

平成30年6月15日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20605

研究課題名(和文) IL-17シグナリングを標的としたアクチビンの炎症性関節破壊治療への応用

研究課題名(英文) Involvement of Activin-A in inflammatory joint disease targeted to IL-17 signaling

研究代表者

三次 翔 (MITSUGI, SHO)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00636920

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)：IL-17による炎症性関節破壊に対する修飾作用の検証に先行して、アクチビン単独刺激が破骨細胞分化に及ぼす影響について検討した。

RANKLにより誘導される破骨細胞分化やアクチンリング形成、および骨吸収活性はアクチビン添加により有意に亢進した。また、破骨細胞分化マーカーであるcathepsin K、OC-STAMP、MMP9遺伝子の発現誘導もアクチビンの添加により亢進した。この分子メカニズムとして、アクチビンが破骨細胞前駆細胞内のsmad2/3とc-fosの相互作用を介して、破骨細胞破骨細胞分化のマスター転写因子であるNFATc1の発現を亢進することを証明した。

研究成果の概要(英文)：Prior to the elucidation of the modulatory effects on inflammatory joint disease by IL-17, the effect of activin-A alone on osteoclast differentiation was examined.

RANKL-induced osteoclast differentiation, actin ring formation, and bone resorption activity were significantly enhanced by activin-A. Furthermore, activin-A enhanced RANKL-induced expression of nuclear factor of activated T cell cytoplasmic 1 (NFATc1), a key regulator of osteoclastogenesis, thereby increasing osteoclastogenesis-related marker gene expression, including cathepsin K, OC-STAMP, MMP 9. Pre-treatment of the cells with a specific inhibitor of SMAD2/3 attenuated the activin-A-induced expression of NFATc1 and co-immunoprecipitation assay revealed that treatment with activin-A increased physical interaction of phosphorylated-c-fos and phosphorylated-SMAD2 protein induced by RANKL. These results suggest that activin-A enhances RANKL-induced osteoclast formation mediated by interaction of c-fos and SMAD2/3.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アクチビン 破骨細胞 顎関節

## 1. 研究開始当初の背景

顎関節の変形性関節症 (Osteoarthritis, OA) は、メカニカルストレスや炎症性サイトカインなどの様々な刺激により関節組織が変形し、臨床的には可動域の制限、開口時の疼痛を呈する難治性疾患である。OA の病態形成に関わる数多くの因子のなかで、IL-17 は顎関節症患者の滑液中で分泌が亢進しており (文献 1) その強い炎症誘導能により骨軟骨破壊に関与することが報告されている (文献 2)。一方、TGF- $\beta$  ファミリーのサイトカインであるアクチピンは関節炎の滑膜において、炎症性サイトカインの増加に伴って、その発現が亢進する (文献 3)。アクチピンは関節炎滑膜細胞における IL-6 活性を抑制すること (文献 4) や、炎症性サイトカインに誘導されるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) や ADAMTS などのマトリックス分解酵素による軟骨基質の破壊の抑制を介して、関節軟骨の恒常性維持に関与することが示唆されている (文献 5, 6)。申請者らは、これまでマウス前軟骨細胞株 ATDC5 の軟骨分化に対するアクチピンの影響とそのメカニズムについて分子生物学的な解析を行ってきた (文献 7)。

先の研究で、われわれは、アクチピンを前軟骨細胞に作用させたところ、細胞内シグナルを介して Sox9 の遺伝子発現が低下し、軟骨細胞分化が抑制されることを明らかにした (文献 7)。この結果から、アクチピンは軟骨細胞の分化を負に制御し、顎関節部における肥大軟骨細胞への過剰な分化亢進を抑えることで、変形性顎関節症の病態形成に対して抑制的に作用する可能性が考えられた。

また、われわれはヒト滑膜肉腫細胞 HS-SY-1 に IL-17 を添加することで軟骨基質分解に関与するアグリカナーゼ ADAMTS4 とマトリックスメタロプロテアーゼ MMP3 の遺伝子発現が上昇することを明らかにしている。

