

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861824

研究課題名(和文)炎症性骨代謝における新規サイトカインIL-35の役割について

研究課題名(英文)Role of new Cytokines IL-35 in inflammation bone metabolism

研究代表者

神谷 洋介(Kamiya, Yosuke)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：70572808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：RAW 264.7細胞へのRANKLとIL-35での共刺激により、破骨細胞分化マーカー(MMP-9、Cathepsin K、TRAP)の遺伝子発現、破骨細胞形成、および破骨細胞活性がRANKL単独刺激と比較して有意に増加した。また、RANKLとIL-35の共刺激によりERKとp-38のリン酸化がそれぞれ単独刺激と比較して増加を認めた。さらに、ERK阻害剤による前処理によりRANKLとIL35の共刺激の破骨細胞数は未処理群と比較して有意に抑制された。これよりIL-35とRANKLが作用することで、主にERKを介したシグナル伝達により相乗的に破骨細胞形成を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Osteoclast differentiation marker (MMP-9, Cathepsin K, TRAP) gene expression, osteoclast formation and osteoclast activity in RAW 264.7 cells were significantly increased by RANKL and IL-35 compared with RANKL alone. The phosphorylations of ERK and p-38 were increased by RANKL and IL-35 compared with RANKL or IL-35 alone. The number of osteoclast by RANKL and IL-35 were significantly inhibited by pretreatment with ERK inhibitor compared with no treatment. Therefore, the effect by IL-35 and RANKL promoted synergistic effect on osteoclast formation mainly via ERK signaling pathway.

研究分野：歯周病学

キーワード：IL-35 サイトカイン 骨代謝

## 1. 研究開始当初の背景

グラム陰性菌外膜の主要構成成分の一つであるリポ多糖体 (LPS) は生体に多彩な反応を引き起こす。その一つとして破骨細胞による骨吸収を刺激することが知られ、歯周病の発症、進行に深く関与していると考えられる。Kikuchi Tらは、LPSが歯周組織の構成細胞の一つである骨芽細胞上に破骨細胞分化因子 (RANKL {Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand}) を誘導することを明らかにした (Kikuchi T et al. J. Immunol. 2001)。また、RANKL以外にもLPSにより誘導される様々なサイトカインが歯周病の局所における骨吸収に関与していると考えられる。近年、T細胞の新しいサブセットとしてTh17細胞が提唱され、炎症や感染防御における役割が注目されている。Th17細胞から産生されるIL-17はリウマチ患者の滑膜より検出され、RANKLを誘導することにより破骨細胞を介した骨吸収に関与していることも明らかとなっている (Kotake S et al. J. Clin. Invest. 1999)。これまでにIL-23依存的に誘導されたTh17細胞が自己免疫性関節炎における骨吸収に重要であり、Th1細胞およびTh2細胞は、むしろ破骨細胞の分化、誘導に対して抑制的に働くことが報告されている (Sato K et al. J. Exp. Med. 2006)。歯周病におけるTh17細胞 (Schenkein HA et al. J Dent Res. 2010, Monteiro AC et al. J Immunol. 2009, Ohyama H et al. J Dent Res. 2009, Yu JJ et al. Infect Immun. 2008, Takahashi K et al. J Clin Periodontol. 2005, Vernal R et al. J Clin Periodontol. 2005) やTreg細胞 (Garlet GP et al. J Clin Periodontol. 2010, Dutzan N et al. J Clin Periodontol. 2009, Okui T et al. Oral Microbiol Immunol. 2008, Ernst CW et al. Clin Exp Immun. 2007, Nakajima T et al. J Dent Res. 2005) の関与も示唆されており、歯周病病態におけるこれらT細胞の役割について更なる研究が必要である。Treg細胞より産生される新規に同定された抑制性のサイトカインであるIL-35は、Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3) とIL-12のサブユニットであるp35のヘテロダイマーであり (Collison LW et al. Nature. 2007)、最新の報告では、Foxp3を発現しないIL-35産生性のiTR35が見いだされるなど (Collison LW et al. Nature Immun. 2010)、非常に注目されている。

## 2. 研究の目的

これまで、IL-35がコラーゲン誘導性リウマチを抑制すること、Th17細胞分化を抑制することが明らかとなっている (Niedbala W et

al. *Eur J Immunol.* 2007)。また、リウマチや歯周病などの慢性炎症性骨疾患においてTh17細胞やTreg細胞の関与が示唆されているが、IL-35の骨代謝および歯周病病態におけるTh17に対するIL-35の役割は不明である。そこで、歯周病病態における破骨細胞に対するIL-35の影響を解析することとした。

