであることを保証するために、歯学教育認証評価制度のすみやかな確立が求められている。

認証評価トライアル(平成26年)実施状況について

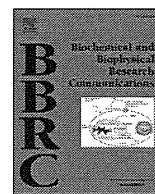
北村知昭

現在、平成24年度文部科学省大学改革推進事業の一環として、基礎臨床を両輪とした医学教育改革によるグローバルな医師養成プログラムのなかで「歯学教育認証評価制度等の実施に関する調査研究」が5年間の取り組



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

IL-33 inhibits RANKL-induced osteoclast formation through the regulation of Blimp-1 and IRF-8 expression



Hiroyasu Kiyomiya^{a, b}, Wataru Ariyoshi^a, Toshinori Okinaga^a, Takeshi Kaneuji^c,
Sho Mitsugi^b, Takuma Sakurai^{a, b}, Manabu Habu^b, Izumi Yoshioka^c,
Kazuhiro Tominaga^b, Tatsuji Nishihara^{a, *}

^a Division of Infections and Molecular Biology, Department of Health Promotion, Kyushu Dental University, 2-6-1 Manazuru, Kokurakita-ku, Kitakyushu, Fukuoka 803-8580, Japan

^b Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Science of Physical Functions, Kyushu Dental University, 2-6-1 Manazuru, Kokurakita-ku, Kitakyushu, Fukuoka 803-8580, Japan

^c Division of Oral Medicine, Department of Science of Physical Functions, Kyushu Dental University, 2-6-1 Manazuru, Kokurakita-ku, Kitakyushu, Fukuoka 803-8580, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 February 2015

Available online 18 March 2015

Keywords:

Osteoclastogenesis

IL-33

Blimp-1

IRF-8

ABSTRACT

Interleukin (IL)-33 is a recently discovered proinflammatory cytokine that belongs to the IL-1 family. Several studies have reported that IL-33 inhibits osteoclast differentiation. However, the mechanism of IL-33 regulation of osteoclastogenesis remains unclear. In the present study, we examined the effect of IL-33 on osteoclast formation *in vitro*. IL-33 suppressed osteoclast formation in both mouse bone marrow cells and monocyte/macrophage cell line RAW264.7 cells induced by receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and/or macrophage stimulating factor (M-CSF). IL-33 also inhibited the expression of RANKL-induced nuclear factor of activated T-cell cytoplasmic 1 (NFATc1), thereby decreasing the expression of osteoclastogenesis-related marker genes, including *Cathepsin K*, *Osteoclast stimulatory transmembrane protein* (*Oc-stamp*) and *Tartrate-resistant acid phosphatase* (*Trap*). Blockage of IL-33-ST2 binding suppressed the IL-33-mediated inhibition of NFATc1. RANKL-induced B-lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp-1) expression was also suppressed by IL-33, which was followed by the stimulation of anti-osteoclastic genes such as interferon regulatory factor-8 (IRF-8). These results suggest that IL-33-ST2 interactions down-regulate both RANKL-induced NFATc1 activation and osteoclast differentiation via the regulation of Blimp-1 and IRF-8 expression.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Bone remodeling is highly regulated by osteoblastic bone formation and osteoclastic bone resorption. These processes are strictly coupled in healthy bone by factors that include growth factors, hormones, and mechanical loading. Disorders of bone remodeling cause diseases such as rheumatoid arthritis, osteoporosis and osteopetrosis, as well as inflammatory bone resorption [1].

Osteoclast precursors interact with osteoblasts and stromal cells to permit their differentiation into mature osteoclasts [2]. Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) is expressed by osteoblasts/bone

stromal cells. RANKL binding to the receptor RANK leads to the recruitment of intracellular tumor necrosis factor (TNF)-receptor-associated factor 6, and in turn, to the activation of the intercellular signaling pathway associated with nuclear factor of kappa B (NF- κ B), mitogen-activated protein kinases, c-jun, and c-fos [3–5]. Finally, the interaction of RANKL with RANK induces the expression of the nuclear factor of activated T-cell cytoplasmic 1 (NFATc1), the master regulator for osteoclastogenesis [6].

IL-33 is a recently discovered member of the IL-1 family of cytokines [7]. Full-length IL-33 is the bioactive form and it is released in the extracellular space in response to cell damage or mechanical injury. IL-33-mediated signaling involved its interaction with a heterodimeric receptor comprising ST2 and IL-1R accessory protein, leading to the activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (Erk1/2), p38, c-jun N-terminal kinase (JNK), and NF- κ B [8] and subsequently to the production of cytokines such as IL-1 β ,

* Corresponding author. Fax: +81 93 581 4984.

E-mail address: tatsujin@kyu-dent.ac.jp (T. Nishihara).

Interferon- γ (INF- γ), and TNF- α , which play a role in inflammatory diseases such as asthma, atopic dermatitis, rheumatoid arthritis, and anaphylactic shock [9].

IL-33 is expressed by bone-forming osteoblasts [10]. Moreover, recent studies reported that IL-33 was expressed in bone tissue, where it plays an important role in bone remodeling by effectively blocking osteoclastogenesis [10,11]; however, the mechanisms underlying the effects of IL-33 on osteoclast formation and function are largely unknown. In the present study, we used an *in vitro* culture system to investigate the molecular mechanisms by which IL-33 regulates osteoclastogenesis.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and antibodies

Recombinant human IL-33 was obtained from R&D systems (Minneapolis, MN, USA). Recombinant human soluble RANKL and recombinant human macrophage colony stimulating factor (M-CSF) was purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA). Anti-NFATc1 polyclonal antibodies and anti-Blimp-1 monoclonal antibody were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti- β -actin monoclonal antibody was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Anti-IFN-regulatory-factor-8 (IRF-8), and anti-histone H3 monoclonal antibodies were purchased from Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA).

