

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月13日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592401

研究課題名（和文）顎関節症を想定した IL-17 による骨軟骨破壊の分子機構の解明

研究課題名（英文）The elucidation of the molecular mechanism in bone and cartilage destruction by IL-17 supposing temporomandibular joint disorder

研究代表者

前野 正夫（MAENO MASAO）

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：60147618

研究成果の概要（和文）：顎関節症を想定し、骨軟骨破壊に及ぼす IL-17 の影響を調べた。破骨細胞分化と成熟破骨細胞の機能は、破骨細胞前駆細胞への IL-17A の直接刺激では抑制されたが、骨芽細胞を介する破骨細胞前駆細胞への関節刺激では促進された。IL-17A は骨芽細胞による細胞外基質タンパクの産生を促進した。また、IL-17F は軟骨細胞による軟骨基質タンパク代謝の合成系を抑制し、分解系を促進することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We examined the effects of IL-17 on bone and cartilage destruction supposing temporomandibular joint disorder. The osteoclast differentiation and function of mature osteoclasts were suppressed in the direct stimulation by IL-17A to osteoclast precursors, whereas they were induced in the indirect stimulation via osteoblasts. IL-17A promoted the production of extracellular matrix proteins in osteoblasts. In addition, our results suggested that IL-17F suppresses the direction of synthesis in cartilage matrix protein metabolism, whereas it promotes the direction of destruction in the metabolism by chondrocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：顎関節症，インターロイキン-17，骨芽細胞，破骨細胞前駆細胞，骨吸収，軟骨細胞，軟骨基質タンパク代謝

1. 研究開始当初の背景

顎関節症は、顎運動時の疼痛や関節雑音などの症状を伴い、開閉口や咀嚼などの顎運動機能に障害を引き起こす疾患であり、病理組織学的には関節を構成する骨や軟骨の細胞外基質の進行性破壊を特徴とする。顎関節症患者の滑液中には、健常者と比較してインター

ロイキン（IL）-1，IL-6，IL-8および腫瘍壊死因子（TNF）- α などの炎症性サイトカインが高濃度に含まれ、これらのサイトカインが、骨や軟骨の細胞外基質の進行性破壊と密接に関連している。しかし、その詳細については不明な点が多い。

最近、関節リウマチなどの自己免疫疾患に

おける骨破壊と炎症に深く関与しているサイトカインとして IL-17 が注目されている。IL-17 は、IL-23 によって誘導されるヘルパーT細胞 (Th17細胞) によって産生され、好中球や免疫担当細胞を炎症部位に集めるなど、局所の生体防御機構において重要な役割を担っている。口腔領域では、歯周病の発症や進行に関連した感染性病原微生物の刺激から歯槽骨を保護するために、IL-17 が骨吸収を促進することや Th17細胞が破骨細胞誘導性サブセットとして骨破壊に直接関与することが報告されている。Th17細胞は、局所に炎症を惹起して周囲の間葉細胞に破骨細胞分化促進因子 (RANKL) の発現を強く誘導するだけでなく、自身も RANKL を発現する。これらの報告から推測されることは、IL-17 が間葉細胞や Th17細胞の RANKL 発現を誘導して破骨細胞の分化と機能発現を促し、骨吸収を促進するのではないかという仮説である。しかし、この仮説を説明するための証拠となる報告は極めて少なく、その分子機構には不明な点が数多く残されている。

2. 研究の目的

顎関節症における関節の骨吸収と軟骨破壊を想定し、IL-17 が破骨細胞分化、成熟破骨細胞の機能および軟骨細胞による軟骨基質タンパク代謝に及ぼす分子機構を細胞生物学的に明らかにするために、本研究を企図した。

本研究の目的を遂行するために、3つの視点からアプローチした。平成21年度は、骨破壊に直接関与する破骨細胞に着目し、破骨細胞前駆細胞を IL-17A で直接刺激後、破骨細胞分化と成熟破骨細胞の機能発現とくに骨吸収関連酵素の発現に及ぼす IL-17A の影響を調べた。平成22年度は、RANKL-RANK signaling system による骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞との細胞間相互作用に着目し、骨芽細胞を IL-17A で刺激後、IL-17A が骨芽細胞を介して破骨細胞分化と成熟破骨細胞の機能発現とくに骨吸収関連酵素の発現に及ぼす影響を調べた。また、IL-17A が骨芽細胞の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響も併せて検討した。平成23年度は、軟骨細胞の機能発現に着目し、軟骨細胞による細胞外基質タンパクの合成と分解に及ぼす IL-17F の影響を調べた。

