

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20685

研究課題名(和文) IL-34二量体のCSF-1受容体を介した多様なシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of various signal mechanisms mediated by CSF-1 receptor of IL-34 dimer

研究代表者

川邊 睦記(KAWABE, MUTSUKI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：10760720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：歯根膜(PDL)細胞と歯肉上皮(GF)細胞を腫瘍壊死因子(TNF-)で刺激し、Realtime PCR法にてIL-34およびCSF-1のmRNAsを評価した。その結果、TNF-誘導性にPDL細胞およびGF細胞におけるIL-34およびCSF-1のmRNAs産生量が上昇した。歯周炎を有する患者から採取した感染歯周組織よりmRNAsを抽出し、Realtime PCR法にて評価した。TNF-、IFN- およびIL-1などの炎症性サイトカインの発現と破骨細胞形成因子であるIL-34やCSF-1の間に相関関係を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We stimulated periodontal ligament (PDL) cells and gingival fibroblast (GF) cells by tumor necrosis factor- (TNF-), and evaluated the mRNAs expression of IL-34 and CSF-1 by Realtime PCR. As the result, the expression of IL-34 and CSF-1 were increased by TNF- in PDL cells and GF cells. We got mRNA from infected granulation tissues of patients with periodontal disease, and evaluated the expression of mRNAs by Realtime PCR. The correlation between inflammatory cytokines such as TNF-, IFN- and IL-1 and osteoclastogenesis factors such as IL-34 and CSF-1 was not confirmed.

研究分野：歯科口腔外科

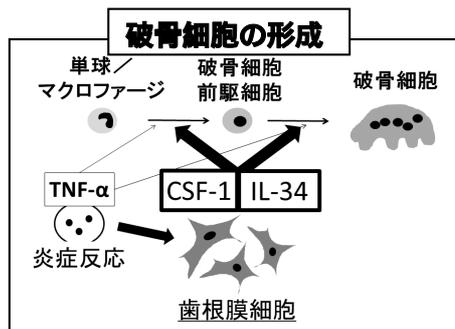
キーワード：IL-34 CSF-1 CSF-1R 破骨細胞 歯根膜細胞

## 1. 研究開始当初の背景

歯根膜 (Periodontal ligament: PDL) 細胞は、TNF- $\alpha$  存在下で、CSF-1R の第一リガンドである CSF-1 と、第二リガンドである IL-34 二量体を産生する CSF-1 と IL-34 二量体は、アミノ酸配列上における相同性は低いと報告されている。CSF-1R は、アミノ酸配列の相同性が低い二つのリガンドに依存し、異なる細胞内シグナルを伝達する。

歯周炎局所において、PDL 細胞が TNF- $\alpha$  の刺激を受けると、CSF-1 を産生し、単球/マクロファージ系細胞を破骨細胞に分化させる。そこで、分子標的療法として抗 TNF- $\alpha$  抗体が検討されるが、免疫能低下による日和見感染等の副作用等が危惧される。次の分子標的療法として抗 CSF-1 抗体が検討された。しかし、CSF-1 ノックアウトマウスの検討より CSF-1R を介した単球/マクロファージ系細胞由来の破骨細胞の存在に必要条件のひとつでしかないことが判明した。そこで、第二リガンドである IL-34 二量体に着目した。

ヒト培養 PDL 細胞が TNF- $\alpha$  誘導性に IL-34 二量体を産生することを初めて報告した。さらに、CSF-1 単量体と比較して、TNF- $\alpha$  により活性化されたヒト培養 PDL 細胞が早期に IL-34 二量体を産生すること、IL-34 二量体が破骨細胞前駆細胞に対する高い細胞維持能 (抗アポトーシス作用) をもつことが示唆された。また破骨細胞の分化誘導には CSF-1 の存在だけでは不十分であり、IL-34 の存在が必要であることも示唆された。また歯根膜に近接する歯肉上皮 (GF) 細胞もまた歯周組織の再生および破壊に関連しており、PDL 細胞と同様に IL-34 を産生する可能性があると考えられる。



