

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792008

研究課題名(和文) 活性型リンパ球と破骨細胞前駆細胞の相互作用による破骨細胞分化調節機能の解明

研究課題名(英文) The effects of cell interaction between osteoclast precursor cell and T cell on osteoclast differentiation.

研究代表者

川戸 貴行 (KAWATO, Takayuki)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：50386075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：IL-18は、T細胞のGM-CSF産生を介して破骨細胞分化を抑制する。本研究では、RANKLで刺激した破骨細胞前駆細胞(RAW264.7細胞)がCD4+T細胞のIL-18誘導性GM-CSF発現に及ぼす影響を調べた。RANKL刺激でRAW264.7細胞の破骨細胞への分化と培養上清中のIL-18 binding protein (BP) 産生は促進された。この培養上清中でCD4+T細胞をIL-18刺激しても、GM-CSF産生は増加しなかった。本結果から、RANKLで刺激したRAW264.7細胞は、IL-18BP産生増加を介してCD4+T細胞のIL-18誘導性GM-CSF発現を抑制すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that IL-18 suppresses osteoclastogenesis by increasing GM-CSF production in T-cells. We examined the effect of RANKL-stimulated osteoclast precursors (RAW264.7 cells) on GM-CSF expression in IL-18-stimulated CD4+T-cells. RAW264.7 cells were induced into osteoclasts in the presence of RANKL. The production of IL-18 binding protein (BP) was increased in the culture medium derived from RANKL-stimulated RAW264.7 cells compared to unstimulated cells. GM-CSF expression in CD4+T-cells stimulated with IL-18 was suppressed by the addition of conditioned medium from RANKL-stimulated RAW264.7 cells. These results suggested that IL-18BP derived from RANKL-stimulated RAW264.7 cells blocks the stimulatory effects of IL-18 on GM-CSF expression in CD4+T-cells.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：IL-18 IL-18 binding protein GM-CSF RANKL 破骨細胞 T細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、骨代謝における生体防御を担う細胞の Interleukin (IL)-17 および IL-18 を介した細胞間相互作用が明らかにされつつある。これまでの報告では、Th17 細胞が産生する IL-17 は、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を促進する因子として捉えられていた。しかし、申請者が所属する研究室では、IL-17 は、骨芽細胞や軟骨細胞などの間葉系細胞に対しては、いずれも骨・軟骨代謝のバランスを分解方向に導く一方で、単球/マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞への IL-17 の直接作用では、破骨細胞形成と成熟破骨細胞による骨吸収能を共に抑制することを明らかにした。

一方、マクロファージ、樹状細胞および骨芽細胞が産生する IL-18 は、CD4⁺ T リンパ球の granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 産生を促し、GM-CSF が破骨細胞前駆細胞に作用することで、破骨細胞への分化を抑制することが知られている。申請者は、本研究を立案するための予備実験において、IL-18 と IL-18 受容体との結合を補助する IL-18 receptor accessory protein (IL-18RAP) ならびに IL-18 と IL-18 受容体との結合を阻害する decoy 受容体である IL-18 binding protein (IL-18BP) を、破骨細胞前駆細胞が発現することを確認した。

2. 研究の目的

上記の研究背景をもとに、本研究では、T リンパ球と破骨細胞前駆細胞の IL-17 と IL-18 を介した細胞間相互作用が、破骨細胞前駆細胞の成熟破骨細胞への分化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。また、全身の健康状態と骨代謝との関連性を明らかにするための関連実験として、血圧調節因子である Angiotensin II が骨芽細胞の骨基質タンパク代謝調節機能に及ぼす影響、ならびに肝機能と炎症性骨吸収を主症状とする辺縁性歯周炎との関連性についても検討した。