2.2. Cell culture

Bone marrow cells (BMCs) were isolated from femurs and tibias of 6-week-old male ddY mice (Kyudo Co., Ltd., Saga, Japan) and

cultured in the presence of M-CSF (20 ng/mL) for 3 days. For differentiation into mature osteoclasts, osteoclast precursors (2.5×10^5 cells/well) were cultured with M-CSF (20 ng/mL) and RANKL (40 ng/mL) in the presence or absence of IL-33 on 24-well plate for 5 days. All procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of Kyushu Dental University. The murine monocyte/macrophage cell line RAW264.7 was obtained from Riken Cell Bank (Tsukuba, Japan) and maintained in α -minimal essential medium (α -MEM; Gibco, Grand Island, NY, USA) containing 10% fetal calf serum (FCS), penicillin G (100 units/mL), and streptomycin (100 μ g/mL). The cells were maintained at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂. Cells (1×10^3 cells/well) were cultured for 6 days with RANKL (40 ng/mL) in the presence or absence of IL-33 on 96-well plate to generate mature osteoclasts.

2.3. Evaluation of osteoclast differentiation

After culture, adherent cells were fixed and stained with tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) using a leukocyte acid phosphatase kit (Sigma-Aldrich). TRAP-positive multinucleated cells containing three or more nuclei were considered to be osteoclasts and were counted using a microscope.

2.4. Quantitative real-time RT-PCR

RAW264.7 cells (2×10^5 cells/well) were cultured for 48 h with RANKL (40 ng/mL) in the presence or absence of IL-33 (50 ng/mL). In some experiments, the cells were pre-treated with Rat IgG (37.5 μ g/mL; R&D Systems) or with an anti-ST2 monoclonal antibody (37.5 μ g/mL; R&D Systems) for 1 h prior to their stimulation with RANKL and IL-33. Total RNA was isolated from cells with an

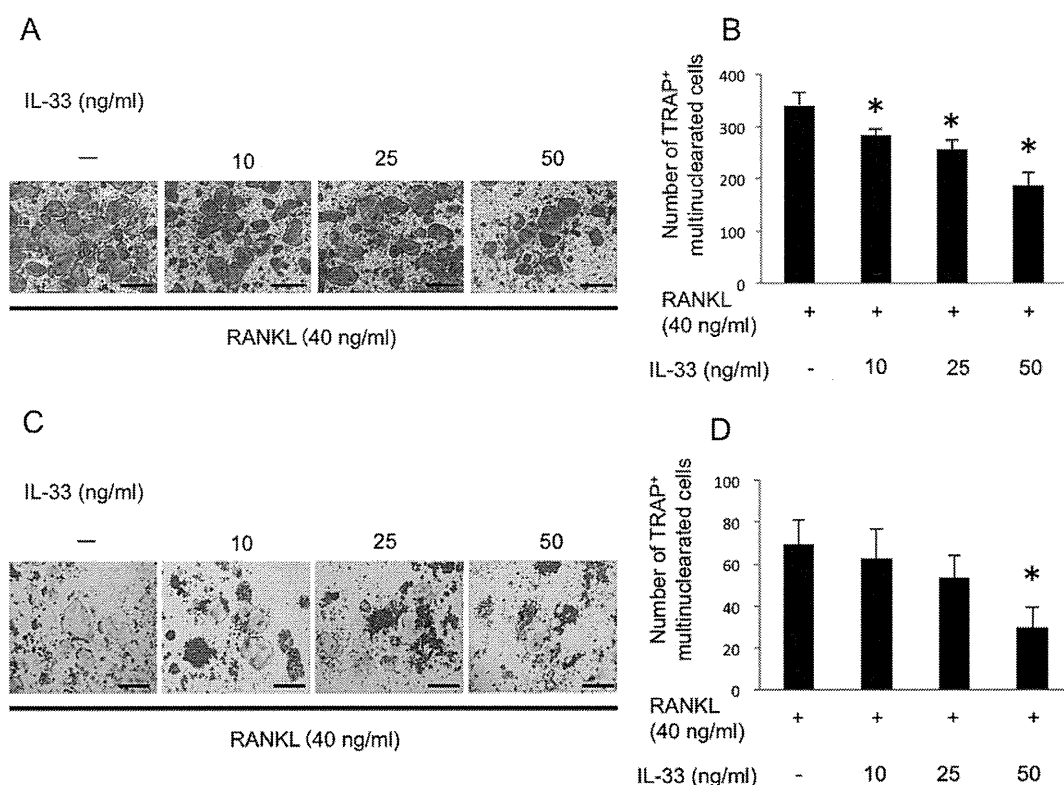


Fig. 1. Effect of IL-33 on osteoclast formation in BMCs and RAW264.7 cells. (A) BMCs were incubated with M-CSF and RANKL in the presence or absence of IL-33 for 5 days and then stained for TRAP activity. Scale bars show 500 μ m. (B) Numbers of TRAP positive multinucleated cells were counted. (C) RAW264.7 cells were cultured with RANKL in the presence or absence of IL-33 for 6 days and then stained for TRAP activity. Scale bars show 500 μ m. (D) Numbers of TRAP positive multinucleated cells were counted. Data are expressed as the mean \pm SD of triplicate cultures. Student's *t*-test, **p* < 0.05 compared with the control without IL-33 treatment.