本研究の成果は、単に顎関節症における骨軟骨破壊の分子機構の解明に留まらず、治療薬の開発等にも貢献することが期待される。

3. 研究の方法

本研究は、その目的遂行のために3年間の研究計画を立案した。

(1) 2009年度

破骨細胞前駆細胞を IL-17A で直接刺激し、

破骨細胞の分化と機能発現に及ぼす IL-17A の影響を調べた。

破骨細胞前駆細胞には、マウス単球由来の RAW264.7細胞を用いた。RAW264.7細胞の培養には、10%ウシ胎児血清 (FBS) と1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液の他に、1 mMピルビン酸ナトリウム、2 mM L-グルタミンおよび0.1 mM非必須アミノ酸を含む α -MEM を培養液として用いて、37°C、5%炭酸ガス存在下で行った。破骨細胞形成の確認は、破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP) の染色キットで細胞を染色して調べた。骨芽細胞との細胞間相互作用に不可欠な破骨細胞前駆細胞/破骨細胞の receptor である RANKL receptor (RANK), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) receptor (c-fms) および細胞内シグナル伝達因子 (TRAF, c-fos) の遺伝子発現は real-time PCR 法、タンパク発現は Western blot 法あるいは ELISA 法で調べた。

破骨細胞は、細胞質に存在する炭酸脱水酵素 II 型によって CO₂ と H₂O から炭酸を生成し、その電離によって生じたプロトン (H⁺) が、細胞膜に存在する H⁺-ATPase によって波状縁から細胞外に放出される。放出された H⁺ は、明帯によって閉鎖された空間の環境を低い pH に保ち、骨無機質を溶解する。また、破骨細胞は、MMP-9 とカテプシン K を合成して細胞外に分泌する。分泌されたこれらの酵素は、H⁺ による酸性環境下で骨基質タンパクを加水分解する。本研究では、炭酸脱水酵素 II 型、MMP-9 およびカテプシン K の遺伝子発現を real-time PCR 法、タンパク発現を Western blot 法あるいは ELISA 法で調べた。

(2) 2010年度

IL-17A が骨芽細胞 (MC3T3-E1細胞) の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を調べた。MC3T3-E1細胞の培養には、10% FBS と1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を含む α -MEM を培養液として用いて、37°C、5%炭酸ガス存在下で行った。MC3T3-E1細胞を種々の濃度の IL-17A で刺激後、様々な種類の炎症性サイトカインの遺伝子発現を real-time PCR 法、タンパク発現を ELISA 法で調べた。

次に、IL-17A が骨芽細胞を介して破骨細胞前駆細胞に間接的に作用することを想定し、IL-17A で MC3T3-E1細胞を刺激して得られた conditioned medium で RAW264.7細胞を培養後、破骨細胞への分化、骨吸収関連酵素の発現および象牙質片上における破骨細胞性吸収窩形成に及ぼす IL-17A の間接的な影響を2009年度の実験手法に従って調べた。

(3) 2011 年度

軟骨細胞を IL-17F で刺激し、軟骨細胞の機能発現とくに細胞外基質タンパクの合成と分解に及ぼす影響を調べた。

軟骨細胞には、市販のヒト正常大腿骨関節軟骨由来の軟骨細胞 (HC 細胞) を用いた。HC 細胞の培養は 15% FBS, 1% insulin-transferrin-selenium-X および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを含む DMEM/F-12 を培養液として用いて、37°C, 5%炭酸ガス存在下で行った。HC 細胞を種々の濃度の IL-17F で刺激後、経日的に細胞外基質タンパクおよびその加水分解に関わる酵素と調節因子の発現を調べた。

細胞数は cell counting kit を用いて経日的に測定した。アルカリホスファターゼ (ALPase) 活性は、p-ニトロフェニルリン酸を基質とし、酵素反応の結果生じる p-ニトロフェノール量を測定して求めた。細胞外基質タンパク、すなわち各 type の collagen, aggrecan core, link protein 等の遺伝子発現は real-time PCR 法、タンパク発現は Western blot 法あるいは ELISA 法で調べた。細胞外基質タンパク分解酵素とその調節因子、すなわち matrix metalloproteinase (MMP), tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP), tissue type plasminogen activator (tPA), urokinase type PA (uPA) および PA inhibitor-1 (PAI-1) の遺伝子発現は real-time PCR 法、タンパク発現は Western blot 法あるいは ELISA 法で調べた。