また、IL-35による生体防御機構の調節の可能性について検討し、将来の歯周疾患およびリウマチ性疾患のような慢性の炎症性骨疾患の治療にフィードバックすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) IL-35によるRANKL誘導性の破骨細胞分化マーカー遺伝子発現への影響

RAW264.7細胞 (マクロファージ細胞株) にRANKL、IL-35で刺激を行い、48時間培養後にtotal RNAを抽出し、MMP-9、Cathepsin K、およびTRAPのmRNA発現をqPCR法にて解析した。

### (2) IL-35によるRANKL誘導性の破骨細胞形成への影響

RAW264.7細胞にRANKL、IL-35で刺激を行い、5日間培養後に酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (Tartrate phosphate-buffered saline; TRAP) 染色を行い、3核以上のTRAP陽性細胞数を光学顕微鏡下で観察した。

### (3) IL-35によるRANKL誘導性の破骨細胞活性への影響

骨吸収能の検討はCorning Osteo Assay Surface (Corning, NY, USA) を用いて行った。RAW264.7細胞をCorning Osteo Assay Surface上で培養し、RANKL、IL-35で刺激を行い、5日間培養後に破骨細胞によるCorning Osteo Assay Surfaceにできた吸収窩を光学顕微鏡下で観察した。

### (4) IL-35によるRANKL誘導性破骨細胞分化促進メカニズム

RAW264.7細胞にRANKL (50ng/ml)、IL-35 (100ng/ml) で刺激を行った後、細胞を融解し、タンパクを回収した。IL-35による破骨細胞形成に関わる細胞内伝達経路を確認するため、同サンプルをWestern Blotting法を用いて、ERK、JNK、p-38、およびNF- $\kappa$ Bへの影響を検討した。

### (5) IL-35による破骨細胞形成促進へのMAPK、NF- $\kappa$ B経路阻害剤の影響

RAW264.7 細胞に ERK、JNK、p-38、および NF- $\kappa$ B の阻害剤 (10 $\mu$ M) にて 1 時間前処理を行い、RANKL (50ng/ml)、IL-35 (100ng/ml) で刺激を行った後、TRAP 染色を行い、3 核以上の TRAP 陽性細胞数を光学顕微鏡下で観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) IL-35 による RANKL 誘導性の破骨細胞分化マーカー遺伝子発現への影響

RANKL による単独刺激により MMP-9、Cathepsin K、および TRAP の遺伝子発現増加が認められたが、RANKL と IL-35 (100ng/ml) の共刺激によってこれらすべての遺伝子発現が RANKL 単独刺激と比較して有意に増加した (図 1A,B,C)。

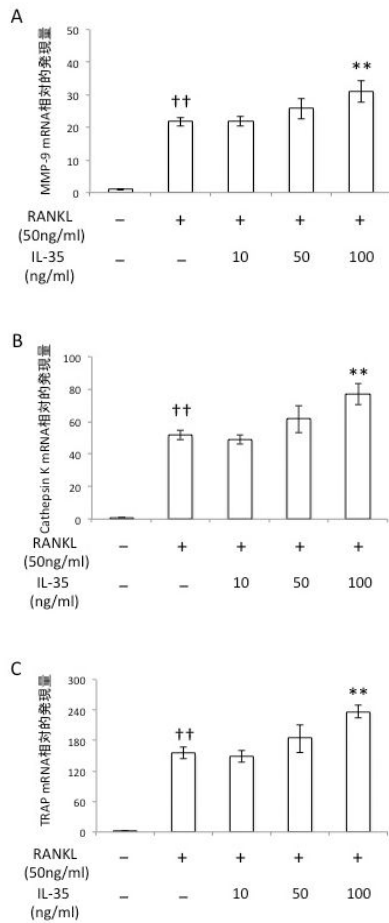


図 1 骨細胞分化マーカー遺伝子発現

A) MMP-9 mRNA 発現

B) Cathepsin K mRNA 発現

C) TRAP mRNA 発現

(control を 1 とした mRNA の相対的発現)

mean ± S.D. n=3 ††:  $p < 0.01$  vs control

\*\* :  $p < 0.01$  vs RANKL

##### (2) IL-35 による RANKL 誘導性の破骨細胞形成への影響

RANKL 単独刺激により多数の多核破骨細胞を確認し (図 2A)、IL-35 との共刺激により RANKL 単独刺激と比較して有意に TRAP 陽性細胞数の増加を認めた (図 2B)。