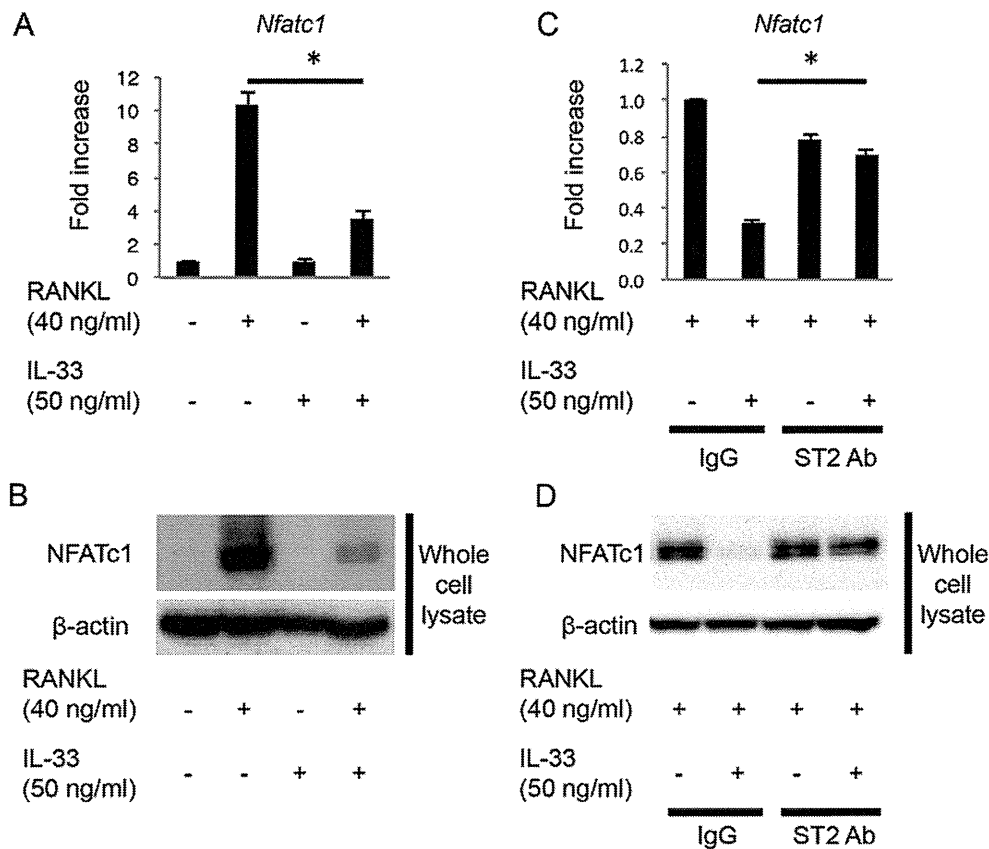


Fig. 2. Effect of IL-33 on RANKL-stimulated NFATc1 expression in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were stimulated with RANKL in the presence or absence of IL-33 for 48 h (real-time RT-PCR) or 72 h (Western Blotting). In neutralizing experiments, RAW264.7 cells were treated with a ST2 antibody for 1 h prior to stimulate with IL-33. (A), (C) The mRNA level of *Nfatc1* was measured by real-time RT-PCR. Data are expressed as the mean \pm SD of triplicate cultures. Student's *t*-test, **p* < 0.05 compared with RANKL treatment. (B), (D) Whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE and Western blot analyses, with the blots probed for NFATc1. Equivalent amounts of protein in the cell lysates were determined by measuring β -actin levels.

RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA was transcribed with q-script cDNA supermix reagents (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD, USA). For real-time RT-PCR, the products were detected using the FAST SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the following primer sequences: *Gapdh*, 5'-GACGGCCGCATCTTCTGA-3' (forward) and 5'-CACACCGACCTT-CACCATTT-3' (reverse); *Nfatc1*, 5'-ACCACCTTCCGCAACCA-3' (forward) and 5'-GGTACTGG-CTTCTCTCCGTTTC-3' (reverse); *Trap*, 5'-CTGCTGGGCTACAAATCATA-3' (forward) and 5'-GGGAGTCTC-CAGATCCATAGT-3' (reverse); *Oc-stamp*, 5'-CCGCA-GCCTGA-CATTTGAG-3' (forward) and 5'-TCTCCTGAGTGATCGTGTGCAT-3' (reverse); *Cathepsin k*, 5'-TATGACCACTGCCTTCCAATAC-3' (forward) and 5'-GCC-GTGGCGTTATACATACA-3' (reverse); *Blimp-1*, 5'-TTCTTGTGTGGTATTGTCCGG-CTT-3' (forward) and 5'-TTGGGGA-CACTCTTGGGTAGATT-3' (reverse); *Irf-8*, 5'-GGCTGATCTGG-GAAAATGA-3' (forward) and 5'-CACCTCTGATTGTAATCC-TGCTT-3' (reverse). Thermal cycling and fluorescence detection were performed using a StepOne real-time system (Applied Biosystems). Relative changes in gene expression were calculated using the comparative CT method. Total cDNA abundance between samples was normalized using primers specific to the GAPDH gene.