## 2. 研究の目的

IL-17 による炎症性関節破壊に対する修飾作用の検証に先行して、アクチピン単独の骨軟骨代謝に及ぼす影響を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) マウス単球マクロファージの破骨細胞分化に対するアクチピンの影響について

マウス単球マクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞 (Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan) を 10% ウシ胎仔血清、ペニシリン G カリウム塩およびストレプトマイシンを添加した  $\alpha$ -MEM で、37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$  の条件下で培養した。破骨細胞分化誘導因子として RANKL (40 ng/ml) で刺激を行い、アクチピン (50 ng/ml) の存在下または非存在下で 6 日間培養して生成させた成熟破骨細胞に対して Acid phosphatase, Leukocyte (TRAP) kit (Sigma-Aldrich) を用いて TRAP

染色を行なった。3 つ以上の核を含む TRAP 陽性多核細胞として顕微鏡を用いて計測した。

### (2) アクチンリング染色

RAW264.7 細胞を  $1.0 \times 10^6$  cell/well の細胞濃度で、6 ウェルプレート上で 5 日間培養した。培養した細胞を PBS で洗浄後、4% パラホルムアルデヒドで固定した。0.2% TritonX-100 を用いて室温で 10 分間処理して再度 PBS 中で洗浄した後、Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて室温で 60 分間インキュベートした。次に PBS で洗浄し、DAPI 染色剤 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) で核染色を行い室温で乾燥させた。標本は BZ-9000 蛍光顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) を用いて撮影して BZ-II imaging software (Keyence) を用いて画像処理を行った。

### (3) 骨吸収活性プレートの使用による破骨細胞の骨吸収活性に対するアクチピンの影響について

マウス骨髄由来マクロファージ (BMMs) を M-CSF (20 ng/ml) で 3 日間刺激して破骨細胞前駆細胞に分化させた後、破骨細胞分化誘導因子として M-CSF (20 ng/ml) および RANKL (40 ng/ml) で刺激してアクチピン (50 ng/ml) の存在下または非存在下で Osteo Assay Stripwell plate<sup>®</sup> (Corning Inc.) に細胞を播種して 7 日間培養した。プロトコールに従い、細胞を除去し、蒸留水で十分に洗浄後、室温下で乾燥させた。プレートを蛍光顕微鏡下で観察し、Image J ソフトウェア (National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov>) を用いて画像解析を行い、骨吸収面積を計測した。

### (4) RAW264.7 細胞における RANKL 誘導の破骨細胞分化関連遺伝子の発現に対するアクチピンの効果

RAW264.7 細胞に RANKL (40 ng/ml) 刺激を行い、アクチピン (50 ng/ml) 存在下または非存在下で 72 時間培養した上清サンプルを回収し、 $\beta$ -actin、trap、oc-stamp、cathepsin-k の遺伝子発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法によって定量した。

### (5) RAW264.7 細胞および BMMs における RANKL 誘導の NFATc1 の発現に対するアクチピンの効果

RAW264.7 細胞に RANKL (40 ng/ml) 刺激を行い、アクチピン (50 ng/ml) 存在下または非存在下で 48 時間培養した上清サンプルから *nfatc1* の mRNA 発現についてリアルタイム RT-PCR 法によって解析した。また、同様に 72 時間培養したサンプルからウェスタンブロッティング法を用いて NFATc1 のタンパク発現量を測定した。そして、BMMs を用いて M-CSF (20 ng/ml) および RANKL (40

ng/ml)で刺激を行い、アクチビン(50 ng/ml)存在下または非存在下で 48 時間培養したサンプルからウェスタンブロッティング法を用いて NFATc1 のタンパク発現量を測定した。

(6) RAW264.7 細胞における RANKL 誘導の破骨細胞分化シグナルの発現に対するアクチビンの効果

RAW264.7 細胞に RANKL (40 ng/ml) およびアクチビン(50 ng/ml)で刺激を行い、条件を変えて 48 時間、1 時間、0.5 時間培養し、NFATc1 の上流にある細胞内シグナル伝達分子である c-fos、I $\kappa$ B- $\alpha$ 、MAPKs (ERK、JNK、p38) のタンパク発現についてウェスタンブロッティング法を用いて解析した。