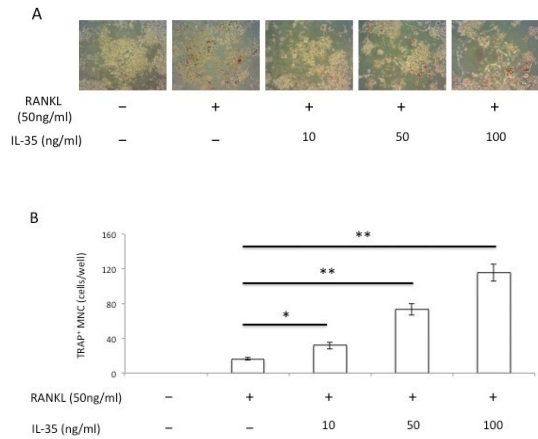


図 2 IL-35 による RANKL 誘導性の破骨細胞形成への影響

A) TRAP 染色像

B) 破骨細胞数 mean ± S.D. n=3

\*:  $p < 0.05$  \*\*:  $p < 0.01$

##### (3) IL-35 による RANKL 誘導性の破骨細胞活性への影響

RANKL と IL-35 の共刺激によってできた吸収窩の割合は RANKL 単独刺激よりも増加していることが写真上確認された (図 3A)。また、RANKL と IL-35 の共刺激によってできた吸収窩数も RANKL 単独刺激と比較して有意に増加していた (図 3B)。

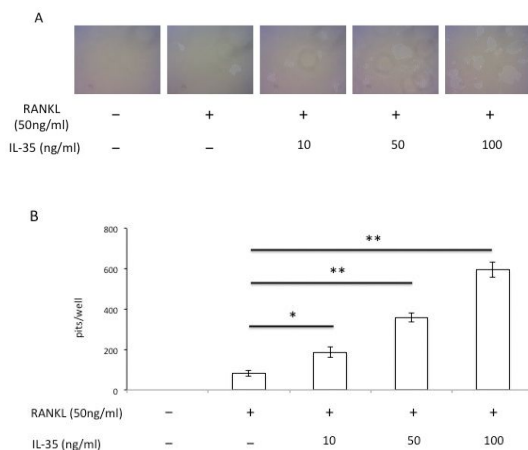


図 3 IL-35 による RANKL 誘導性の破骨細胞活性への影響

A) 骨吸収窩像

C) 骨吸収窩数 mean ± S.D. n=3

\*:  $p < 0.05$  \*\*:  $p < 0.01$

##### (4) IL-35 による RANKL 誘導性破骨細胞分化促進メカニズム

RANKL と IL-35 の共刺激によって ERK と p-38 のリン酸化がそれぞれ単独刺激と比較して増加した (図 4)。また、IL-35 単独刺激によって ERK、p-38、および NF-κB のリン酸化がコントロールと比較して増加した (図 4)。RANKL 単独刺激によって ERK、JNK、p-38、および NF-κB のリン酸化がコントロールと比較して増加した (図 4)。

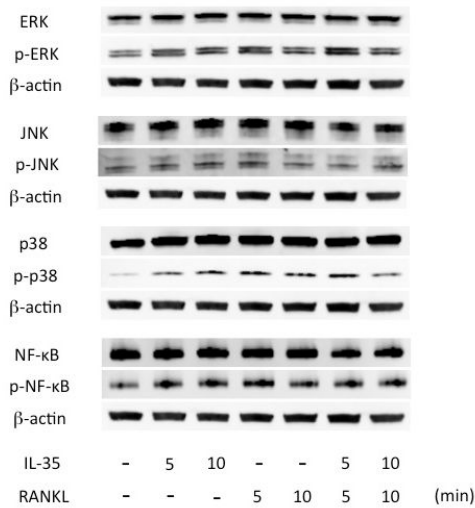
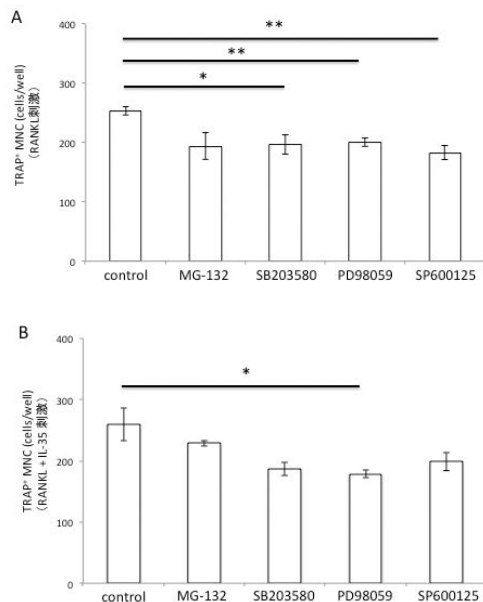