2.5. Western blot analysis

RAW264.7 cells (3×10^6 cells/well) were cultured with RANKL (40 ng/mL) in the presence or absence of IL-33 (50 ng/mL) for 48 or 72 h. In some experiments, the cells were pre-treated with Rat IgG (37.5 μ g/m) or an anti-ST2 monoclonal antibody (37.5 μ g/mL) for 1 h

prior to their stimulation with RANKL and IL-33. Total protein was extracted using cell lysis buffer (Cell Signaling Technology Inc.) containing a protease inhibitor mixture (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and a phosphatase inhibitor mixture (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan). Protein content was measured using a DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Equivalent amounts of protein were separated by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). Non-specific binding sites were blocked for 30 min by immersing the membrane in Blocking One solution (Nacalai Tesque Inc.) at room temperature. The membranes were then incubated with diluted primary antibodies overnight 4 $^{\circ}$ C, followed by horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies for 60 min at room temperature. HRP-conjugated anti-mouse and anti-rabbit IgG (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) or HRP-conjugated anti-rat IgG (Santa Cruz Biotechnology) antibodies were used as secondary antibodies. The membranes were washed and then treated with the ECL reagent (GE Healthcare) or Chemi-Lumi One Super (Nacalai Tesque Inc.). The resulting chemiluminescence detected digitally with GelDoc XR Plus (Bio-Rad Laboratories).

2.6. Nuclear translocation of NFATc1

RAW264.7 cells (3×10^6 cells/well) were cultured with RANKL (40 ng/mL) in the presence or absence of IL-33 (50 ng/mL) for 72 h. The cell pellets were treated with NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Cell fractions were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with an antibody against NFATc1. In other

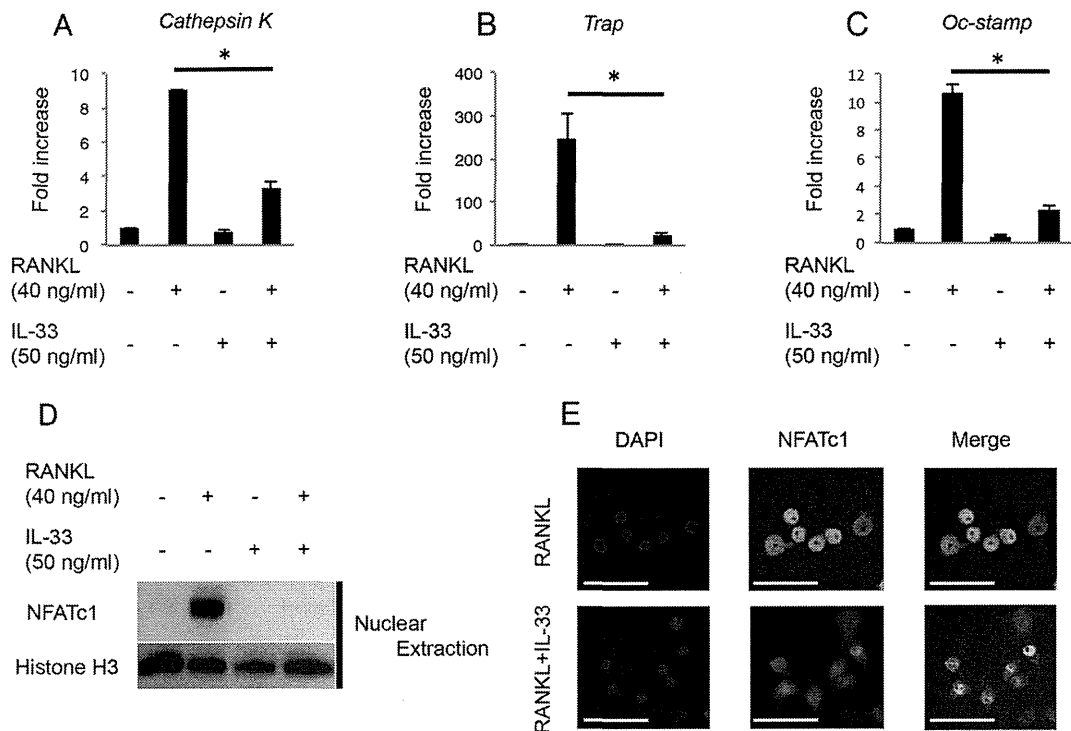


Fig. 3. Effect of IL-33 on the RANKL-induced expression of osteoclastogenic genes and NFATc1 translocation in RAW264.7 cells. The cells were stimulated with RANKL in the presence or absence of IL-33 for 48 h. The mRNA levels of *Cathepsin K* (A), *Trap* (B), and *Oc-stamp* (C) were measured by real-time RT-PCR. Data are expressed as the mean \pm SD of triplicate cultures. Student's *t*-test, **p* < 0.05 compared with RANKL treatment. (D) RAW264.7 cells were stimulated with RANKL in the presence or absence of IL-33 for 72 h. Nuclear fractions were prepared and analyzed by Western blotting, probing the blots for NFATc1. Equivalent amounts of protein in the nuclear fractions were determined by measuring histone H3 levels. (E) RAW264.7 cells were stimulated with RANKL in the presence or absence of IL-33 for 12 h. The cells were fixed, permeabilized, and stained for NFATc1 (green) and nuclei (blue). Scale bars show 50 μ m.

experiments, RAW264.7 cells (1×10^4 cells/well) were cultured with RANKL (40 ng/mL) in the presence or absence of IL-33 (50 ng/mL) for 12 h on 4-well chamber slides (Thermo Scientific) and then fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (pH 7.2; PBS) for 60 min at 4 °C, followed by quenching with 0.2 M glycine in PBS. The cells were permeabilized using 0.2% Triton X-100 for 10 min at room temperature, blocked with 1% bovine serum albumin in PBS for 30 min, and then incubated with an anti-NFATc1 polyclonal antibody overnight at 4 °C. After a wash in PBS, the cells were incubated with an Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse secondary antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), washed again, mounted in mounting medium containing 4', 6-diamino-2-phenylidole (DAPI), and visualized using a BZ-9000 fluorescence microscope (Keyence, Osaka, Japan). Images were captured digitally in real time and processed using BZ-II imaging software.