4. 研究成果

(1) 2009 年度

RAW264.7 細胞は type A と type C の IL-17 receptor (IL-17R) を発現しており、type A の IL-17R 発現は IL-17A 刺激により増加した。IL-17A は RAW264.7 細胞の TRAP 染色性を低下させ、TRAP 陽性の多核の破骨細胞様細胞数を減少させた (図 1)。

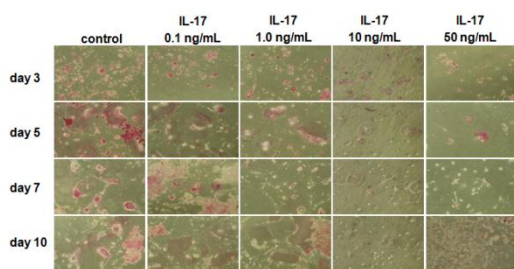


図 1 RAW264.7 細胞の TRAP 染色像

IL-17A 刺激によって MMP-9 とカテプシン K 発現は有意に低下したが、炭酸脱水酵素 II 型発現にはその影響が認められなかった。なお、IL-17A 刺激によるこれらの変化は、IL-17 中和抗体の存在下で完全にブロックさ

れた。IL-17A 刺激によって c-fms 発現は低下したが、RANK 発現にはその影響が認められなかった。以上のことから、IL-17A は、破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化を抑制し、破骨細胞の骨吸収に関連するプロテアーゼ発現を低下させて、骨基質タンパクの加水分解を抑制することが示唆された (Biochimie 92, 398-404, 2010)。

また、関連研究から、MC3T3-E1 細胞に圧迫力を付加すると、IL-17 と IL-17R の全ての subtype の発現が誘導されること、圧迫力は、IL-17 と IL-17R 産生増加を介して骨芽細胞の RANKL と M-CSF の発現を増加させ、osteoprotegerin 発現を低下させた (Connect Tissue Res 51, 359-369, 2010)。

(2) 2010 年度

IL-17A は prostaglandin E₂ (PGE₂) 産生を増加させ、その autocrine 機構によって骨吸収に関連する炎症性サイトカイン産生を促進することが明らかになった (Arch Oral Biol 55, 679-688, 2010)。

IL-17A は RAW264.7 細胞の破骨細胞への分化を骨芽細胞を介して間接的に促進し、破骨細胞のカテプシン K と MMP-9 発現を間接的に増加させたが、炭酸脱水酵素 II 型発現には影響を及ぼさなかった (図 2)。

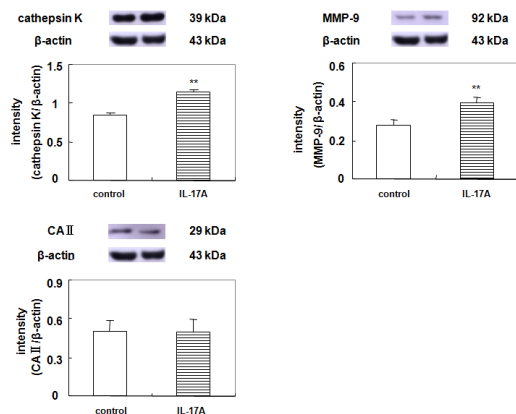


図 2 炭酸脱水酵素 (CA II), カテプシン K, MMP-9 のタンパク発現に及ぼす IL-17A の影響

象牙質片上に形成される吸収窩の数には IL-17A 刺激の影響が認めなかったが、吸収窩の形態には違いを認めた。cyclooxygenase-2 (COX-2) 選択阻害剤のセレコキシブは、RAW264.7 細胞の破骨細胞への分化、カテプシン K および MMP-9 発現の誘導を抑制した。siRNA で MC3T3-E1 細胞の COX-2 発現を抑制すると、RAW264.7 細胞のカテプシン K および MMP-9 発現誘導が抑制された。これらの結果から、IL-17A は、骨芽細胞の PGE₂ 産生増加を介して、破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化と成熟破骨細胞の機能発現を促進することが示唆され

た。また、セレコキシブは、PGE₂ を介した IL-17A による骨基質タンパクの加水分解を抑制することが示唆された (*Biochimie* **93**, 296-305, 2011)。

(3) 2011 年度

IL-17F は、軟骨細胞の MMP-1, -3, -13, COX-2 発現と PGE₂ 産生を増加させ、TIMP-2, -4, II 型 collagen, aggrecan, link protein, COX-1 発現を減少させた。MMP-2, -14, TIMP-1, -3 発現には変化を認めなかった。NS-398 は、IL-17F による TIMP-4, aggrecan, link protein 発現の減少効果をブロックした (図 3) (*Cytokine* **56**, 376-386, 2011)。