3. 研究の方法

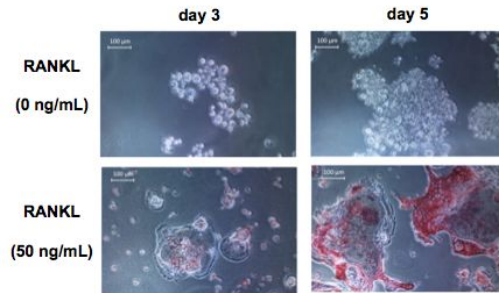
本研究では、破骨細胞前駆細胞として、マウス単球/マクロファージ系株化細胞である RAW264.7 細胞 (RAW 細胞) を、T リンパ球として、マウス脾臓組織から分離した CD4⁺ T 細胞を、骨芽細胞様細胞としてラット骨肉腫由来株化細胞である ROS17/2.8 細胞 (ROS 細胞) を、それぞれ用いた。RAW 細胞の成熟破骨細胞の分化誘導には、receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) を用いた。RAW 細胞の IL-18、IL-18RAP および IL-18BP、ならびに ROS 細胞の骨基質タンパクとタンパク分解酵素の遺伝子およびタンパク発現は、Real-time PCR 法と Western blotting 法で調べた。また CD4⁺ T 細胞の GM-CSF 発現は、ELISA 法で調べた。上記以外に本研究で用いた実験方法は、結果とともに研究成果の欄に記載した。

4. 研究成果

(1) IL-17 および RANKL が RAW 細胞の IL-18 受容体、IL-18RAP および IL-18BP 発現に及ぼす影響

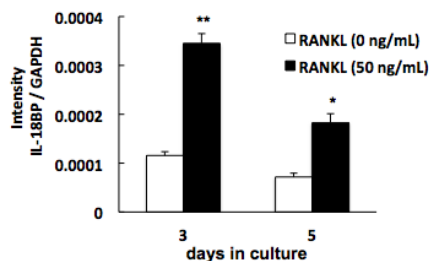
本研究では、最初に、RAW 細胞を RANKL 存在下および非存在下で培養し、成熟破骨細胞への分化を酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色で確認した。その結果、RANKL 存在下においてのみ、成熟破骨細胞への分化を示す TRAP 陽性の多核の巨細胞が確認された(図 1)。

図 1: RAW 細胞の TRAP 染色像



次に RANKL 存在下および非存在下で RAW 細胞を IL-17 刺激して、IL-18 受容体と IL-18RAP の遺伝子発現を検討した。その結果、RANKL および IL-18 刺激の有無に関わらず、RAW 細胞に IL-18 受容体の遺伝子の発現は認められなかった。一方、IL-18RAP 遺伝子は、RANKL の有無に関わらず IL-17 刺激で増加した。そこで、RAW 細胞の培養上清中の IL-18RAP のタンパクレベルを調べたところ、培養上清中に IL-18RAP タンパクが確認されたものの、その発現レベルは著しく低く、また IL-17 刺激の影響も認められなかった。次に、RAW 細胞の IL-18BP 発現について調べた結果、RANKL 非存在下に比べて RANKL 存在下で、IL-18BP 遺伝子の発現増加が認められた(図 2)。なお、IL-17 刺激は、RANKL の有無に関わらず IL-18BP 発現に影響しなかった。

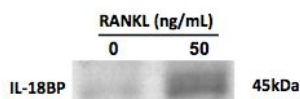
図 2: RANKL が RAW 細胞の IL-18BP 遺伝子発現に及ぼす影響



そこで、RAW 細胞の培養上清中の IL-18BP タンパクレベルを検討した結果、遺伝子発現の結果と同様に、RANKL 刺激で IL-18BP タンパクの増加が確認された(図 3)。なお、IL-18RAP と IL-18BP のタンパク構造を文献

的に詳細に調べたところ、IL-18RAP は IL-18 受容体と同様に膜型タンパクであり、細胞外へ分泌される可能性が低い一方で、IL-18BP は細胞外に分泌される液性タンパクであることが判明した。

図 3: RANKL が RAW 細胞培養上清中の IL-18BP タンパク発現に及ぼす影響



次に本研究では、RANKL 刺激による IL-18BP 発現増加に関する RAW 細胞内のシグナル伝達経路を検索した。その結果、RANKL 刺激を受けた RAW 細胞では、mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達ファミリーである extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, p38 MAPK および stress-activated protein kinases/c-jun N-terminal kinases (SAPK/JNK) のリン酸化が僅かに亢進する傾向が認められた。しかしながら、ERK1/2, p38 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化阻害剤は RANKL による RAW 細胞の破骨細胞への分化を抑制する傾向が認められたため、これら MAPK シグナル伝達因子の、RANKL 誘導性 IL-18BP 発現増加への関与を確認することが出来なかった。