2.7. Statistical analysis

All data were obtained from three independent experiments, and each experiment was performed in triplicate. Statistical differences were determined using an unpaired Student's *t*-test with Bonferroni correction for multiple comparisons. All data are expressed as the mean \pm standard deviation.

3. Results

3.1. IL-33 suppresses osteoclast formation in BMCs and RAW264.7 cells

To examine the effects of IL-33 on osteoclast differentiation, TRAP-positive multinucleated cells were counted as an indicator of

osteoclast number. IL-33 inhibited the differentiation of BMCs into osteoclast-like cells mediated by M-CSF and RANKL. As shown in Fig. 1A and B, the effect of IL-33 was dose-dependent, with maximum inhibition observed at a concentration of 50 ng/mL (45.1% inhibition). IL-33 also inhibited RANKL-induced differentiation of RAW264.7 cells into osteoclasts in a dose-dependent manner, with significant inhibition obtained at a concentration of 50 ng/mL (57.4% inhibition, Fig. 1C and D).

3.2. RANKL-stimulated expression of NFATc1 is inhibited by IL-33

In the intracellular signaling pathway of RANKL, NFATc1 is essential for osteoclast differentiation and is considered to be the master regulator for osteoclastogenesis. Therefore, we examined the effect of IL-33 on RANKL-induced NFATc1 expression by real-time RT-PCR and Western blotting. IL-33 significantly down-regulated the expression of RANKL-induced *Nfatc1* mRNA (Fig. 2A) and completely inhibited the expression of NFATc1 protein (Fig. 2B).

3.3. The IL-33 signaling pathway regulates NFATc1 expression via the ST2 receptor

To investigate the role of ST2 as an IL-33 receptor in the down-regulation of RANKL-induced NFATc1 expression, RAW264.7 cells were pre-treated with ST2 neutralizing antibody for 1 h prior to their stimulation with RANKL and IL-33. PCR and Western blot analysis showed that pre-treatment with the neutralizing antibody effectively prevented the IL-33-induced down-regulation of NFATc1 (Fig. 2C and D).

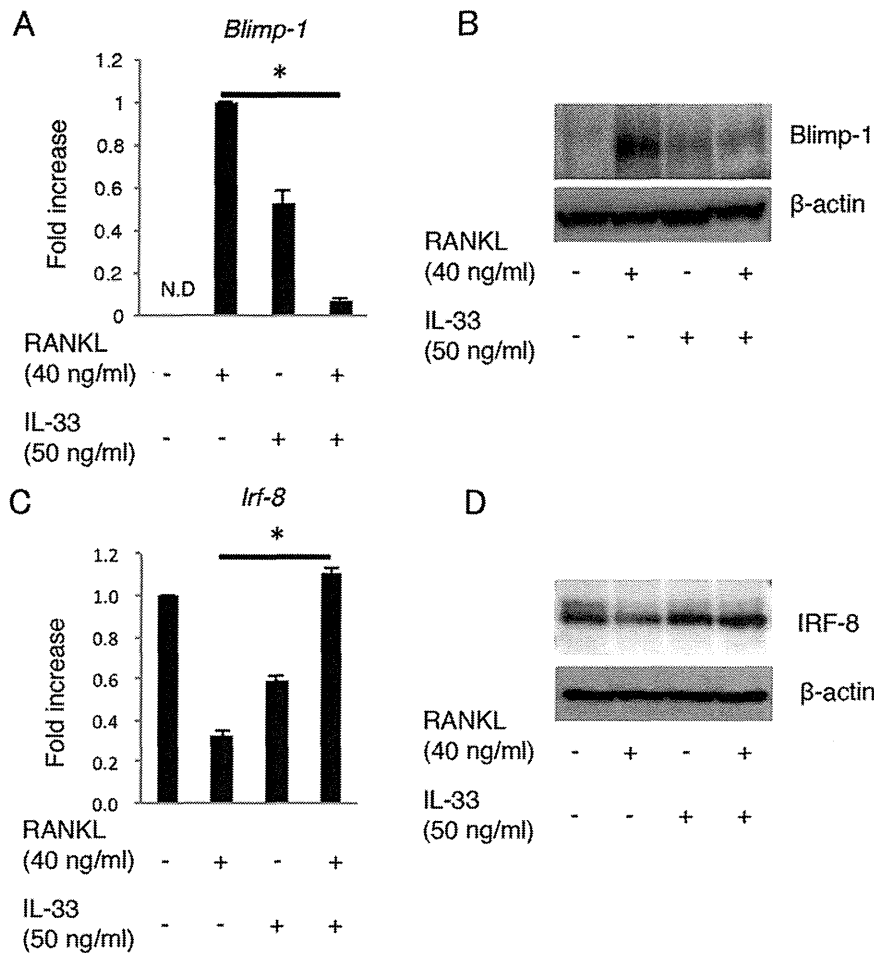


Fig. 4. Effect of IL-33 on Blimp-1 and IRF-8 expression in RAW264.7 cells induced by RANKL. The cells were stimulated with RANKL in the presence or absence of IL-33 for 48 h. The mRNA levels of *Blimp-1* (A) and *Irf-8* (C) were measured by real-time RT-PCR. Data are expressed as the mean \pm SD of triplicate cultures. Student's *t*-test, **p* < 0.05 compared with RANKL treatment. Whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE and Western blotting, with the blots probed for Blimp-1 (B) and IRF-8 (D). Equivalent amounts of protein in the cell lysates were determined by measuring β -actin levels.