(7) RANKL およびアクチビンで刺激した RAW264.7 細胞における NFATc1 の発現に対する SMAD シグナルの効果

RAW264.7 細胞を SMAD 2/3 の選択的阻害剤 SIS3 (10 $\mu$ m)で 1 時間前処理を行い、RANKL (40 ng/ml)および アクチビン (50 ng/ml)で刺激を行い、48 時間培養して *nfatc1* の mRNA 発現を測定した。データは平均 $\pm$ 標準偏差(n=3)、有意差 \*\* p < 0.01 とした。また、RAW264.7 細胞を RANKL (40 ng/ml) および activin-A (50 ng/ml)で刺激を行い、1 時間培養したサンプルから p-SMAD2、p-c-fos のタンパク発現の解析を行った。抗 p-c-fos 抗体と結合させた磁気ビーズを用いて回収した細胞溶解物で免疫沈降法を行い、p-SMAD2 のタンパク発現を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) アクチビンによるマウス単球マクロファージ細胞の破骨細胞分化の亢進

BMMs を用いた培養系において、アクチビンの添加により、RANKL により誘導される TRAP 陽性多核細胞の亢進が確認された(データ未掲載)。さらに、RAW264.7 細胞を使用した培養系についてもアクチビンによる RANKL 誘導下の TRAP 陽性多核細胞形成の増強が確認された。このアクチビン併用条件下による RAW264.7 細胞の破骨細胞形成数は、RANKL 単独群と比較して、47.2% 増加した(図 1A、図 1B)。

(2) マウス単球マクロファージ細胞の破骨細胞分化過程のアクチンリング形成をアクチビンが亢進する

RAW264.7 細胞において RANKL 刺激下でアクチンリングの形成の増強を認めた。さらにアクチビン処理によって明確なアクチンリングの形成数が有意に増加した(図 1C)。

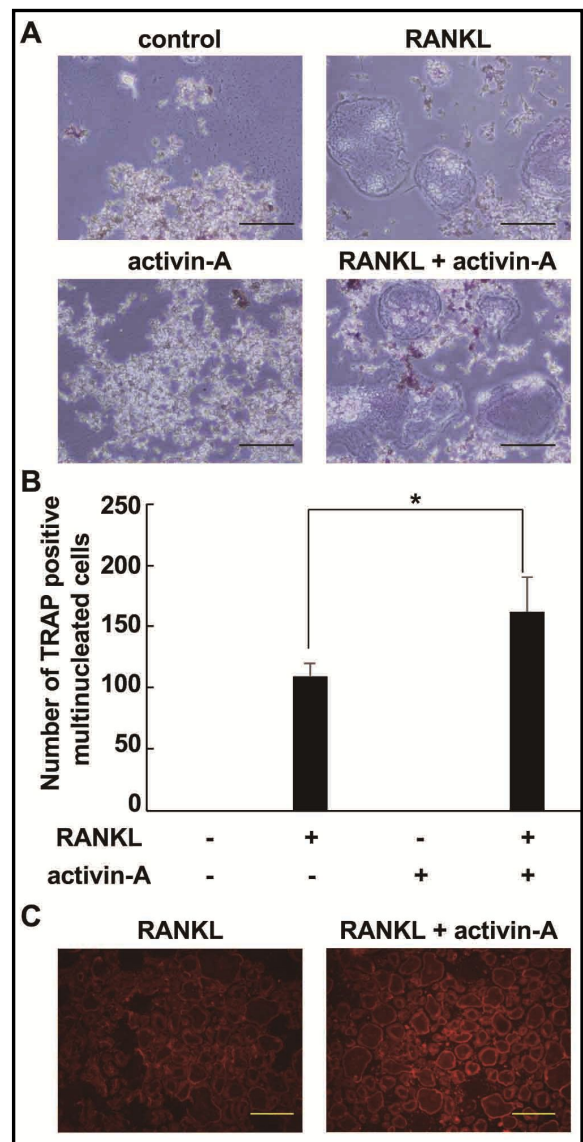


図 1

(3) アクチビンによる破骨細胞の骨吸収活性の亢進

RANKL 処理群、RANKL+アクチビン処理群の BMMs で骨吸収窩形成を認めた。骨吸収面積を測定したところ、RANKL 処理群と比較して、RANKL+アクチビン処理群で各 well の底面の総面積に対する骨吸収面積の割合に有意な増加が認められた(図 2)。