図 4 IL-35 による RANKL 誘導性破骨細胞分化促進メカニズム

#### (5) IL-35 による破骨細胞形成促進への MAPK、NF-κB 経路阻害剤の影響

SB203580 (p-38 阻害剤) PD98059 (ERK 阻害剤) および SP600125 (JNK 阻害剤) による前処理により、RANKL 単独刺激の破骨細胞数は未処理群と比較して有意に抑制された (図 5A)。また、PD98059 (ERK 阻害剤) に



よる前処理により RANKL と IL-35 の共刺激の破骨細胞数は未処理群と比較して有意に抑制された (図 5B)。



図 5 IL-35 による破骨細胞形成促進へ MAPK、NF-κB 経路阻害剤の影響

- A) RANKL 刺激時の破骨細胞数  
mean ± S.D. n=3 \* : p<0.05 \*\* : p<0.01
- B) RANKL と IL-35 共刺激時の破骨細胞数  
mean ± S.D. n=3 \* : p<0.05
- C) RANKL と IL-35 共刺激時の TRAP 染色像

#### (6) まとめ

本研究により、RAW264.7 細胞への RANKL と IL-35 の共刺激により、RANKL 単独刺激と比較して破骨細胞分化マーカー (MMP-9、Cathepsin K、TRAP) の遺伝子発現、破骨細胞形成、および破骨細胞活性の増加を認めた。また、RANKL と IL-35 の共刺激により ERK と p-38 のリン酸化がそれぞれ単独刺激と比較して増加を認めた。さらに、ERK 阻害剤による前処理により RANKL と IL-35 の共刺激の破骨細胞数は未処理群と比較して有意に抑制された。これより IL-35 と RANKL が作用することで、主に ERK を介したシグナル伝達により相乗的に破骨細胞形成を促進することが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- Okabe I, Kikuchi T, Mogi M, Takeda H, Aino M, Kamiya Y, Fujimura T, Goto H, Okada K, Hasegawa Y, Noguchi T and Mitani A, : IL-15 and RANKL Play a Synergistically Important Role in Osteoclastogenesis. *J Cell Biochem.* 2017 Apr;118(4):739-747. 査読有
- Okada K, Fujimura T, Kikuchi T, Aino M, Kamiya Y, Izawa A, Iwamura Y, Goto H, Okabe I, Miyake E, Hasegawa Y, Mogi M and Mitani A, : Effect of interleukin (IL)-35 on IL-17 expression and production by human CD4+ T cells. *PeerJ.* 2017 Feb;15(5):e2999. 査読有
- Okabe E, Ishihara Y, Kikuchi T, Izawa A, Kobayashi S, Goto H, Kamiya Y, Sasaki K, Ban S, Noguchi T, Kawai T and Mitani A, : Adhesion Properties of Human Oral Epithelial-Derived Cells to Zirconia. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016 Oct;18(5):906-916. 査読有
- Goto H, Ishihara Y, Kikuchi T, Izawa A, Ozeki N, Okabe E, Kamiya Y, Ozawa Y, Mizutani H, Yamamoto G, Mogi M, Nakata K, Maeda H, Noguchi T and Mitani A, : Interleukin-1 Receptor Antagonist Has a Novel Function in the Regulation of Matrix Metalloproteinase-13 Expression. *PLoS One.* 2015 Oct 16;10(10):e0140942. 査読有

Polur I, Kamiya Y, Xu M, Cabri BS, Alshabeeb M, Wadhwa S and Chen J,: Oestrogen receptor beta mediates decreased occlusal loading induced inhibition of chondrocyte maturation in female mice. *Arch Oral Biol*. 2015 Jun;60(6):818-824. 査読有

Chen J, Kamiya Y, Polur I, Xu M, Choi T, Kalajzic Z, Drissni H and Wadhwa S,: Estrogen via estrogen receptor beta partially inhibits mandibular condylar cartilage growth. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014 Nov;22(11):1861-1868. 査読有

Kamei H, Ishihara Y, Fuma D, Niwa T, Kamiya Y, Yokoi T, Suzuki M, Izawa A, Mizutani H, Hayashi J, Sakaki Y, Noguchi T and Kojima T,: Interleukin-1 receptor gene variants are associated with aggressive periodontitis in the Japanese. *Arch Oral Biol*. 2014 Jul;59(7):756-763. 査読有