3.4. IL-33 inhibits RANKL-induced osteoclast-related gene expression

The effect of IL-33 on osteoclast differentiation was investigated by measuring the expression levels of mRNAs encoding osteoclast-related genes in RAW264.7 cells after 48 h of RANKL stimulation. Consistent with the results of TRAP staining, IL-33 caused a significant decrease in the expression of osteoclast-related genes, such as *Cathepsin K* (Fig. 3A), *Trap* (Fig. 3B), and *Oc-stamp* (Fig. 3C) in RANKL-stimulated RAW264.7 cells.

3.5. IL-33 suppresses nuclear translocation of RANKL-induced NFATc1

NFATc1 is translocated from the cytoplasm to the nucleus by calcineurin-mediated dephosphorylation. Therefore, we investigated whether IL-33 altered RANKL-induced NFATc1 translocation. Nuclear translocation of NFATc1 was detected in RAW264.7 cells stimulated with RANKL. When the cells were incubated with both RANKL and IL-33, the level of NFATc1 protein in the nucleus was lower than that in cells treated with RANKL alone (Fig. 3D). Immunofluorescence analysis also revealed that nuclear translocation of NFATc1 in RAW264.7 cells induced by RANKL was decreased by IL-33 treatment (Fig. 3E).

3.6. IL-33 reduced Blimp-1 and recovered IRF-8 induced by RANKL at the gene expression level

We then analyzed the expression of Blimp-1, which is the transcriptional repressor of anti-osteoclastogenic genes and of IRF-8, the negative regulator of osteoclast differentiation. Our results showed that the RANKL-induced Blimp-1 expression was significantly suppressed by IL-33 (Fig. 4A and B). On the other hand, the down-regulation of IRF-8 induced by RANKL was recovered by the addition of IL-33 (Fig. 4C and D).

4. Discussion

Osteoclasts are large multinucleated cells formed by the fusion of precursor cells in the monocyte-macrophage lineage [12]. Their differentiation is dependent on growth factors, cytokines, and hormones. IL-33 is an alarmin cytokine and acts on a variety of cells, such as Th2 lymphocytes, mast cells, and macrophages [13,14]. Several studies reported that IL-33 was expressed by differentiated osteoblasts [15] and inhibited osteoclast formation [11,16,17].

Osteoclast formation of BMCs induced by M-CSF and RANKL was inhibited by the addition of IL-33 (Fig. 1A and B), indicating that IL-33 had a suppressive effect on osteoclastogenesis. We also found that IL-33 suppressed osteoclast formation in RAW264.7 cell

as well as BMCs when induced by RANKL (Fig. 1C and D). These findings suggest that IL-33 induces osteoclast differentiation through signaling pathways in the osteoclast precursor cells. NFATc1 is strongly induced by RANKL and is required for the terminal differentiation of osteoclasts [6,18]. The level of NFATc1 expression in RAW264.7 cells during osteoclastogenesis was suppressed by IL-33 (Fig. 2A and B), consistent with the down-regulation of osteoclast formation by IL-33 via the suppression of NFATc1.

Another important finding of our study is that the IL-33 receptor ST2 is required for the inhibition of RANKL-stimulated NFATc1 expression mediated by IL-33. The binding of IL-33 to ST2 is known to be involved in the onset of a variety of biological activities. A monoclonal anti-ST2 antibody is routinely used in IL-33-related blocking experiments [8]. As shown in Fig. 2C and D, pre-treatment with this antibody remarkably inhibited the effect of IL-33 on the down-regulation of NFATc1 in RAW264.7 cells. On the basis of these findings, we drew the connection of ST2 on RAW264.7 cells and IL-33 concerning the regulation of osteoclast formation and activation.

The inhibitory effect of IL-33 on osteoclastogenesis was confirmed by evaluating RANKL-induced expression of mRNAs of osteoclast-related genes. Cathepsin K [19] and TRAP [20] are related to the bone resorptive function of mature osteoclasts, and osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP) is associated with cell–cell fusion of osteoclasts [21]. It was demonstrated that *Cathepsin K*, *Trap* and *Oc-stamp* mRNA levels are regulated by NFATc1. Our results show that IL-33 notably decreased osteoclast-related gene expression regulated by *Nfatc1* in RAW264.7 cells (Fig. 3A, B and C). These results suggest that IL-33 modified the RANKL–NFATc1 signaling pathway, leading to a decrease in osteoclast formation.

During osteoclastogenesis, RANKL stimulation is found to induce the nuclear translocation of NFATc1. Furthermore, NFATc1 binds to its own promoter, which results in the robust induction of NFATc1. This autoamplification process of NFATc1 is an important mechanism in osteoclastogenesis [22]. NFATc1 induction is also dependent on the activation of both the NF- κ B [23] and the AP-1 complex containing c-fos [22]. However, IL-33 had no inhibitory effect on the NF- κ B and AP-1 activation induced by RANKL (data not shown). So, we next confirmed the effect of IL-33 on NFATc1 nuclear translocation induced by RANKL and clarified that IL-33 interferes with RANKL-induced nuclear translocation of NFATc1 (Fig. 3D and E). Taken together, we conclude IL-33 suppresses RANKL-induced NFATc1 nuclear translocation through NF- κ B- or AP-1-independent pathways during the differentiation of osteoclast precursors into mature osteoclasts. Further studies are needed to identify the other signaling molecules that are needed for osteoclastogenesis mediated by IL-33–ST2 interaction.