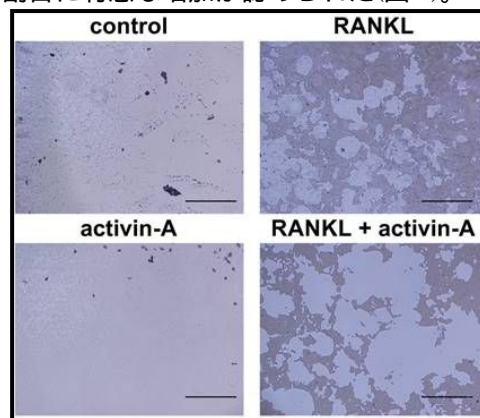


図 2

(4) アクチピンによる RAW264.7 細胞における RANKL 誘導の破骨細胞分化関連遺伝子の発現の亢進

RANKL によって *trap* (図 3A)、*oc-stamp* (図 3B)、および *cathepsin k* (図 3C) といった破骨細胞分化関連遺伝子の発現誘導が確認された。さらに、アクチピンの併用添加によって RANKL 単独群と比較して、破骨細胞分化関連遺伝子の発現誘導の有意な増加が観察された。

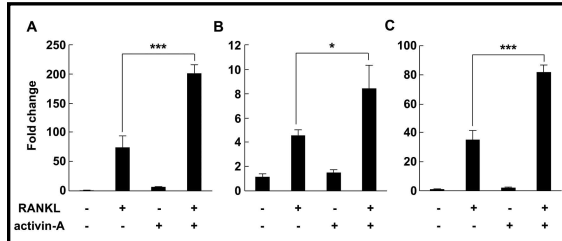


図 3

(5) アクチピンによる RANKL 誘導の NFATc1 の発現の亢進

リアルタイム RT-PCR 法による解析で RAW264.7 細胞においてアクチピンによる処理で RANKL 誘導の *nfatc1* mRNA 発現の有意な上昇を認めた(図 4A)。また、タンパクレベルでも NFATc1 の発現は RANKL 群で増加し、さらにアクチピン処理を行うことによって発現の上昇を認めた(図 4B)。同様の実験を BMMs で行なったところ、RAW264.7 細胞と同様に NFATc1 の発現の増強を認めた(図 4C)。