本研究の結果と文献検索で得られた所見から、RANKL は、破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞への分化を促進するとともに IL-18BP 分泌を促進し、破骨細胞の近傍に存在する T リンパ球上に発現する IL-18 受容体と IL-18 との結合に影響を及ぼす可能性が考えられた。

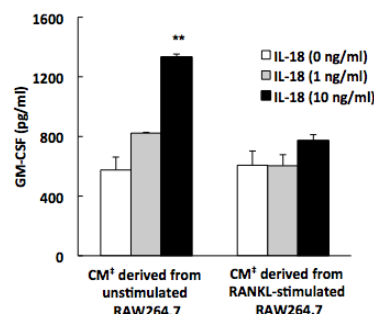
(2) RAW 細胞由来の IL-18BP が CD4⁺ T 細胞の GM-CSF 発現に及ぼす影響

RAW 細胞を RANKL 刺激あるいは未刺激して得られた培養上清から得られた Conditioned Medium (CM) の存在下で、マウス脾臓由来の CD4⁺ T 細胞を IL-18 で刺激し、培養上清中の GM-CSF 発現を検討した。その結果、RANKL 未刺激の RAW 細胞由来の CM 存在下における CD4⁺ T 細胞の GM-CSF 発現は、IL-18 刺激で増加した一方で、RANKL 刺激を受けた RAW 細胞由来の CM 存在下における CD4⁺ T リンパ球の GM-CSF 発現には、IL-18 刺激の影響は認められなかった (図 4)。すなわち、RANKL 刺激を受けた RAW 細胞が産生する IL-18BP は、CD4⁺ T 細胞の IL-18 受容体と IL-18 との結合を阻害し、破骨細胞分化抑制因子である GM-CSF 発現を低下させることが示唆された。

以上の結果から、破骨細胞前駆細胞とリンパ球との細胞間相互作用において、RANKL は、破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞への分化を促進するとともに、IL-18BP 産生増加

を誘導し、リンパ球由来の GM-CSF を介した IL-18 の破骨細胞分化抑制作用を減弱させると考えられた。

図 4: RAW 細胞由来 CM が CD4⁺ T リンパ球の IL-18 誘導性 GM-CSF 産生に及ぼす影響



(3) Angiotensin II が骨芽細胞の骨基質タンパク代謝調節機能に及ぼす影響

Angiotensin II で、ROS 細胞を刺激して、骨基質タンパクである I 型コラーゲン、bone sialoprotein, osteopontin および osteocalcin 発現を検討した。その結果、Angiotensin II 刺激で osteocalcin 発現は減少した一方で、その他の骨基質タンパクの発現に Angiotensin II 刺激の影響は認められなかった。

次に、Angiotensin II 刺激が、ROS 細胞による骨基質タンパク分解酵素とその内因性阻害剤の発現に及ぼす影響を検討した。その結果、Angiotensin II で骨基質タンパク分解酵素の matrix metalloproteinase (MMP)-1 および-3 の発現が低下した。また、MMP-2, MMP-9, MMP-14 ならびに MMP の内因性阻害剤である tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1, -2 および-3 の発現に Angiotensin II 刺激の影響は認められなかった。なお、Angiotensin II 刺激の有無に関わらず、MMP-1 と TIMP-4 の発現は検出されなかった。さらに、Angiotensin II 刺激で、ROS 細胞内の ERK1/2, p38MAPK および SAPK/JNK のリン酸化の亢進が認められ、ERK1/2 および SAPK/JNK のリン酸化阻害剤は、Angiotensin II 誘導性の MMP-3 および-13 発現増加をブロックした。

以上の結果から、血圧上昇因子である Angiotensin II は、骨芽細胞による osteocalcin の発現を低下させる一方で、MMP-1 および-13 の発現を増加させることで、骨基質タンパク代謝を分解系に傾ける可能性が示唆された。また、Angiotensin II による MMP-3 および-13 発現増加には、ERK1/2 および SAPK/JNK シグナル伝達経路が関与すると考えられた。