Recent studies reported that, during osteoclastogenesis, NFATc1 activity is negatively regulated by other transcription factors such as IRF-8, B cell lymphoma 6 (Bcl6), and v-Maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family member protein B (MafB) [24–26]. Blimp-1 is a transcriptional repressor that plays crucial roles in the differentiation and/or function of numerous cell types, including macrophages and lymphocytes [27]. Furthermore, a genome wide screening of RANKL-inducible transcription factors revealed that Blimp-1 functions as a transcriptional repressor of *Irf-8*, *Bcl6*, and *MafB* during osteoclastogenesis [24,25,28,29]. Interestingly, we found that the RANKL-induced Blimp-1 expression was down-regulated by IL-33 (Fig. 4A and B), while the suppression of IRF-8 expression mediated by RANKL was inhibited by IL-33 (Fig. 4C and D). IRF-8 is specifically expressed in immune cells, including macrophages [30]. IRF-8 binds to NFATc1 in osteoclast precursors

and suppresses its transcriptional activity, resulting in the down-regulation of NFATc1 autoamplification and the expression of NFATc1 target osteoclast marker genes [24]. Taken together, these findings suggest that the inhibitory effect of IL-33 on RANKL-induced osteoclastogenesis involves modification of the Blimp-1–IRF-8 molecular axis.

In conclusion, we demonstrated that IL-33–ST2 interaction regulated Blimp-1 and IRF-8 expression and inhibited the activation of NFATc1 during RANKL-induced osteoclast formation. Although IL-33 strongly suppressed NFATc1 expression, it had only a moderate inhibitory effect on osteoclastogenesis induced by RANKL. Further elucidation of the molecular mechanisms of IL-33 in osteoclastogenesis will provide additional knowledge for homeostatic to prevent excessive bone resorption in both physiological and inflammatory conditions.

Conflict of interest

None.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.033>.

References

- [1] T. Nakashima, M. Hayashi, H. Takayanagi, New insights into osteoclastogenic signalling mechanisms, *Trends Endocrinol. Metab.* 23 (2012) 582–590.
- [2] T. Suda, N. Takahashi, N. Udagawa, E. Jimi, M.T. Gillespie, T.J. Martin, Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families, *Endocr. Rev.* 20 (1999) 345–357.
- [3] B.R. Wong, R. Josien, S.Y. Lee, M. Vologodskaja, R.M. Steinman, Y. Choi, The TRAF family of signal transducers mediates NF- κ B activation by the TRANCE receptor, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 28355–28359.
- [4] M.C. Walsh, G.K. Kim, P.L. Maurizio, E.E. Molnar, Y. Choi, TRAF6 autoubiquitination-independent activation of the NF- κ B and MAPK pathways in response to IL-1 and RANKL, *PLoS one* 3 (2008) e4064.
- [5] J. Mizukami, G. Takaesu, H. Akatsuka, H. Sakurai, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto, N. Sakurai, Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 992–1000.
- [6] H. Takayanagi, S. Kim, T. Koga, H. Nishina, M. Isshiki, H. Yoshida, A. Saiura, M. Isobe, T. Yokochi, J. Inoue, E.F. Wagner, T.W. Mak, T. Kodama, T. Taniguchi, Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts, *Dev. Cell.* 3 (2002) 889–901.
- [7] J.E. Sims, D.E. Smith, The IL-1 family: regulators of immunity, *nature reviews, Immunology* 10 (2010) 89–102.
- [8] J. Schmitz, A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T.K. McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, D.M. Gorman, J.F. Bazan, R.A. Kastelein, IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines, *Immunity* 23 (2005) 479–490.
- [9] G. Palmer, D. Talabot-Ayer, C. Lamacchia, D. Toy, C.A. Seemayer, S. Viatte, A. Finckh, D.E. Smith, C. Gabay, Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis, *Arthritis Rheum.* 60 (2009) 738–749.
- [10] S. Saidi, F. Bouri, P. Lencel, L. Duplomb, M. Baud'huin, S. Delplace, D. Leterme, F. Miellot, D. Heymann, P. Hardouin, G. Palmer, D. Magne, IL-33 is expressed in human osteoblasts, but has no direct effect on bone remodeling, *Cytokine* 53 (2011) 347–354.
- [11] M.M. Zaiss, M. Kurowska-Stolarska, C. Böhm, R. Gary, C. Scholtyssek, B. Stolarski, J. Reilly, S. Kerr, N.L. Millar, T. Kamradt, I.B. McInnes, P.G. Fallon, J.P. David, F.Y. Liew, G. Schett, IL-33 shifts the balance from osteoclast to alternatively activated macrophage differentiation and protects from TNF- α -mediated bone loss, *J. Immunol.* 186 (2011) 6097–6105 (Baltimore, Md.: 1950).
- [12] H. Takayanagi, Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems, *nature reviews, Immunology* 7 (2007) 292–304.
- [13] M. Komai-Koma, D. Xu, Y. Li, A.N. McKenzie, I.B. McInnes, F.Y. Liew, IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells, *Eur. J. Immunol.* 37 (2007) 2779–2786.