Izawa A, Ishihara Y, Mizutani H, Kobayashi S, Goto H, Okabe E, Takeda H, Ozawa Y, Kamiya Y, Sugita Y, Kubo K, Kamei H, Kikuchi T, Mitani A, Hayashi J, Nishihara T, Maeda H and Noguchi T,: Inflammatory bone loss in experimental periodontitis induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in IL-1Ra knockout mice. *Infect Immun*. 2014 May;59(7):756-763. 査読有

Kamiya Y, Ishihara Y, Kamei H, Ozawa Y, Mizutani H, Kubo K, Maeda H and Noguchi T,: IL-1 receptor type II production is upregulated by IL-4 and IL-13, and downregulated by IFN- $\gamma$  in mouse gingival epithelial cells. *Modern Research in Inflammation*. 2014 Apr;3(2):37-47. 査読有

[学会発表](計14件)

神谷洋介, 赤堀康, 五十子元, 白水紀充, 村瀬尚子, 三谷章雄: 広汎型慢性歯周炎患者に対して包括的治療を行った一症例. 第12回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会, 2017年11月3日, 塩尻

岡田康佑, 藤村岳樹, 菊池毅, 相野誠, 神谷洋介 他: 歯周病病態における Th17 細胞に対する IL-35 の役割についての基礎的検討. 第12回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会, 2017年11月3日, 塩尻

岡田康佑, 藤村岳樹, 菊池毅, 相野誠, 神谷洋介 他: 歯周病病態における Th17 細胞に対する IL-35 の役割についての基礎的検討. 愛知学院大学歯学会 第87回学術大会, 2017年6月4日, 名古屋

岡田康佑, 藤村岳樹, 菊池毅, 相野誠, 神谷洋介 他: 歯周病病態における Th17 細胞に対する IL-35 の役割についての基礎的検討. 第60回春季日本歯周病学会

学術大会, 2017年5月12日, 福岡

後藤久嗣, 石原裕一, 菊池毅, 伊澤有郎, 神谷洋介 他: インターロイキン1レセプターアンタゴニスト(IL-1Ra)のコラゲナーゼ3(MMP-13)発現抑制について. 第11回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会, 2016年11月3日, 岐阜

岡田康佑, 藤村岳樹, 菊池毅, 相野誠, 神谷洋介 他: ヒト歯肉上皮細胞における IL-35 の影響について. 第145回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2016年10月27日, 長野

後藤久嗣, 石原裕一, 菊池毅, 伊澤有郎, 尾関伸明, 神谷洋介 他: インターロイキン1レセプターアンタゴニスト(IL-1Ra)のコラゲナーゼ3(MMP-13)発現抑制について. 第23回日本歯科医学会総会, 2016年10月21日, 福岡

Mitani A, Okada K, Goto H, Kamiya Y 他: Interleukin (IL)-35 and IL-17 may play important role in periodontitis. 2016 Annual Meeting of American Academy of Periodontology, 2016年9月13日, San Diego (USA)

岡部猪一郎, 菊池毅, 相野誠, 神谷洋介 他: IL-15 and RANKL play a synergistically important role in osteoclastogenesis. 第88回愛知学院大学歯学会, 2016年6月5日, 名古屋

大野祐, 山本弦太, 西田英作, 後藤久嗣, 神谷洋介 他: *Porphyromonas gingivalis*由来LPSは歯肉上皮細胞のアンジオポエチン様タンパク質2産生を誘導する. 第143回秋季日本歯科保存学会, 2015年11月13日, 東京

菊池毅, 岡部猪一郎, 相野誠, 神谷洋介 他: 破骨細胞原性に対する IL-15 と RANKL の相乗効果について. 第143回秋季日本歯科保存学会, 2015年11月13日, 東京

Okabe E, Ishihara Y, Kikuchi T, Izawa A, Kobayashi S, Goto H, Kamiya Y 他: Adhesion properties of human oral epithelial-derived cells to zirconia. The 63rd Annual Meeting of JADR 2015, 2015年10月31日, 福岡

伊澤有郎, 石原裕一, 神谷洋介 他: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 単独感染による実験的歯周炎の病態と骨関連分子の遺伝子発現. 第9回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会, 2014年11月23日, 名古屋

Kamiya Y, Ishihara Y, Kamei H 他: High levels of sIL-1RAcP was observed in chronic periodontitis patients. American Academy of Periodontology (AAP) 100th Annual Meeting, 2014年9月20日, San Francisco (USA)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

神谷 洋介 (KAMIYA, Yosuke)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号： 70572808