(4) 辺縁性歯周炎と肝機能との関連性に関する研究

職域成人の定期健康診断結果を用いて、歯周ポケット保有群と非保有群の、血清肝機能マーカー (aspartate aminotransferase; AST, alanine aminotransferase; ALT, gamma-glutamyl transpeptidase;

GPT) レベルを比較した。その結果、歯周ポケット非保有者に比べて保有者は ALT と GGT レベルが有為に高かった。そこで、ALT と GGT を目的変数として、肝機能に影響する因子(年齢、性ならびに飲酒習慣とメタリックシンドロームの有無)で調整して多重ロジスティック回帰分析を行った。その結果、GGT のみにおいて歯周ポケット保有との間に有為な関連性が認められた。アルコール摂取は肝機能に影響することが知られており、GGT は特にアルコールの影響を受けやすく、AST や ALT に影響しない程度の微量のアルコール摂取でも GGT レベルは上昇することが知られている。これらの知見と本研究結果から、歯周病は肝機能に悪影響を及ぼし、その影響は微量のアルコール摂取と同程度である可能性が示唆された。

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4件)

Nakai K, Kawato T, Morita T, Yamazaki Y, Tanaka H, Tonogi M, Oki H, Maeno M (2015) Angiotensin II suppresses osteoblastic differentiation and mineralized nodule formation via AT₁ receptors in ROS17/2.8 cells. Archives of Medical Science, 査読有, in press

Morita T, Yamazaki Y, Fujiharu C, Ishii T, Seto M, Nishinoue N, Sasaki Y, Kawato T, Motohashi M, Maeno M (2014) Serum γ -glutamyltransferase level is associated with periodontal disease independent of drinking habits in Japanese adults. Medical Science Monitor, 査読有, vol. 20, pp. 2109-2116, doi: 10.12659/MSM.891204

Maeno M, Tanaka H, Zhang F, Kitami S, Nakai K, Kawato T (2013) Direct and Indirect Effects of IL-17A on RANKL-Induced Osteoclastogenesis. Journal of Hard Tissue Biology, 査読有, vol. 22, pp. 287-292, https://www.jstage.jst.go.jp/article/jhtb/22/3/22_287/_pdf.

Nakai K, Kawato T, Morita T, Inuma T, Kamio N, Zhao N, Maeno M (2013) Angiotensin II induces the production of MMP-3 and MMP-13 through the MAPK signaling pathways via the AT₁ receptor in osteoblasts. Biochimie, 査読有, vol. 95, pp. 922-933, doi: 10.1016/j.biochi.2012.

[学会発表](計4件)

中井久美子, 川戸貴行, 梶純也, 原田修成, 岡仁, 富樫久美, 柏木勝, 前野正夫 (2014年5月31日) Angiotensin II は AT₁ 受容体を介して骨芽細胞の分化と石灰

化物形成を抑制する. 第63回日本口腔衛生学会・総会, 熊本市民会館崇城大学ホール, 熊本県, 熊本市

川戸貴行, 北見聡, 田中秀樹, 中井久美子, 前野正夫 (2013年8月22日) RANKL 刺激した RAW264.7 細胞は IL-18 binding protein 産生増加を介して CD4⁺ T 細胞の IL-18 誘導性 GM-CSF 発現を抑制する. 第22回硬組織再生生物学会・総会, 鶴見大学歯学部, 神奈川県, 横浜市

Nakai K, Kawato T, Tanabe N, Maeno M (2013年5月21日) Angiotensin II induces the production of MMP-3 and MMP-13 through the MAPK signaling pathways via the AT₁ receptor in osteoblasts. 20th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Milan, Italy

中井久美子, 川戸貴行, 柏木勝, 原田修成, 岡仁, 富樫久美, 前野正夫 (2013年5月16日) アンジオテンシン II は MAPK シグナル伝達経路を介して骨芽細胞の MMP-13 と MMP-3 の産生を促進する. 第62回日本口腔衛生学会・総会, キッセイ文化ホール, 長野県, 松本市

[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:
出願年月日:
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

川戸 貴行 (KAWATO, Takayuki)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号: 50386075