## 2. 研究の目的

CSF-1R のリガンドは CSF-1 と IL-34 二量体が発見されている。CSF-1 と IL-34 二量体は、アミノ酸レベルで相同性がない。しかし、同じ CSF-1R の細胞外 D2/D3 ドメインに結合する。立体構造上、僅かではあるが結合部位が異なる。ゆえに、CSF-1 と IL-34 二量体が結合した CSF-1R の立体構造の歪みに差が生じる。一方、CSF-1R の細胞内ドメインも接着する。この接着距離に差があることも当然である。従って、現在まで多様な CSF-1R のシグナルが報告されている。

CSF-1 ノックアウトマウスの研究より、

CSF-1R は破骨細胞ではなく B 細胞分化・成熟系に必須である。しかし、IL-34 ノックアウトマウスの研究より、CSF-1 ノックアウトマウスと比較して破骨細胞の形成低下が示唆された。本研究は、歯周組織の支持細胞と IL-34 の関与を明らかにすることと、歯周炎における IL-34 の役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

新たに購入した PDL 細胞株および GF 細胞株を腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TNF- $\alpha$ ) で刺激し、0, 12, 24 および 48 時間後の PDL 細胞および GF 細胞から TRIzol reagent (Life Technologies) にて mRNAs を抽出し、Realtime PCR 法にて IL-34, CSF-1 および CSF-1R の mRNAs 発現を評価した。同様に培養細胞を Lysis Buffer にて回収し、Western blot 法にて IL-34 タンパク質、CSF-1 タンパク質および CSF-1R タンパク質の発現を評価した。さらに、ELISA 法にて培養上清中の IL-34 タンパク質および CSF-1 タンパク質の産生について評価した。また、BD Falcon Culture Slides (Corning Life Sciences 社) 上で PDL 細胞および GF 細胞を培養し、TNF- $\alpha$  で 3 日間刺激した後、免疫染色を行い、IL-34 および CSF-1 の発現程度を評価した。

歯周炎を有する同意を得られた 8 名の患者から歯周外科手術時に採取した肉芽組織より TRIzol reagent にて mRNAs を抽出し、RANKL, IL-34, CSF-1 および CSF-1R と、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  および IL-18 の発現を RealtimePCR にて評価した。また、同様の肉芽組織をパラフィン包埋したのち、免疫染色法にて IL-34 と CSF-1 の発現の局在を評価した。

recombinant human IL-34 (rhIL-34) で PDL 細胞を刺激し、rhIL-34 が PDL 細胞に与える影響を IL-34, CSF-1 および CSF-1R の mRNAs レベルで評価した。

同意を得られた健常者より 20cc の採血を行い、Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences) を使用し、PBMCs を分離する。さらに、得られた PBMCs から Human Monocyte Enrichment Kit (StemCell Technologies) を用いて、単球/マクロファージ系細胞を分離する。分離した単球/マクロファージ系細胞を 96 穴プレートに播種し、PDL 細胞の培養上清と soluble RANKL (20 ng/mL, Bioindustry Division) 存在下で一定期間、RPMI 1640 培地にて培養する。TRAP 染色を用いて、CSF-1 と IL-34 二量体で刺激した後、培養上清の有する単球/マクロファージ系細胞から破骨細胞への分化・成熟度を観察する。また、PDL 細胞を TNF- $\alpha$  (10ng/mL) + IL-34 中和抗体あるいは TNF- $\alpha$  (10ng/mL) + CSF-1 中和抗体にて 4 日間刺激し、IL-34 および CSF-1 を放出していると考えられる上清をダイナビーズによる抗

体の除去を行ったうえで、分離した単球/マクロファージ系細胞と 96 穴プレート上で培養し、TRAP 染色を用いて、破骨細胞への分化・成熟度を観察した。

#### 4. 研究成果

TNF- $\alpha$  誘導性に GF 細胞および PDL 細胞は、IL-34 および CSF-1 の mRNAs 産生量が上昇した。しかし、IL-34 と CSF-1 の受容体である CSF-1R mRNAs の発現に特異的な変化はなかった。また、TNF- $\alpha$  非存在下で PDL 細胞と GF 細胞の細胞質内に低度の IL-34 と CSF-1 の発現を認め、TNF- $\alpha$  存在下では、高度の IL-34 と CSF-1 の発現を認めた。この結果は、歯周組織の支持細胞である GF 細胞および PDL 細胞内に IL-34 および CSF-1 は常に存在し、炎症性変化 (TNF- $\alpha$  の存在) により、IL-34 と CSF-1 を産生・放出し、歯槽骨の骨破壊が誘導される結果が示唆された。