- [14] B. Stolarski, M. Kurowska-Stolarska, P. Kewin, D. Xu, F.Y. Liew, IL-33 exacerbates eosinophil-mediated airway inflammation, *J. Immunol.* 185 (2010) 3472–3480 (Baltimore, Md. : 1950).
- [15] J. Schulze, T. Bickert, F.T. Beil, M.M. Zaiss, J. Albers, K. Wintges, T. Streichert, K. Klaetschke, J. Keller, T.N. Hissnauer, A.S. Spiro, A. Gessner, G. Schett, M. Amling, A.N. McKenzie, A.K. Horst, T. Schinke, Interleukin-33 is expressed in differentiated osteoblasts and blocks osteoclast formation from bone marrow precursor cells, *J. Bone Mineral Res.* 26 (2011) 704–717. Official J. Am. Soc. Bone Mineral Res.
- [16] J. Keller, P. Catala-Lehnen, K. Wintges, J. Schulze, T. Bickert, W. Ito, A.K. Horst, M. Amling, T. Schinke, Transgenic over-expression of interleukin-33 in osteoblasts results in decreased osteoclastogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417 (2012) 217–222.
- [17] H. Saleh, D. Eeles, J.M. Hodge, G.C. Nicholson, R. Gu, S. Pompolo, M.T. Gillespie, J.M. Quinn, Interleukin-33, a target of parathyroid hormone and oncostatin m, increases osteoblastic matrix mineral deposition and inhibits osteoclast formation in vitro, *Endocrinology* 152 (2011) 1911–1922.
- [18] N. Ishida, K. Hayashi, M. Hoshijima, T. Ogawa, S. Koga, Y. Miyatake, M. Kumegawa, T. Kimura, T. Takeya, Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 41147–41156.
- [19] T. Ishikawa, M. Kamiyama, N. Tani-Ishii, H. Suzuki, Y. Ichikawa, Y. Hamaguchi, N. Momiyama, H. Shimada, Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by cathepsin K antisense oligonucleotides, *Mol. Carcinog.* 32 (2001) 84–91.
- [20] J.M. Halleen, S. Raisanen, J.J. Salo, S.V. Reddy, C.D. Roodman, T.A. Hentunen, P.P. Lehenkari, H. Kaija, P. Vihko, H.K. Vaananen, Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 22907–22910.
- [21] H. Miyamoto, T. Suzuki, Y. Miyauchi, R. Iwasaki, T. Kobayashi, Y. Sato, K. Miyamoto, H. Hoshi, K. Hashimoto, S. Yoshida, W. Hao, T. Mori, H. Kanagawa, E. Katsuyama, A. Fujie, H. Morioka, M. Matsumoto, K. Chiba, M. Takeya, Y. Toyama, T. Miyamoto, 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 Mineral Res.* 27 (2012) 1289–1297. Official J. Am. Soc. Bone Mineral Res.
- [22] M. Asagiri, K. Sato, T. Usami, S. Ochi, H. Nishina, H. Yoshida, I. Morita, E.F. Wagner, T.W. Mak, E. Serfling, H. Takayanagi, Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis, *J. Exp. Med.* 202 (2005) 1261–1269.
- [23] H. Takatsuna, M. Asagiri, T. Kubota, K. Oka, T. Osada, C. Sugiyama, H. Saito, K. Aoki, K. Ohya, H. Takayanagi, K. Umezawa, Inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis by (-)-DHMEQ, a novel NF-kappaB inhibitor, through downregulation of NFATc1, *J. Bone Mineral Res.* 20 (2005) 653–662. Official J. Am. Soc. Bone Mineral Res.
- [24] B. Zhao, M. Takami, A. Yamada, X. Wang, T. Koga, X. Hu, T. Tamura, K. Ozato, Y. Choi, L.B. Ivashkiv, H. Takayanagi, R. Kamijo, Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis, *Nat. Med.* 15 (2009) 1066–1071.
- [25] K. Kim, J.H. Kim, J. Lee, H.M. Jin, H. Kook, K.K. Kim, S.Y. Lee, N. Kim, MafB negatively regulates RANKL-mediated osteoclast differentiation, *Blood* 109 (2007) 3253–3259.
- [26] K.H. Park-Min, E.Y. Lee, N.K. Moskowitz, E. Lim, S.K. Lee, J.A. Lorenzo, C. Huang, A.M. Melnick, P.E. Purdue, S.R. Goldring, L.B. Ivashkiv, Negative regulation of osteoclast precursor differentiation by CD11b and beta2 integrin-B-cell lymphoma 6 signaling, *J. Bone Mineral Res.* 28 (2013) 135–149. Official J. Am. Soc. Bone Mineral Res.
- [27] G. Martins, K. Calame, Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes, *Annu. Rev. Immunol.* 26 (2008) 133–169.
- [28] K. Nishikawa, T. Nakashima, M. Hayashi, T. Fukunaga, S. Kato, T. Kodama, S. Takahashi, K. Calame, H. Takayanagi, Blimp1-mediated repression of negative regulators is required for osteoclast differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 3117–3122.
- [29] Y. Miyauchi, K. Ninomiya, H. Miyamoto, A. Sakamoto, R. Iwasaki, H. Hoshi, K. Miyamoto, W. Hao, S. Yoshida, H. Morioka, K. Chiba, S. Kato, T. Tokuhisa, M. Saitou, Y. Toyama, T. Suda, T. Miyamoto, The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis, *J. Exp. Med.* 207 (2010) 751–762.
- [30] W. Kantakamalaku, A.D. Politis, S. Marecki, T. Sullivan, K. Ozato, M.J. Fenton, S.N. Vogel, Regulation of IFN consensus sequence binding protein expression in murine macrophages, *J. Immunol.* 162 (1999) 7417–7425 (Baltimore, Md. : 1950).