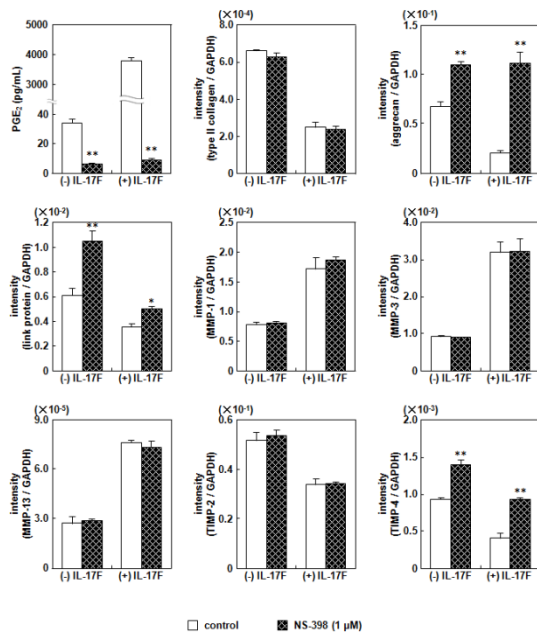


図 3 PGE₂ 産生、各種 MMP と TIMP の遺伝子発現に及ぼす IL-17A およびセレコキシブの影響

IL-17F は、軟骨細胞の PAI-1, COX-2 発現と PGE₂ 産生を増加させ、uPA と COX-1 発現を減少させたが、tPA 発現には変化を認めなかった。NS-398 は、IL-17F による uPA と PAI-1 発現の減少効果と増加効果をブロックした (*Hard Tissue Biol* **20**, 193-200, 2011)。以上の結果から、IL-17F は、軟骨細胞による軟骨基質タンパク合成を抑制し、MMP-1, -3, -13 発現増加と TIMP-2, -4 発現低下により軟骨基質タンパク代謝を分解系に傾けること、軟骨細胞の PAI-1 発現増加と uPA 発現減少により plasminogen/plasmin 経路による軟骨基質の分解を抑制することが示唆された。また、軟骨基質タンパク代謝に関わる分子の発現には、PGE₂ の autocrine 機構の関与が示唆された。

次に、自己免疫疾患や炎症性疾患において

IL-17A が骨芽細胞に作用することを想定し、IL-17A が細胞外基質タンパクの発現と石灰化 nodule 形成に及ぼす影響を調べた。その結果、IL-17A は骨芽細胞の ECMP 発現を誘導するが、骨の石灰化には影響しないことが明らかになった (*Hard Tissue Biol* **20**, 251-262, 2011)。また、破骨細胞前駆細胞を IL-17A で刺激すると IL-18R accessory protein 産生が増加すること、破骨細胞前駆細胞を IL-17A で刺激後の培養上清に IL-18 を加えて調整した培地を CD4⁺T リンパ球に振りかけると、TNF- α 産生には変化を認めなかったが、破骨細胞分化を抑制する GM-CSF 産生が増加することが明らかになった。

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 7 件)

- ① Kuwabara A, Tanabe N, Kawato T, Tanaka H, Nakai K, Inuma T, Oki H, Motohashi M, Maeno M (2011) Interleukin-17A induces extracellular matrix protein expression in osteoblastic ROS-17/2.8 cells. *J Hard Tissue Biol* **20**(3), 251-262.
- ② Tanigawa M, Kawato T, Aida Y, Suzuki N, Ochiai K, Matsumura H, Maeno M (2011) Interleukin-17F down-regulates plasminogen/plasmin pathway in chondrocytes. *J Hard Tissue Biol* **20**(3), 193-200.
- ③ Tanigawa S, Aida Y, Kawato T, Honda K, Nakayama G, Motohashi M, Suzuki N, Ochiai K, Matsumura H, Maeno M (2011) Interleukin-17F affects cartilage matrix turnover by increasing the expression of collagenases and stromelysin-1 and by decreasing the expression of their inhibitors and extracellular matrix components in chondrocytes. *Cytokine* **56**(2), 376-386.
- ④ Zhang F, Tanaka H, Kawato T, Kitami S, Nakai K, Motohashi M, Suzuki N, Wang C, Ochiai K, Isokawa K, Maeno M (2011) Interleukin-17A induces cathepsin K and MMP-9 expression in osteoclasts via celecoxib-blocked prostaglandin E₂ in osteoblasts. *Biochimie* **93**(2), 296-305.
- ⑤ Zhang F, Koyama Y, Sanuki R, Mitsui N, Suzuki N, Kimura A, Nakajima A, Shimizu N, Maeno M (2010) IL-17A stimulates the expression of inflammatory cytokines via celecoxib-blocked prostaglandin in MC3T3-E1 cells. *Arch Oral Biol* **55**(9), 679-688.

- ⑥ Zhang F, Wang C, Koyama Y, Mitsui N, Shionome C, Sanuki R, Suzuki N, Mayahara K, Shimizu N, Maeno M (2010) Compressive force stimulates the gene expression of IL-17s and their receptors in MC3T3-E1 cells. *Connect Tissue Res* 51(5), 359-369.
- ⑦ Kitami S, Tanaka H, Kawato T, Tanabe N, Katono-Tani T, Zhang F, Suzuki N, Yonehara Y, Maeno M (2010) IL-17A suppresses the expression of bone resorption-related proteinases and osteoclast differentiation via IL-17RA or IL-17RC receptors in RAW264.7 cells. *Biochimie* 92(4), 398-404.

〔学会発表〕 (計 12 件)

- ① 桑原亜貴子 他 6 名 (2011 年 10 月 9 日) IL-17 は骨芽細胞の骨基質タンパク発現を増加させる。第 60 回日本口腔衛生学会・総会, 日本大学松戸歯学部, 千葉
- ② 北見 聡 他 6 名 (2011 年 10 月 9 日) インターロイキン-17A はプロスタグランジン E₂ を介して骨芽細胞の炎症性サイトカイン産生を促進する。第 60 回日本口腔衛生学会・総会, 日本大学松戸歯学部, 千葉
- ③ 田中秀樹 他 7 名 (2011 年 10 月 9 日) IL-17A は骨芽細胞の PGE₂ 産生を介して RAW264.7 細胞の骨基質タンパク分解酵素の発現を増加させる。第 60 回日本口腔衛生学会・総会, 日本大学松戸歯学部, 千葉
- ④ 谷川志保子 他 6 名 (2011 年 8 月 27 日) IL-17F は破骨細胞による PGE₂ 産生を介してアグリカン, リンクプロテインおよび TIMP-4 の発現を促進させる。第 20 回硬組織再生生物学会学術大会・総会, 日本大学歯学部, 東京
- ⑤ 前野正夫 (2010 年 9 月 27 日) IL-17A regulates the differentiation and function of osteoclasts. 特別招待講演, 山東大学口腔科学院, 済南, 中国
- ⑥ 北見 聡 他 5 名 (2010 年 7 月 17 日) IL-17A suppresses proteinase expression and osteoclast differentiation in RAW-264.7 cells. 88th General Session & Exhibition of IADR, Barcelona, Spain
- ⑦ 谷川志保子 他 7 名 (2010 年 5 月 15 日) IL-17F は軟骨細胞による軟骨基質タンパク代謝を分解系に傾ける。第 62 回日本大学歯学会総会, 日本大学歯学部, 東京
- ⑧ 北見 聡 他 6 名 (2010 年 3 月 6 日) IL-17 は破骨細胞の分化とタンパク分解酵素の発現を抑制する。平成 22 年口腔衛生関東地方研究会総会・学術大会, 日本歯科大学, 東京
- ⑨ 北見 聡 他 7 名 (2009 年 10 月 11 日) インターロイキン-17 は破骨細胞のタンパク分

解酵素の発現を抑制する。第 58 回日本口腔衛生学会・総会, 長良川国際会議場, 岐阜

- ⑩ 北見 聡 他 8 名 (2009 年 9 月 5 日) IL-17 は破骨細胞前駆細胞の分化とプロテアーゼの発現を抑制する。第 18 回硬組織再生生物学会学術大会・総会, 北海道医療大学札幌キャンパス, 北海道
- ⑪ 張 凡 他 8 名 (2009 年 9 月 5 日) メカニカルストレスは骨芽細胞が産生する IL-17 とそのレセプター発現を促進する。第 18 回硬組織再生生物学会学術大会・総会, 北海道医療大学札幌キャンパス, 北海道
- ⑫ 北見 聡 他 6 名 (2009 年 5 月 16 日) IL-17 は破骨細胞の分化とプロテアーゼの発現を抑制する。第 61 回日本大学歯学会総会, 日本大学歯学部, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前野 正夫 (MAENO MASAO)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号: 60147618

(2) 研究分担者

鈴木 直人 (SUZUKI NAOTO)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号: 10226532
川戸 貴行 (KAWATO TAKAYUKI)
日本大学・歯学部・講師
研究者番号: 50386075