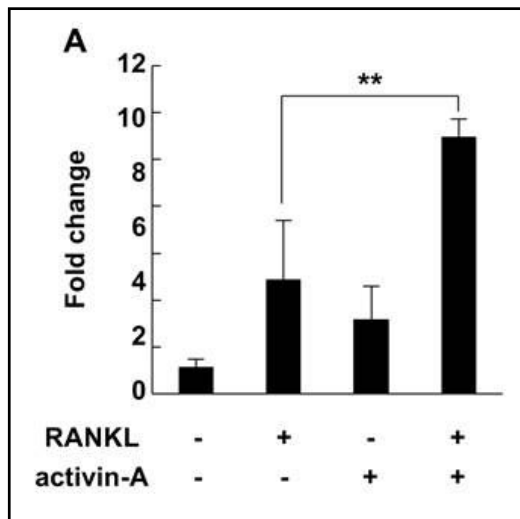


図 4A

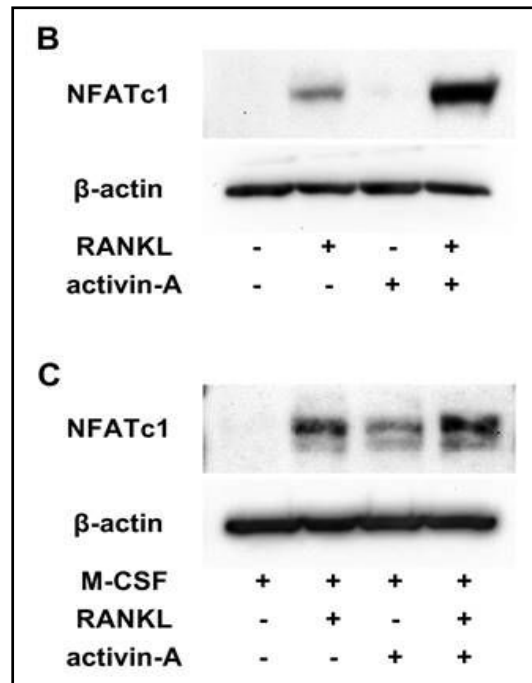


図 4B,C

(6) RAW264.7 細胞における RANKL 誘導の破骨細胞分化シグナル誘導に対するアクチピンの効果

RAW264.7 細胞を RANKL 処理したところ、細胞内シグナルタンパクの活性化が観察された。その中で、RANKL により誘導される *c-fos* タンパクの発現レベルはアクチピン処理により、上昇が確認された(図 5A)。しかしながら、RANKL による MAPKs (ERK, p38, JNK)を構成する 3 つのタンパクのリン酸化亢進、および I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解として評価される NF- $\kappa$ B 経路の活性化は、アクチピン処理による影響を示さなかった(図 5B, 5C)。

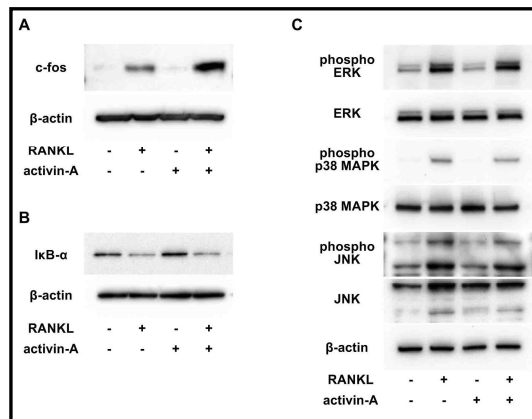


図 5

(7) RANKL およびアクチピンで刺激した RAW264.7 細胞における NFATc1 の発現に対する SMAD シグナルの効果

アクチピンによる RANKL 誘導の *nfatc1* 発現の増加は、SMAD2/3 阻害剤である SIS3 による前処理によって抑制された(図 6A)。そこで、アクチピンが *c-fos* に作用することによって破骨細胞の分化を促進して

いるという仮説の下、c-fos および SMAD2 の活性化を調べた。

RANKL およびアクチピンがそれぞれ c-fos および SMAD2 のリン酸化を増強することが確認された (図 6B)。さらに、phospho-c-fos 抗体を用いた免疫沈降法において、phospho-SMAD2 のタンパクの発現を認めた (図 6C)。

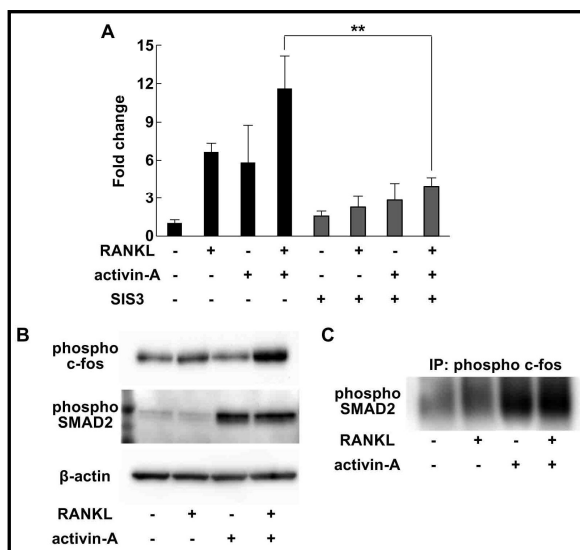


図 6

これらの結果から、破骨細胞形成に対するアクチピンの促進能は、SMAD2/3 と c-fos タンパク間の相互作用の亢進による NFATc1 発現の増強によって誘導されると結論付けた。