すべての歯周炎を有する患者で RANKL, IL-34, CSF-1 および CSF-1R の発現を確認できたが、患者の歯周炎の臨床指標と発現程度の間に関連関係を認めなかった。CSF-1R はどの患者の組織にも同程度に発現しており、IL-34 や CSF-1 は患者間で発現量に大きな差を認めた。IL-34 と CSF-1 がともに発現量が多い組織はなかった。また、mRNA における TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  および IL-18 などの炎症性サイトカインの発現と IL-34 や CSF-1 との相関関係を認めなかった。同様に患者の歯周炎の臨床指標との相関性もまた認めなかった。同様の組織を免疫染色法にて評価したところ、IL-34 および CSF-1 の発現をすべての歯周組織で確認できたが、その発現の程度と歯周炎の臨床指標との相関関係を認めなかった。

歯周組織の免疫染色では、基底膜周辺には IL-34 および CSF-1 は発現しておらず、上皮表層で広範囲に IL-34 および CSF-1 が発現していた。また、基底膜直下の結合組織と考えられる部位にも IL-34 および CSF-1 が発現していた。

rhIL-34 で PDL 細胞を刺激しても IL-34, CSF-1 および CSF-1R 受容体である CSF-1R の発現に変化を認めなかった。IL-34 または CSF-1 のリガンドと CSF-1R 内における Autocrine の存在は示唆されなかった。

CSF-1 と IL-34 二量体の刺激により、単球/マクロファージ系細胞の破骨細胞形成は誘導された。同様に、ELISA 法にて IL-34 と CSF-1 量を確認した上清を使用した誘導実験でも破骨細胞の形成は誘導された。IL-34 と CSF-1 間で破骨細胞形成誘導の程度に差は認められなかった。

#### 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 8 件)

1. Noguchi K, Wakai K, Kiyono T, Kawabe M, et al., Molecular analysis of keratocystic odontogenic tumor cell lines derived from sporadic and basal cell nevus syndrome patients., International journal of oncology., 51 (6):1731-1738, 査読有り, 2017
2. Kawada S, Nagasawa Y, Kawabe M, et al., Iron-induced calcification in human aortic vascular smooth muscle cells through interleukin-24 (IL-24) with/without TNF-alpha., Scietific Report, 12;8(1):658, 査読有り, 2017
3. 野口一馬, 川邊睦記, 山根木康嗣, 高岡一樹, 岸本裕充, 全身および口腔内に多発したカポジ肉腫の 1 例, 日本口腔腫瘍学会誌, 29 巻 1 号, 15-21 頁, 査読有り, 2017
4. 川邊睦記, 岸本裕充, 予防および治療における抗菌薬適正使用のガイドライン, 歯界展望, 130 巻 2 号 8 巻, 392 頁, 査読無し, 2017
5. 川邊睦記, 森寺邦康, 首藤敦史, 野口一馬, 岸本裕充, 関西圏の歯科口腔外科における術後感染予防抗菌薬の使用に関するアンケート調査, 日本口腔感染症学会誌, 24 巻 2 号, 3-8 頁, 査読有り, 2017
6. Nishiura H, Kawakami T, Kawabe M, et al., RP S19 C-terminal peptide trimer acts as a C5a receptor antagonist., Biochem Biophys Rep., 7(9):70-76, 査読有り, 2016
7. 川邊睦記, 岸本裕充, 予防抗菌薬の使い方を再考しよう! 術後感染予防抗菌薬適正使用のための実践ガイドライン, 歯界展望, 127 巻 5 号, 830-832 頁, 査読無し, 2016
8. 川邊睦記, 岸本裕充, 有病高齢者のチェアサイドエッセンス 悪性腫瘍(周術期), デンタルダイヤモンド, 41 巻 599 号, 258-259 頁, 査読無し, 2016

[学会発表](計 18 件)

1. 服部洋一, 川邊睦記, 当科における骨吸収抑制薬関連顎骨壊死患者における下歯槽神経障害に関する検討, 第 22 回口腔顔面神経機能学会学術大会, 西宮, 2018
2. 川邊睦記, シンポジウム: 抜歯後の舌神経障害の対処法に関するアンケート調査, 第 22 回口腔顔面神経機能学会学術大会, 西宮, 2018
3. 森寺邦康, 野口一馬, 川邊睦記, 下顎歯肉に発生した類基底扁平上皮癌の 1 例 (2P-F4-4), 第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 福岡, 2017
4. 上田美帆, 高岡一樹, 荒木華子, 玉岡丈二, 川邊睦記, 骨微笑環境における破骨前駆細胞の分化に伴う細胞運動能の変化, 第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 松山, 2017

5. 首藤敦史, 野口一馬, 川邊睦記, 二度の腎移植後に発症した舌扁平上皮癌の 1 例, 第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 松山, 2017
6. 川邊睦記, 下顎歯肉扁平上皮癌が顎下腺転移した 1 例, 第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 松山, 2017
7. 岡崎史枝, 川邊睦記, 口腔扁平上皮癌培養細胞におけるヘッジホックシグナル活性化, 頭頸部癌, 京都, 2017
8. Sadakane-Sakuramoto A, Noguchi K, Yamanegi K, Kawabe M, Canalicular adenoma of the upper lip: A case report, 第 62 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 京都, 2017
9. 川邊睦記, 知的障害患者における下顎骨関節突起骨折の 1 例, 第 34 回日本障害者歯科学会総会および学術集会, 福岡, 2017
10. 上田美帆, 高岡一樹, 荒木華子, 玉岡丈二, 川邊睦記, 骨微小環境における細胞外物理的環境の変化による Hippo シグナルの関与, 第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 福岡, 2016
11. 川邊睦記, 抜歯後出血を契機として後天性血友病の診断に至った 1 例, 第 12 回阪神ヘモフィリア研究会, 大阪, 2016
12. 岡崎史枝, 川邊睦記, 顎下部に生じた巨大な皮下膿瘍の 1 例, 第 47 回日本口腔外科学会近畿支部学術集会, 大阪, 2016
13. 上田美帆, 高岡一樹, 荒木華子, 玉岡丈二, 川邊睦記, 骨微小環境における破骨前駆細胞の遊走・定着機構の解明, 第 61 回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会, 幕張, 2016
14. 森寺邦康, 野口一馬, 川邊睦記, 下顎歯肉に発生した骨外性骨肉腫の 1 例, 2016 年 11 月, 第 61 回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会, 幕張, 2016
15. 神田修治, 野口一馬, 川邊睦記, 角化嚢胞性歯原性腫瘍における NOTCH1 の発現から考察される腫瘍組織の性質, 第 27 回 NPO 法人日本口腔科学会近畿地方部会, 大阪, 2016

〔図書〕(計 3 件)

1. Kawabe M, Yamanegi K, et al., A case of basaloid squamous cell carcinoma diagnosed from the tissue surrounding the extracted tooth, Oral Science in Japan, 2017
2. Shudo A, Noguchi K, Kawabe M, et al., Squamous cell carcinoma of the tongue in a two-time renal transplant recipient: a case report, Oral Science in Japan, 2017
3. 川邊睦記, 岸本裕充, 5 分で読める! 知りたい全身疾患 29 (中川洋一 編), 悪性腫瘍: 周術期のオーラルマネジメント, P112-115, デンタルダイヤモンド社,

2017

〔産業財産権〕  
なし

○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

川邊 睦記 (KAWABE, Mutsuki)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 10760720

(2) 研究分担者 なし  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし  
( )

研究者番号:

(4) 研究協力者 なし  
( )