#### 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 3 件)

Kajita T, Ariyoshi W, Okinaga T, Mitsugi S, Tominaga K, Nishihara T. Mechanisms involved in enhancement of osteoclast formation by activating-A. J Cell Biochem. 査読有、2018 May 8. DOI:10.1002/jcb.26906

Furuta J, Ariyoshi W, Okinaga T, Takeuchi J, Mitsugi S, Tominaga K, Nishihara T. High molecular weight hyaluronic acid regulates MMP13 expression in chondrocytes via DUSP10/MKP5. J orthop Res. 査読有、2017 Feb;35(2):331-339.

三次 翔、宮本 郁也、吉賀 大午、松尾 拓、高橋 哲、富永 和宏：末梢血幹細胞移植後 GVHD 患者に生じた多発性舌腫瘍の 1 例、日本口腔外科学会雑誌、査読有、2016.10;62 巻 10 号：529-533.

##### [学会発表](計 9 件)

三次 翔、吉賀 大午、國領 真也、富永 和宏、吉岡 泉：製鉄記念八幡病院における周術期呼吸空機能管理の取り組

みと上部消化管手術の術後肺炎発症の予防効果、第 27 回日本有病者歯科医療学会学術大会、船橋、2018.3.23.

梶田 倫功、三次 翔、土生 学、笹栗 正明、富永 和宏：Activin-A による破骨細胞分化誘導機構の解明、第 71 回日本口腔科学会学術集会、愛媛、2017.4.27.

平林 文香、吉岡 泉、國領 真也、土生 学、大澤 賢次、大谷 泰志、三次 翔、藤井 誠子、引地 尚子、富永 和宏：当科における顎関節症の臨床統計的観察 20 年前との比較、第 30 回日本顎関節学会学術集会、横浜、2017.7.29.

吉賀 大午、田中 純平、坂口 修、三次 翔、高橋 理、鶴島 弘基、國領 真也、土生 学、笹栗 正明、吉岡 泉、富永 和宏：MRONJ 患者に対する VELscope を用いた骨蛍光標識法による外科療法の臨床的検討、第 77 回九州歯科学会学術集会、北九州、2017.5.21.

三次 翔、吉岡 泉、藤井 航、木村 貴之、藤井 誠子、田中 純平、早川 真奈、國領 真也、柿木 保明、富永 和宏、西原 達次：製鉄記念八幡病院での周術期口腔機能管理の取り組みと術後肺炎の予防効果、第 77 回九州歯科学会学術集会、北九州、2017.5.21.

朴 真実、土生 学、笹栗 正明、上原 雅隆、岩永 賢二郎、吉賀 大午、高橋 理、三次 翔、藤井 誠子、早川 真奈、富永 和宏：九州歯科大学附属病院顎顔面外科における 2015-2016 新患者の臨床統計学的観察、第 77 回九州歯科学会学術集会、北九州、2017.5.21.

梶田 倫功、有吉 渉、沖永 敏則、三次 翔、富永 和宏、西原 達次：破骨細胞の分化過程における Activin-A の誘導機構の解明、第 77 回九州歯科学会学術集会、北九州、2017.5.21.

笹栗 正明、土生 学、左合 徹平、立花香織理、藤井 誠子、三次 翔、早川 真奈、山口 喜一郎、小川 昌洋、中富 満城、渡邊 誠之、富永 和宏：本学における口唇口蓋裂海外医療援助活動、第 77 回九州歯科学会学術集会、北九州、2017.5.21.

三次 翔、藤井 航、早川 真奈、田中 純平、藤井 誠子、國領 真也、富永 和宏、吉岡 泉：製鉄記念八幡病院における周術期口腔機能管理の取り組み、術後肺炎発症率の検討、第 61 回日本口腔外科学会学術大会、幕張、2016.11.26.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三次 翔 (MITSUGI SHO)  
九州歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：00636920

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし