

ヒト顎関節滑膜由来細胞の炎症性サイトカイン発現における TNF- α および IL-17A の影響

日本大学大学院松戸歯学部研究科歯学専攻

服部 俊夫

(指導：近藤 壽郎 教授)

Effect of TNF- α and IL-17A on inflammatory cytokine production in synovial fibroblasts from human temporomandibular joint

HATTORI Toshio

Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo,

Department of Oral and Maxillofacial Surgery

Abstract

Synovitis often accompanies intracapsular pathological condition such as disk displacement (DD)/internal derangement (ID) and osteoarthritis (OA) of the temporomandibular joint (TMJ). Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-17 have been detected in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis (RA) and/or osteoarthritis (OA), and are key mediators of the intracapsular pathological state of the knee joint. The aim of this study was to investigate the roles of TNF- α and IL-17 in ID and/or OA of TMJ.

The TNF- α -stimulated protein production profile, was analyzed in synovial fibroblasts using an antibody array. The synovial cells were stimulated by TNF- α for 4 hours, and the release of chemokines into the supernatant was determined using a human chemokine antibody array. The result of the antibody array indicated that TNF- α had a net stimulatory effect on chemokine levels. A total of seven chemokines were significantly upregulated, and the expression of these genes was analysed by a real time-polymerase chain reaction. Following stimulation with

TNF- α for 2, 4, or 8 hours, expression of the seven chemokine genes was upregulated compared with untreated controls.

IL-17 is an inflammatory cytokine produced primarily by Th17 cells that plays critical roles in the pathogenesis of numerous autoimmune and inflammatory diseases. Here, we investigated the roles of IL-17A in ID using genome-wide analysis of synovial fibroblasts isolated from patients with ID. IL-17 receptors were expressed in synovial fibroblasts as assessed using real-time PCR. Microarray analysis indicated that IL-17A treatment of synovial fibroblasts up-regulated the expression of IL-6 and chemokines. Real-time PCR analysis showed that the gene expression of IL-6, GRO α , IL-8, and MIP-3 α was significantly higher in IL-17A treated synovial fibroblasts compared to non-treated controls. IL-6 protein production was increased by IL-17A in a time- and a dose-dependent manner. Additionally, IL-17A simulated IL-6 protein production in synovial fibroblasts samples isolated from three patients. Furthermore, signal inhibitor experiments indicated that IL-17-mediated induction of IL-6 was transduced via activation of NF κ B and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt.

These findings indicate that TNF- α and IL-17A may be responsible for inflammation through cytokines with ID and/or OA of the TMJ.

緒言

滑膜は側頭骨関節面、下顎頭関節面、ならびに関節円板を除く非加重部構造を被覆する組織で、滑液分泌や細胞外基質の産生など、顎関節の恒常性維持に重要な組織である。顎関節症の咀嚼筋障害以外の病態で高頻度に発生する顎関節円板転位障害 (internal derangement: 以下 ID と略) および変形性顎関節症 (osteoarthritis of the temporomandibular joint: 以下 OA-TMJ と略) の両者において滑膜の炎症所見が確認されている^{1,2)}。一方、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) や interleukin-17 (IL-17) は ID 患者や OA-TMJ 患者滑液中で検出されており³⁻⁶⁾、顎関節の炎症病態形成において重要な因子である可能性が示唆されている。TNF- α や IL-17 は、関節リウマチ (rheumatoid arthritis: 以下 RA と略) や変形性関節症 (osteoarthritis: 以下 OA と略) 患者の滑液中でも高濃度で検出され、関節の炎症や組織破壊に関与すると報告されている⁷⁻⁹⁾。そこで、本研究では、顎関節炎症病態への TNF- α または IL-17 の影響についてそれぞれ検討を行うこととした。

TNF- α は代表的な炎症性サイトカインであり、RA の病態形成に重要な役割を担っている¹⁰⁾。また、TNF- α に対する抗体は RA の治療薬として効果を得ている¹¹⁾。当講座では、顎関節の炎症病態関連因子の検索を目的に、IDおよびOA-TMJ患者の滑膜から得た培養ヒト顎関節滑膜細胞 (滑膜細胞) に TNF- α を作用させ、網羅的遺伝子発現解析を行ってきた。滑膜細胞に TNF- α を作用させると多数の炎症性遺伝子の上昇を認めること、遺伝子発現上位群には、多形核白血球、単球およびリンパ球の遊走、活性の誘導や血管新生に関与するケモカインが多く含まれることを報告してきた^{12, 13)}。しかし、生体内で働くのは遺伝

子ではなくタンパク質であるため、タンパク質産生を検討する必要があると考えるが、ELISA 法等を用いて1つ1つのタンパク質量を測定するためには膨大な量のサンプルが必要となる。最近では、プロテオーム解析の開発が進み、RA の領域ではタンパク質に関しても遺伝子同様に網羅的な解析が多く行われるようになってきている^{14,15)}。現在、顎関節領域における網羅的なタンパク質の解析については、サイトカイン用 antibody array を用いた ID 患者の滑液解析を行った報告1件のみであった¹⁶⁾。そこで本研究では、ID および OA-TMJ における滑膜炎の発生メカニズムを解明するために、TNF- α 刺激滑膜細胞におけるケモカイン産生を antibody array を用いて検討した。

一方、IL-17 は近年注目されているサイトカインであり、T リンパ球のサブセットである Th17 より産生され、自己免疫疾患や炎症性疾患において重要な役割を担っていることが報告されている^{17,18)}。IL-17 は IL-17A (一般的に IL-17 と表記される) から IL-17F まで6つのファミリー分子が同定されている^{19,20)}。また、IL-17 レセプター (IL-17R) には5つのファミリー分子が存在し、IL-17A および IL-17F は、IL-17RA および IL-17RC のヘテロ2量体に結合することが知られている^{19,20)}。IL-17 は RA 等自己免疫疾患の病態形成との関わりが注目されており、膝関節滑液中の IL-17 濃度と疾患の重症度は相関することが指摘されている^{21,22)}。In vitro における実験では、IL-17 は滑膜過形成、軟骨組織破壊、血管新生に関わることも報告されている²³⁻²⁶⁾。近年、顎関節領域でも ID や OA-TMJ 患者の滑液中で IL-17 が検出されることが報告されたが、顎関節疾患における IL-17 の役割に関する報告はない。そこで、IL-17A 刺激滑膜細胞の網羅的遺伝子発現解析を行なった。

本研究の目的は、滑膜細胞に対する TNF- α や IL-17A の影響を解析し、顎関節の炎症病態形成機序を検討することである。

材料および方法

1. ヒト顎関節滑膜細胞の培養

ID および OA-TMJ 患者の顎関節上関節腔鏡視下洗浄療法¹⁾ 施行時に、関節円板後部軟組織表層から滑膜組織を採取した。35 mm ディッシュ内に、滑膜組織から out growth 法で滑膜細胞を得た。培養は 10% fetal bovine serum (以下 FBS と略) (Cell Culture Technologies 社製, Gravesano, スイス) および penicillin G 100 U/ml (明治製薬社製, 東京, 日本), kanamycin 100 µg/ml (明治製薬社製), fungizone 250 ng/ml (Gibco 社製, NY, アメリカ) を含む Ham's F12 培地 (和光純薬工業株式会社製, 大阪, 日本) にて, 37°C, 5% CO₂ 条件下で行った。培地交換は週に 2 回行い, 実験には継代 6-8 代の細胞を用いた。本研究にはインフォームドコンセントを行った患者 4 名から得た滑膜細胞を使用した。本実験は日本大学松戸歯学部倫理委員会 (認証番号: EC07-004 および EC10-037) の指針に従って行った。

2. Antibody array 法

滑膜細胞を 100 mm ディッシュ内に 1×10^6 cells/well で播種し, コンフルエント確認後, 24 時間後に 2% FBS および抗菌薬を含む Ham's F12 培地に交換し, さらに 24 時間培養した。過去の報告を参考に¹²⁾ 10 ng/ml TNF- α (PEPROTECH 社製, NG, アメリカ) で 4 時間刺激後, 細胞培養上清を回収し, 使用するまで -80°C で保存した。培養上清中のケモカインタンパク質発現を human chemokine antibody array (Ray Bio 社製, GA, アメリカ) を用いて検出した。各ケモカイン抗体がプロットされたメンブレンを, blocking buffer を用いてブロッキングした。TNF- α 刺激時または無刺激時の滑膜細胞培養上清にメンブレンを浸漬

し、室温で 4 時間反応させた。メンブレンを biotin-conjugated antibodies に 2 時間浸漬し、その後 HRP-conjugated streptavidin に 2 時間浸漬した。Immuno Star Reagent (和光純薬工業株式会社製) 発光溶液を用い発光反応を行い、その後 10 分間フィルムに感光させ現像した。

現像したフィルムは AlphaImager 3400 (Alpha Innotech 社製, CA, アメリカ) にて画像を取り込み、Phoretix 2D Evolution を用いてスポットの濃度を測定した。各 array 間のハイブリダイゼーション効率の差を補正するため、positive control を基準として normalization を行った。Array には各ケモカインに対し 2 つのスポットが用意されているため、各ケモカイン量は 2 つのスポットの平均値とした。

3. Total RNA の抽出

滑膜細胞を 100 mm ディッシュ内に 1×10^6 cells/well で播種し、コンフルエント確認後、2% FBS および抗菌薬を含む Ham's F12 培地で 24 時間培養した。TNF- α 刺激の場合は、10 ng/ml TNF- α を、2、4 および 8 時間作用させ、TRIzol Reagent (Life Technologies 社製, MD, アメリカ) にて細胞を溶解し、AGPC 法によって total RNA を抽出した。IL-17A 刺激の場合は、過去の報告を参考に²⁶⁾ 10 ng/ml IL-17A を 2、4、8、12、24 時間作用させ、RNeasy Mini kit (Qiagen 社製, CA, アメリカ) を用いて total RNA を抽出した。また、無刺激の細胞からも total RNA を抽出し、control とした。抽出した RNA は使用するまで -80°C で保存した。

4. DNA microarray 解析

滑膜細胞を IL-17A (10 ng/ml) で 4 時間刺激したのち抽出した total RNA を使用した。Microarray に用いる total RNA の純度および品質は、RNA6000 Nano Gel System を用いて Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent

Technologies 社製, CA, アメリカ) で確認した. DNA microarray は Agilent 社のプロトコールに従って行った. 抽出した total RNA を Quick Amp Labeling Kit を用いて Cy3 ラベル後, SurePrint G3 Human Gene expression 8x60K v2 Microarray (Agilent 社製) に添加した. Array のスキャンは Agilent DNA Microarray scanner を用いて行った. 遺伝子発現解析は Gene Spring GX software (Agilent 社製) を用いて行った. 各サンプル間での比較を目的に, シグナル値の normalize を行った. コントロール群と IL-17A 刺激群間で 2 倍以上または 1/2 以下に発現変動した遺伝子を IL-17A によって発現変動した遺伝子とした. Microarray data は National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (GEO Series GSE74668; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) へアップロードした.

5. Signaling pathway 解析

Signaling pathway 解析は Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity® Systems 社製, www.ingenuity.com, CA, USA) を用いて行なった. DNA microarray 解析により, 無刺激滑膜細胞 (対照群) と比較し 2 倍以上または 1/2 以下に発現変動した遺伝子の accession number および expression ratio を Ingenuity Pathway Knowledge data Base へアップロードし, 分子間相互作用およびシグナル伝達経路を解析した.

6. Real-time PCR 法

Total RNAを0.1 µg/mlに調整し, GeneAmp RNA PCR kit (Thermo Fisher Scientific社製, MA, アメリカ)を用いてcDNAを作製した. cDNA溶液2 µl, 上流および下流のprimer (20 µM) を各0.4 µl, DyNAmo SYBERGreen qPCR Master mix (Thermo Fisher Scientific社製) を10 µl, 滅菌精製水を7.2 µlを加えて全量を

20 μ lとし、PCR反応溶液を作製した。DNA Engine Opticon 1 (Bio Rad, CA, アメリカ) にて、95°Cで5分間加熱後、94°C15秒、55°C30秒、72°C30秒を40サイクル行いDNAを増幅し、SYBR Greenによる蛍光強度をモニターした。GAPDHをコントロールとして $\Delta\Delta$ CT法を用いて計算した²⁷⁾。Real-time PCR法により得られたPCR産物はMidori Green Direct (NIPPON genetics社製、東京、日本) を用いて染色し、1.5%アガロースゲルにて電気泳動を行なった。PCR法にて使用したprimerは表1に示す。

7. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (以下 ELISA と略)

ELISA 法によるタンパク質量の測定には、滑膜細胞を 24 well plate に 5.0×10^4 cells/well で播種し、24 時間後にコンフルエントを確認し、2% FBS および抗菌薬を含む Ham's F12 培地に交換後、さらに 24 時間培養した。その後、過去の報告を参考に²⁶⁾ 1, 10, 50 ng/ml IL-17A で24時間、または10 ng/ml IL-17A で4, 8, 12, 24 時間刺激し、各培養上清を回収した。培養上清中のタンパク質量は IL-6 ELISA kit (R&D 社製, MN, アメリカ) を用いて測定した。また、細胞数は COULTER COUNTER (Beckman Coulter 社製, 東京, 日本) を用いて測定した。

8. Kinase 阻害薬実験

滑膜細胞を 24 well plate に 5.0×10^4 cells/well で播種し、24 時間後にコンフルエントを確認し、2% FBS および抗菌薬を含む Ham's F12 培地に交換後、さらに 24 時間培養した。interleukin-1 receptor-associated-kinase-1/4 (IRAK-1/4) の阻害薬 IRAK-1/4 inhibitor (20 μ M) (Merck KGaA 社製, Darmstadt, ドイツ), phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の阻害薬 LY294002 (20 μ M) (Merck KGaA 社製), transforming

growth factor- β -activated kinase 1 (TAK1) の阻害薬 (5z)-7-oxozeaenol (1 μ M) (Merck KGaA 社製) および inhibitor of the NF κ B kinase β subunit (IKK β) の阻害薬 PS-1145 (10 μ M) (Cayman Chemical 社製, MI, アメリカ) をそれぞれ添加し, 30 分後 10 ng/ml IL-17A で刺激した. また, 阻害薬を添加せず 10 ng/ml IL-17A 刺激を行った. 8 時間後, 各細胞培養上清を回収し, 上清中の IL-6 タンパク質量を IL-6 ELISA kit を用いて測定した. 阻害薬の効果を阻害率とし, [100 - (IL-17A 刺激による IL-6 タンパク質産生量/阻害薬添加 IL-17A 刺激による IL-6 タンパク質産生量)] で示した.

9. 統計解析

統計解析はANOVA解析を行った後, Student-Newman-Keuls (SNK) 法を用いて群間比較を行った.

表1 各primerの塩基配列

Gene	Primers	Amplicon size (bp)
MIP-3 α (CCL20)	F: 5'-GCA AGC AAC TTT GAC TGC TG-3' R: 5'-CAA GTC CAG TGA GGC ACA AA-3'	342
GRO α (CXCL1)	F: 5'-TGC AGG GAA TTC ACC CCA AG-3' R: 5'-CAG GGC CTC CTT CAG GAA CA-3'	229
IL-8 (CXCL8)	F: 5'-ATC ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT-3' R: 5'-TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT C-3'	289
MCP-1	F: 5'-CCA ATT CTC AAA CTG AAG CTC GCA C-3' R: 5'-GTT AGC TGC CAG ATT CTT GGG TTG TG-3'	372
RANTES	F: 5'-TAC ACC AGT GGC AAG TGC TC-3' R: 5'-GAA GCC TCC CAA GCT AGG AC-3'	199
IP-10	F: 5'-TGC AAG CCA ATT TTG TCC ACG TGT TG-3' R: 5'-GCA GCT GAT TTG GTG ACC ATC ATT GG-3'	302
Fractalkine	F: 5'-GAG TGG GTC AAT GCA CTT T-3' R: 5'-CAC AGA CGT TGG TGA TGA GG-3'	241
IL-6	F: 5'-AGC AAA GAG GCA CTG GCA GAA-3' R: 5'-TTG TCA TGT CCT GCA GCC ACT-3'	331
IL-8 (CXCL8)	F: 5'-ACT CCA AAC CTT TCC ACC CCA-3' R: 5'-TTT CCT TGG GGT CCA GAC AGA-3'	129
IL-17RA	F: 5'-TTC ATT CCT ATG CCT GAG TC-3' R: 5'-TAC AGT AAG TGG CTC GAC CT-3'	204
IL-17RB	F: 5'-CCT CCG AGT AGA ACC TGT TA-3' R: 5'-GTC TGG TCT GAG TCT GGA AG-3'	200
IL-17RC	F: 5'-GGA CAA ATA CAT CCA CAA GC-3' R: 5'-GAG TCA TCG GCT GAG TAG AG-3'	192
IL-17RD	F: 5'-TGT GCC TTA GAG CAG GTG TG-3' R: 5'-TGT GCT TGG AAG GGA AAG TC-3'	204
IL-17RE	F: 5'-GGG TCT CTC ACA TCC TGG AA-3' R: 5'-CCT CAG GAA GGG AAT GAT GA-3'	207
GAPDH	F: 5'-ATC ACC ATC TTC CAG GAG-3' R: 5'-ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'	318

MIP-3 α , macrophage inflammatory protein 3- α ; CCL20, chemokine (CC motif) ligand 20; GRO α , growth-regulated gene product α ; CXCL1, chemokine (CXC motif) ligand 1; IL-8, Interleukin 8; CXCL8, chemokine (CXC motif) ligand 8; MCP-1, monocyte chemotactic protein 1; RANTES, regulated upon activation, normally T-expressed, and presumably secreted; IP-10, interferon-gamma-inducible protein 10; IL-6, interleukin-6; IL-8, interleukin-8; IL-17R (A-E), interleukin-17 receptor (A-E); GAPDH, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; F, Forward primer; R, Reverse primer

結果

I. TNF- α 刺激滑膜細胞におけるケモカイン産生

1. Antibody array 解析

ID 患者より得られたヒト顎関節滑膜細胞を TNF- α で 4 時間刺激し、上清中のケモカインの解析を行った。Human chemokine antibody array で同定できる 38 種類のケモカインの表と無刺激時および TNF- α 刺激時の現像後の写真を図 1 に示す。無刺激時と比較して TNF- α 刺激時ではスポットが濃い傾向を示した。無刺激時においても monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), Eotaxin-3, regulated upon activation, normally T-expressed, and presumably secreted (RANTES), interleukin 8 (IL-8), growth-regulated gene product (GRO) のスポットが鮮明に検出された。TNF- α 刺激時に特にスポットが強く検出されたのは GRO, IL-8, MCP-1, macrophage inflammatory protein 1- β (MIP-1 β), RANTES であった。

Phoretix 2D Evolution を用いて定量した値から無刺激時と TNF- α 刺激時のケモカイン産生量を比較した。1 種のケモカインに対し 2 つずつあるスポット間で差が大きいもの、スポットの中心部に脱落があるものを除外し、信頼できるスポットのみを選択した。TNF- α 刺激時、高いタンパク質産生上昇率を認めたケモカインは 7 種類であった (図 2)。TNF- α 刺激時のタンパク質産生上昇率は macrophage inflammatory protein 3- α (MIP-3 α) が最も高く、次いで GRO α , IL-8, MCP-1, RANTES, interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10), Fractalkine の順であった (図 2)。

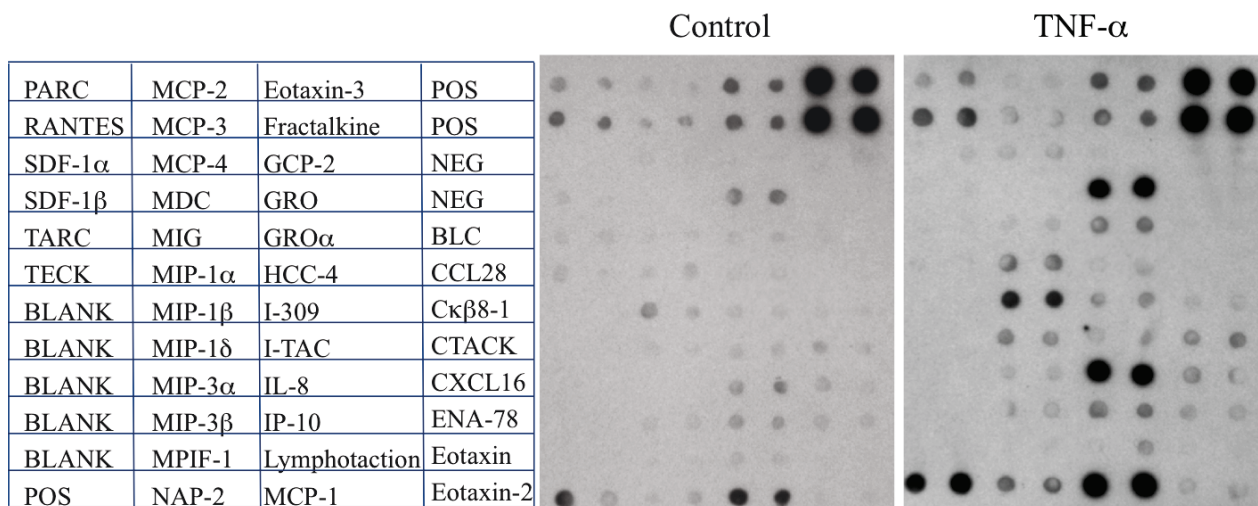


図1 Antibody array上の各ケモカインのスポット画像

Antibody array上の38ケモカインの表と無刺激時およびTNF- α で4時間刺激時のantibody arrayの画像を示す.

POS: positive control, NEG: negative control, BLC: B-lymphocyte chemoattractant, CCL: chemokine (CC motif) ligand, C κ 8-1: chemokine β 8-1, CTAC: cutaneous T cell-attracting chemokine, CXCL: chemokine (CXC motif) ligand, ENA: neutrophil -activating peptide ENA, GCP: granulocyte chemotactic protein, GRO: growth-regulated gene product, HCC: human hemofiltrate CC chemokine, I-309: inflammatory cytokine I-309, IL-8: Interleukin 8, I-TAC: interferon-inducible T-cell a chemoattractant, IP-10: interferon-gamma-inducible protein 10, MCP: monocyte chemotactic protein, MDC: macrophage derived chemokine, MIG: monokine induced by gamma interferon, MIP: macrophage inflammatory protein, MPIF: myeloid progenitor inhibitory factor, NAP: neutrophil activating protein, PARC: pulmonary and activation-regulated chemokine, RANTES: regulated upon activation, normally T-expressed, and presumably secreted, SDF: stromal cell-derived factor, TARC: thymus and activation-regulated chemokine, TECK: thymus-expressed chemokine

Chemokine	Fold change (TNF- α /cont)	Spot	
		cont	TNF- α
MIP-3 α (CCL20)	162.39		
GRO α (CXCL1)	9.91		
IL-8 (CXCL8)	8.62		
MCP-1 (CCL2)	2.45		
RANTES (CCL5)	2.16		
IP-10 (CXCL10)	2.09		
Fractalkine (CX3CL1)	1.35		

図2 TNF- α 刺激時のケモカインタンパク質上昇率
滑膜細胞をTNF- α で4時間刺激した時のケモカインタンパク質産生量をantibody arrayで検出後, 変動が認められたケモカインを示す. Fold changeはPhoretix 2D Evolutionにて解析した結果で, spotは解析に用いたantibody arrayの感光スポットである.

2. 遺伝子発現

次に, antibody array で TNF- α 刺激によりタンパク質上昇率を確認した7種類のケモカインの遺伝子発現量を real time-PCR 法にて測定した. Antibody array では TNF- α で4時間刺激した時のみの測定であったが, real time-PCR では2, 4および8時間での経時的な遺伝子発現量の測定を行った.

7種類すべてのケモカインでいずれの時間においても TNF- α 刺激時の遺伝子発現量は無刺激時より上昇していた (図3). TNF- α 刺激時ケモカイン産生量が上位であった MIP-3 α , GRO α , IL-8 は2時間で10倍

以上の遺伝子発現上昇を認めた (図 3a, b, c). 遺伝子発現上昇率は MIP-3 α , IP-10 および Fractalkine は 4 時間間がピークであった (図 3a, f, g). IL-8, MCP-1 および RANTES は継時的な遺伝子発現上昇を認めた (図 3c, d, e). GRO α は 4 時間で遺伝子発現上昇率がいったん低下したが, 8 時間で再度上昇した (図 3b).

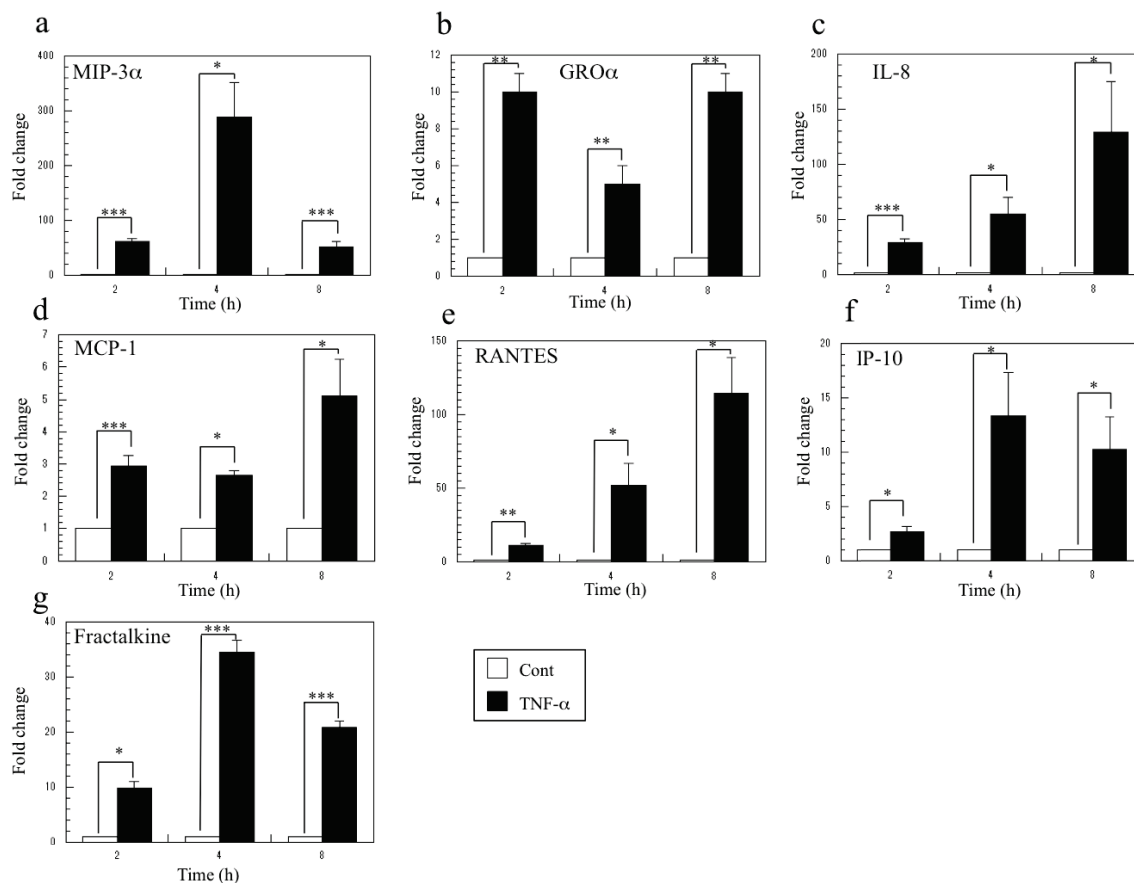


図3 ケモカイン遺伝子発現
TNF- α で2, 4および8時間刺激後の滑膜細胞におけるケモカイン遺伝子の経時的発現量を示す. 各刺激時間においてcontrol 群対TNF- α 刺激群間で, 比較検討した. (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$)

II. 滑膜細胞に対する IL-17A の影響

1. 滑膜細胞における IL-17R ファミリーの発現

滑膜細胞に対する IL-17A の影響を調査する前に, 滑膜細胞における IL-17R ファミリー (IL-17RA-E)

の発現を調べた。無刺激時の滑膜細胞から抽出した total RNA を用いて real-time PCR を行なった。PCR 産物をアガロースゲルへ電気泳動した結果を図 4 に示す。滑膜細胞において IL-17R ファミリー全ての発現を認めた (図 4)。

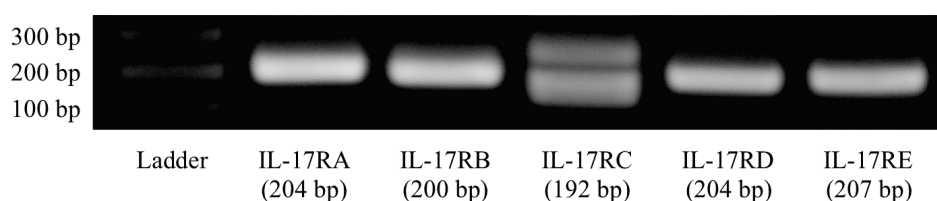


図4 滑膜細胞におけるIL-17Rファミリーの遺伝子発現
PCR産物をMidori Green Directにて染色しアガロースゲルにて電気泳動を行なった。

2. DNA microarray 解析

DNA microarray を用いて、滑膜細胞において IL-17A 刺激によって発現変動する遺伝子を網羅的に解析した。解析を行なった全遺伝子の 50,739 遺伝子のうち、滑膜細胞にて発現している遺伝子は 27,583 遺伝子であった。その 27,583 遺伝子のうち、無刺激時と比較し IL-17A 刺激により 2 倍以上および 1/2 以下に発現変動した遺伝子は 1,710 遺伝子であった。1,710 遺伝子のうち発現上昇した遺伝子は 389 遺伝子で、発現減少した遺伝子は 1,321 遺伝子であった (図 5)。次に、1,710 遺伝子の gene ontology 分類を行なったところ、発現上昇した遺伝子群ではケモカインや成長因子、サイトカイン等のレセプターリガンドに分類される遺伝子が多く認められた。また、発現減少した遺伝子群では、レセプターに分類される遺伝子が多く認められた (表 2)。

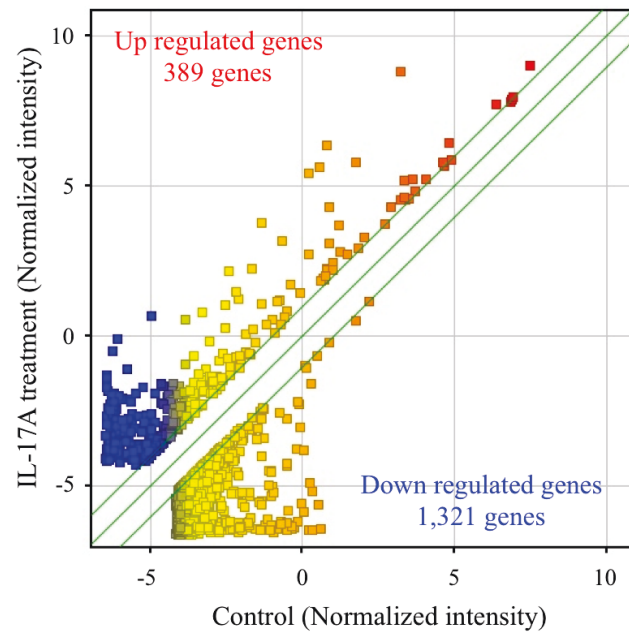


図5 DNA microarray解析
IL-17A刺激によって2倍以上発現変動した遺伝子群のscatter plotを示す.

表2 IL-17A刺激により発現変動した遺伝子群のgene ontology分類

Gene Symbol	Genebank ID	Fold	Gene Name
<i>up-regulated</i>			
Molecular function			
Chemokine activity			
CCL8	NM_005623	51.25	chemokine (C-C motif) ligand 8
CXCL1	NM_001511	49.84	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
CXCL2	NM_002089	38.77	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
CXCL3	NM_002090	35.88	chemokine (C-X-C motif) ligand 3
CXCL8	NM_000584	24.65	chemokine (C-X-C motif) ligand 8
CCL20	NM_004591	15.72	chemokine (C-C motif) ligand 20
CXCL6	NM_002993	13.00	chemokine (C-X-C motif) ligand 6
CCL7	NM_006273	11.10	chemokine (C-C motif) ligand 7
CCL2	NM_002982	2.95	chemokine (C-C motif) ligand 2
Cytokine activity			
AREG	NM_001657	3.32	amphiregulin
NAMPT	AK023341	3.03	nicotinamide phosphoribosyltransferase
BMP2	NM_001200	2.96	bone morphogenetic protein 2
NDP	NM_000266	2.83	Norrie disease (pseudoglioma)
Cytokine receptor binding			
CSF2	NM_000758	17.62	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
IL6	NM_000600	17.19	interleukin 6
CSF3	NM_000759	12.62	colony stimulating factor 3 (granulocyte)
LIF	NM_002309	5.70	leukemia inhibitory factor
IL1RN	NM_173843	2.72	interleukin 1 receptor antagonist
IL1B	NM_000576	2.62	interleukin 1, beta
Growth factor activity			
NTF4	NM_006179	7.22	neurotrophin 4
NRG3	NM_001010848	5.55	neuregulin 3
Growth factor receptor binding			
EREG	NM_001432	3.18	epiregulin
FRS3	NM_006653	2.86	fibroblast growth factor receptor substrate 3
FGF5	NM_033143	2.67	fibroblast growth factor 5
G-protein coupled receptor binding			
ADORA2A	NM_000675	4.16	adenosine A2a receptor
RTP1	NM_153708	3.37	receptor (chemosensory) transporter protein 1
PDE4D	NM_001165899	2.17	phosphodiesterase 4D, cAMP-specific
Receptor binding			
EPHA7	NM_004440	4.88	EPH receptor A7
ICAM4	NM_022377	2.77	intercellular adhesion molecule 4 (Landsteiner-Wiener blood group)
STC1	NM_003155	2.73	stanniocalcin 1
CD74	NM_001025158	2.58	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain
HILPDA	NM_013332	2.30	hypoxia inducible lipid droplet-associated
EFNB2	NM_004093	2.12	ephrin-B2
DOK3	NM_024872	2.07	docking protein 3
PTPN2	NM_002828	2.05	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2
<i>Down-regulated</i>			
Molecular function			
Signaling receptor activity			
HNF4A	NM_001030004	-5.42	hepatocyte nuclear factor 4, alpha
CASS4	NM_020356	-3.21	Cas scaffolding protein family member 4
NR0B1	NM_000475	-2.51	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1
NR1I3	NM_001077474	-2.05	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3
Transmembrane signaling receptor activity			
TACR1	NM_015727	-97.28	tachykinin receptor 1
CD3E	NM_000733	-66.90	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)
OR12D2	NM_013936	-66.54	olfactory receptor, family 12, subfamily D, member 2
OR13J1	NM_001004487	-64.29	olfactory receptor, family 13, subfamily J, member 1
LILRB5	NM_006840	-57.98	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 5
ORS2N2	NM_001005174	-54.24	olfactory receptor, family 52, subfamily N, member 2
TAS2R40	NM_176882	-52.34	taste receptor, type 2, member 40
TAS2R4	NM_016944	-12.98	taste receptor, type 2, member 4
CHRNA7	NM_001190455	-9.25	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7 (neuronal)
TULP1	NM_003322	-7.60	tubby like protein 1

3. Signaling pathway 解析

IL-17A 刺激により発現変動した遺伝子群を IPA を用いて, signaling pathway/分子間相互作用を検討した. IL-17A の canonical pathway を表示したところ, IL-17A 刺激により多数のケモカインの発現上昇が認められた (図 6). また, IL-17A のレセプターである IL-17RA および IL-17RC は滑膜細胞において恒常的に発現を認め, IL-17A による遺伝子発現変動は認められなかった (図 6a). IL-17A により発現上昇を認めた遺伝子群の分子間相互作用では, NF- κ B を中心としたネットワークが構築された. このネットワーク中に IL-6 やケモカインが認められた (図 6b).

4. IL-6, MIP-3 α , GRO α , IL-8 の経時的遺伝子発現

DNA microarray 解析および signaling pathway 解析は, IL-17A 4 時間刺激のみであった. そこで, 発現上昇を認めた IL-6, MIP-3 α , GRO α および IL-8 について real-time PCR 法を用いて経時的遺伝子発現を測定した. 滑膜細胞に IL-17A を 2, 4, 8, 12, 24 時間作用させ, 無刺激時と比較した. その結果, IL-6, GRO α および IL-8 の遺伝子発現量は IL-17A 刺激 4, 8, 12, 24 時間において有意に上昇を認めた (図 7a, c, d). また, MIP-3 α の遺伝子発現量は IL-17A 刺激 8, 12, 24 時間において有意に上昇を認めた (図 7b).

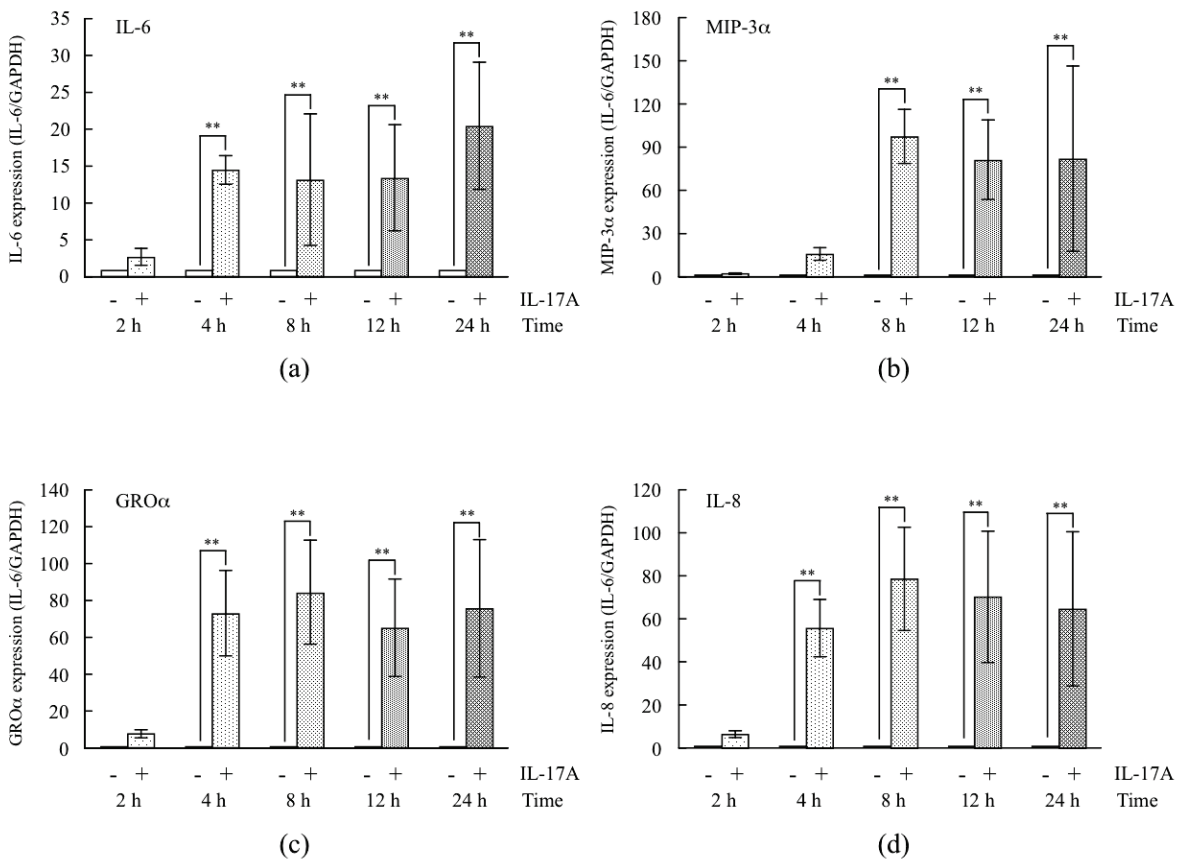


図7 IL-6, MIP-3 α , GRO α , IL-8の経時的遺伝子発現
IL-17Aで2, 4, 8, 12, 24時間刺激を滑膜細胞に行なった. 各時間で無刺激群と刺激群間にて比較を行った.

Mean \pm SD ($n = 5$), ** $P < 0.01$.

5. IL-17A 刺激滑膜細胞のタンパク質産生

IL-6 は RA をはじめとして関節疾患の炎症病態形成に深く関与する、代表的なサイトカインである。

IL-17A 刺激滑膜細胞において IL-6 の遺伝子発現上昇を認めたことから、IL-6 のタンパク質産生量の測定

を行なった。滑膜細胞に 1, 10, 50 ng/ml の IL-17A を 24 時間作用させ、無刺激時と比較したところ、IL-17A

の濃度依存的に IL-6 タンパク質産生量の上昇を認めた。しかし、1 ng/ml の IL-17A では有意な差は認めら

れなかった (図 8)。次に、10 ng/ml の IL-17A を 4, 8, 12, 24 時間作用させ、無刺激時と比較したところ、時

間依存的に IL-6 タンパク質産生量の上昇を認めた (図 9)。また、3 名の異なる患者から採取した滑膜細胞

にそれぞれ、10 ng/ml の IL-17A を 24 時間作用させたところ、全ての滑膜細胞において IL-17A 刺激により

IL-6 のタンパク質産生量は有意に上昇を認めた(図 10)。

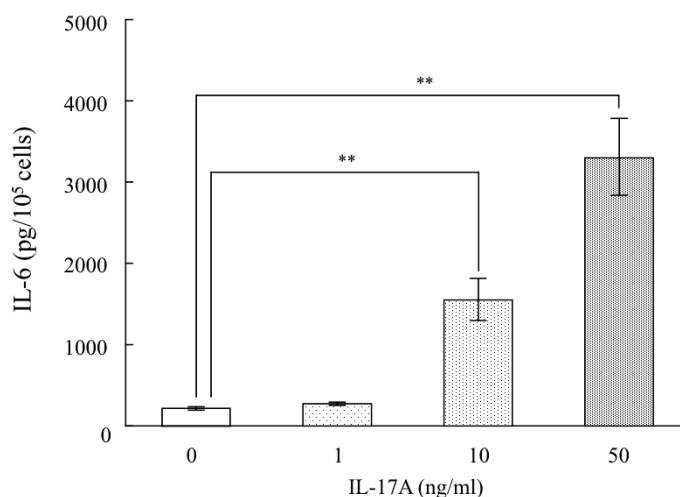


図8 IL-17A濃度とIL-6産生の関係

滑膜細胞に1, 10, 50 ng/ml のIL-17Aを24時間作用させ、IL-6のタンパク質産生量を測定した。
Mean \pm SD ($n = 6$), ** $P < 0.01$.

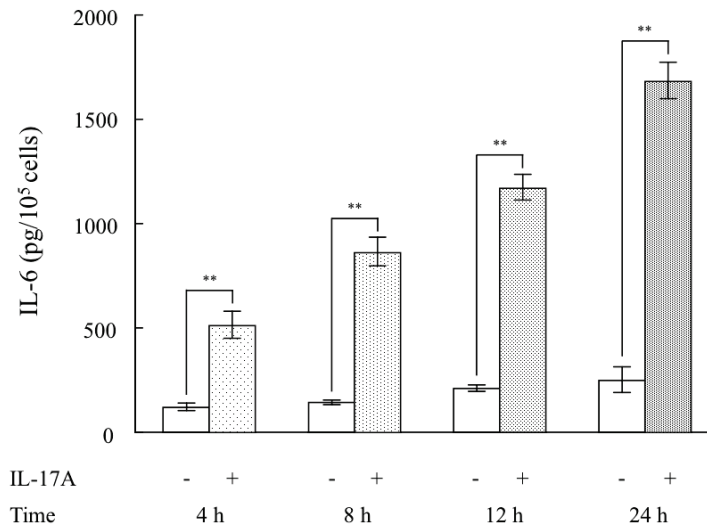


図9 IL-17A刺激による経時的IL-6タンパク質産生量
滑膜細胞に10 ng/mlのIL-17Aを4, 8, 12, 24時間作用させ、IL-6のタンパク質産生量を測定した。
Mean \pm SD ($n = 6$), ** $P < 0.01$.

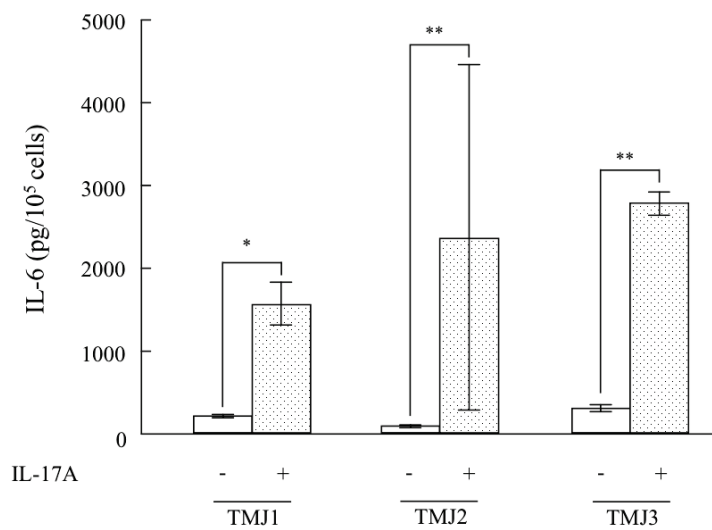


図10 IL-17A刺激滑膜細胞におけるIL-6タンパク質産生量
3名の異なる患者から採取した3例の滑膜細胞に、10 ng/mlのIL-17Aを24時間作用させIL-6産生量を測定した。

Mean \pm SD ($n = 6$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

6. IL-6 産生における IL-17A シグナル伝達経路

Signaling pathway 解析にて, IL-17A により誘導される多くのサイトカインはNF- κ B を介していることが示唆された. そこで, 我々は IL-17A が IL-6 を誘導する過程における NF- κ B 活性化経路について検討を行った. IL-17A 刺激を行なう前に, LY294002 (PI3K inhibitor), (5z)-7-oxozeaenol (TAK1 inhibitor), および PS-1145 (IKK β inhibitor) を作用させたところ IL-17A 刺激時と比較し, IL-6 の産生量の減少が認められた. 一方, IRAK-1/4 inhibitor 作用時では IL-6 の産生量減少は認められなかった. また, IL-6 産生量は LY294002 で 48.1 %, (5z)-7-oxozeaenol で 96.6%, PS-1145 では 37.0%の減少を認めた (図 11).

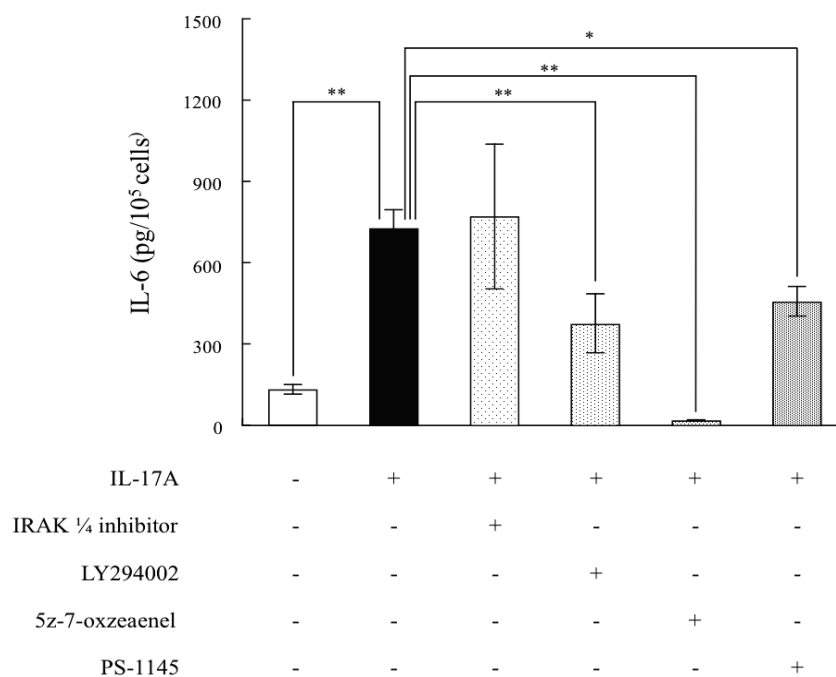


図11 IL-17A刺激滑膜細胞のIL-6産生におけるキナーゼ阻害薬の影響
IL-17A刺激を行なう前に, 各阻害薬を作用させIL-6の産生量を測定した.
Mean \pm SD ($n = 4$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

考察

I. TNF- α 刺激滑膜細胞におけるサイトカイン産生

培養ヒト顎関節滑膜細胞の遺伝子発現解析では、TNF- α 刺激時の遺伝子発現上昇率上位群にケモカインが多く含まれていた¹³⁾。そこで、今回はケモカイン antibody array を用いて TNF- α 刺激滑膜細胞におけるケモカイン産生量の検討を行った。本研究に用いた滑膜細胞は vimentin, prolyl 4-hydroxylase, HSP27 を発現し、HLA class II 抗原の発現は認められず、免疫組織学染色を用いた培養ヒト顎関節由来滑膜細胞についての報告^{28,29)} と類似していた。

Antibody array は現在多くの種類が開発されており、少量のサンプルで多くのタンパク質を同時に測定可能であるため、多くの分野で使用されている³⁰⁻³²⁾。今回の研究で使用した antibody array は最近の報告によりその有用性と信頼性が確認されている³²⁾。TNF- α 刺激滑膜細胞では MIP-3 α 等数種のケモカインタンパク質産生量は4時間から上昇するという報告があるため^{12,33)}、antibody array では TNF- α で4時間刺激した時のサンプルについて測定を行った。今回用いた antibody array の結果38種類のケモカインが測定できた。さらに、TNF- α 刺激時にケモカインが多く産生されていることが視覚的に確認できた。視覚的な差だけでなく、定量を行うために Phoretix 2D Evolution を用いた。定量化にあたり、antibody array のスポットが均一で脱落が無く、かつ1種のケモカインに対する2つのスポット間に差が少ないケモカインのデータのみを信頼に値するデータとして選択した。さらに TNF- α で産生量の増加を認められたケモカインは7種類であった。RA 患者の滑膜線維芽細胞、歯肉線維芽細胞および血管内皮細胞で TNF- α 刺激時の DNA

microarray 解析で遺伝子発現上位にケモカインが多いとの報告がある³⁴⁻³⁶⁾。よって、間質細胞は TNF- α 刺激によって種々のケモカイン発現を上昇させることが示唆された。

Antibody array では 4 時間刺激時のみの測定であったので、遺伝子発現解析では経時的に 2, 4 および 8 時間 TNF- α で刺激した。遺伝子発現変動のパターンは IL-8, MCP-1 および RANTES は継時的な遺伝子発現上昇を認め、MIP-3 α , IP-10 および Fractalkine は 4 時間がピークで、GRO α は 4 時間で遺伝子発現上昇率がいったん低下し再上昇を認めた。TNF- α 刺激滑膜細胞ではケモカイン以外に IL-1 β 等の他のサイトカインも産生される。ケモカイン遺伝子の産生上昇の継続や再上昇には、TNF- α 刺激によって産生された他のサイトカインからの影響の可能性が示唆された。

ケモカインは 7-16 kDa の分泌タンパク質で、N 末端側にある 2 アミノ酸形成モチーフで CXC, CC, CX3C および C の 4 つのサブファミリーに分類される³⁷⁾。今回タンパク質産生量と遺伝子発現量を測定した 7 種類のケモカインは、MIP-3 α , MCP-1 および RANTES は CC ケモカインに、GRO α , IL-8 および IP-10 は CXC ケモカインに、Fractalkine は CX3C ケモカインに分類される。その働きは、CC ケモカインは主に単球、CXC ケモカインは主に好中球、CX3C ケモカインは主に NK 細胞の遊走および活性を誘導する。さらに、N 末端に ELR (Glu-Leu-Arg) モチーフをもつ CXC ケモカインは血管新生に関与すると報告されており、GRO α および IL-8 が ELR モチーフを有する³⁷⁾。また、MCP-1 も血管内皮細胞を遊走させ血管新生を引き起こすといわれている³⁸⁾。ケモカインにより炎症性細胞は成熟化し、成熟化した炎症性細胞は炎症性サイトカイン³⁹⁾ および活性酸素等⁴⁰⁾ を産生するとの報告がある。本研究の結果から、TNF- α 刺激滑膜細胞

により産生されるケモカインは、ID 患者の滑膜における炎症性細胞の浸潤および毛細血管の増生に関与し、さらに炎症状態の増幅に関連すると考えられる (図 12).

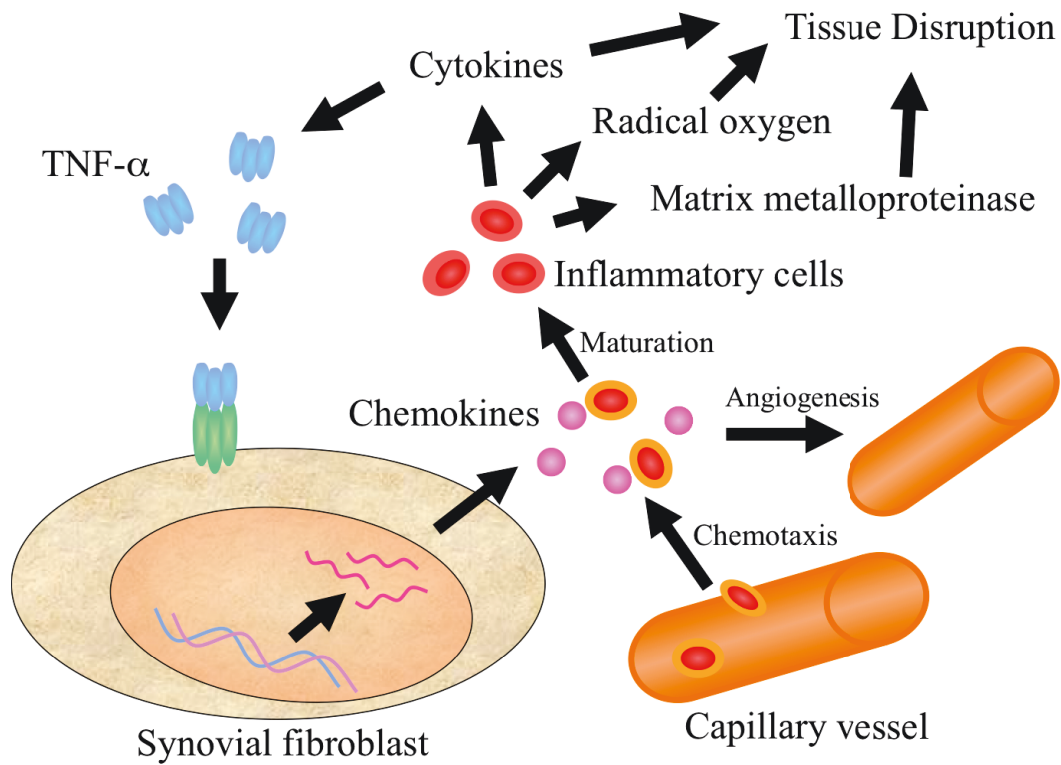


図12 滑膜細胞におけるTNF-αの影響

近年、リウマチ性関節炎において TNF-α抑制因子を用いた治療法が行われている⁴¹⁾。さらに、TNF-αの受容体である TNFR I を阻害すると IL-8, RANTES および MCP-1 の発現が減少するとの報告がある⁴²⁾。一方、関節炎モデルマウスで、MCP-1 のレセプターに対し、抗ケモカインレセプター抗体である MCP-1 (9-76) を用いた研究がなされている⁴³⁾。今後、顎関節領域においても ID 患者や OA-TMJ 患者の関節炎病態の治療法として、ケモカインの産生を抑制する治療の開発の可能性も考えられる。

II. 滑膜細胞に対する IL-17A の影響

近年の研究により IL-17A は RA のような自己免疫疾患および慢性炎症性疾患において重要な役割を持つことが報告されてきた。そこで、ID および OA-TMJ における IL-17A の影響を検討した。ID もしくは OA-TMJ 患者より採取した滑膜細胞を IL-17A で刺激し、遺伝子発現解析を行なった。はじめに、滑膜細胞が IL-17 シグナル伝達の起点となる IL-17R ファミリーを発現しているかどうかを調査したところ、滑膜細胞において IL-17RA-E 全ての IL-17R の発現を認めた。近年の研究では IL-17RC は多くの splice variants をもつことが報告されている^{44,45)}。本研究において、IL-17RC のプライマーについて NCBI のブラスト検索を行なったところ、IL-17RC とのみ相同性を有しているという結果を得ている。図 4 の電気泳動像で、IL-17RC の PCR 産物に 2 つのバンドが認められるが、これは IL-17RC の splice variants である可能性が示唆された。

次に、DNA microarray 解析をおこなった。無刺激時の滑膜細胞と比較し IL-17A 刺激滑膜細胞において 2 倍以上の発現変動を認めた遺伝子は 1,710 遺伝子だった。また、IL-17A により発現変動した遺伝子群を IPA へアップロードし、生物学的機能および分子間相互作用を検討した。その結果、IL-17A によって発現変動した多くの遺伝子は “inflammatory response” や “immunological disease” 関連遺伝子に分類された。そして、多形核白血球の遊走や活性化に関与する、ケモカインスーパーファミリーメンバーを多く認めた。本研究では、発現上昇率の高い GRO α 、IL-8 および MIP-3 α について経時的遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて検討した。IL-17A による GRO α 、IL-8 および MIP-3 α の遺伝子発現上昇は 24 時間まで継続して

いた。IL-17A は RA の病態形成において炎症性細胞遊走の中心的役割を持つことが報告されている⁴⁶⁾。炎症性細胞は異物排除に必要な細胞ではあるが、炎症性サイトカインや細胞外基質分解酵素を産生することから、病態形成促進を引き起こすと考えられている。炎症性細胞は ID 患者の滑膜組織および滑液中でも検出されているため^{47,48)}、IL-17A は顎関節症において多形核白血球遊走を通して炎症誘導に関与していることが示唆された。一方、MIP-3 α はIL-17を産生するTh17を誘導することが報告されている⁴⁹⁾。さらに、MIP-3 α によって誘導されたTh17は顎関節症の滑膜組織においてIL17Aを増加させていると考えられる。

滑膜細胞のIL-6の経時的遺伝子発現はreal-time PCR法でIL-17A刺激後4時間から24時間まで発現量の上昇が認められた。また、IL-6タンパク質産生量は時間依存性的およびIL-17Aの濃度依存的に上昇を認めた。さらに、IL-17AによるIL-6タンパク質産生量上昇は、3名の患者より採取した滑膜細胞すべてにおいて認められた。IL-6はRA患者の滑液中でも高濃度で検出されること^{50,51)}、IL-6は破骨細胞形成に関与することから⁵²⁾、RAの骨破壊において重要な役割を担っていることが報告されている^{53,54)}。また、近年IL-6がCD4陽性T細胞のTh17への分化へ関与していることが報告された。IL-6の可溶性レセプターの抗体はRAの治療薬として効果を上げている。顎関節領域でもIDおよびOA患者の滑液中ではIL-6が上昇していることが報告されている^{6,55)}。よってIL-17Aは滑膜細胞のIL-6を上昇させることにより顎関節部の炎症および骨破壊に関与する可能性が示唆された。

ケモカインやIL-6の発現はsignaling pathway解析から、主としてNF- κ Bの活性化が関与していると考えられる。IL-17AのレセプターはIL-17RAとIL-17RCのヘテロ2量体であり²⁰⁾、アストロサイト等にお

いて NF- κ B の活性化を誘導することが報告されている^{56,57)}. IL-17A による NF- κ B 活性化は, IL-1 β および TNF- α の NF- κ B 活性化経路と一部共有のシグナル伝達因子を介していると考えられている⁵⁸⁾. 我々は以前, IL-1 β および TNF- α 刺激滑膜細胞における遺伝子発現解析を行なっており^{59,60)}, IL-17A により発現上昇する遺伝子の多くは IL-1 β および TNF- α により発現上昇する遺伝子と共通している. そこで, IL-17A の NF- κ B 活性化経路を調査するため, IL-17A 刺激滑膜細胞の IL-6 産生における NF- κ B 伝達経路阻害薬の効果を検討した. その結果, IL-17A 刺激滑膜細胞において LY294002 (PI3K inhibitor), (5z)-7-oxozeaenol (TAK1 inhibitor) および PS-1145 (IKK β inhibitor) で IL-6 阻害を認めたが, IRAK-1/4 inhibitor では阻害を認めなかった. そのため IL-17A のシグナル伝達経路は IL-1 β と同様に TAK1 およびその下流の NF- κ B 活性化経路を介していることが示唆された. また, TNF- α の NF- κ B 活性化経路は PI3K/Akt シグナルを介していることが報告されており⁶¹⁾, IL-17A 刺激滑膜細胞では LY294002 (PI3K inhibitor) によって IL-6 産生は低下したことから, PI3K/Akt シグナルも関与していることが示唆された. PI3K/Akt シグナルは, p53 の阻害, Bak/Bax が誘導するアポトーシスおよび AP-1 の活性化を阻害することで, 細胞の生存に関与していることが報告されている⁶²⁾. また, TAK1 阻害薬は IKK β 阻害薬よりもさらに強い IL-6 阻害作用を認めた. TAK1 シグナルは NF- κ B の活性化に加え, MAPK シグナル経路など他のシグナル伝達経路と関連していることが報告されている⁶³⁾. 以上のことから, 滑膜細胞において IL-17A は NF- κ B 以外にも複数のシグナル伝達経路を介し, IL-6 の産生に関与していることが示唆された (図 13).

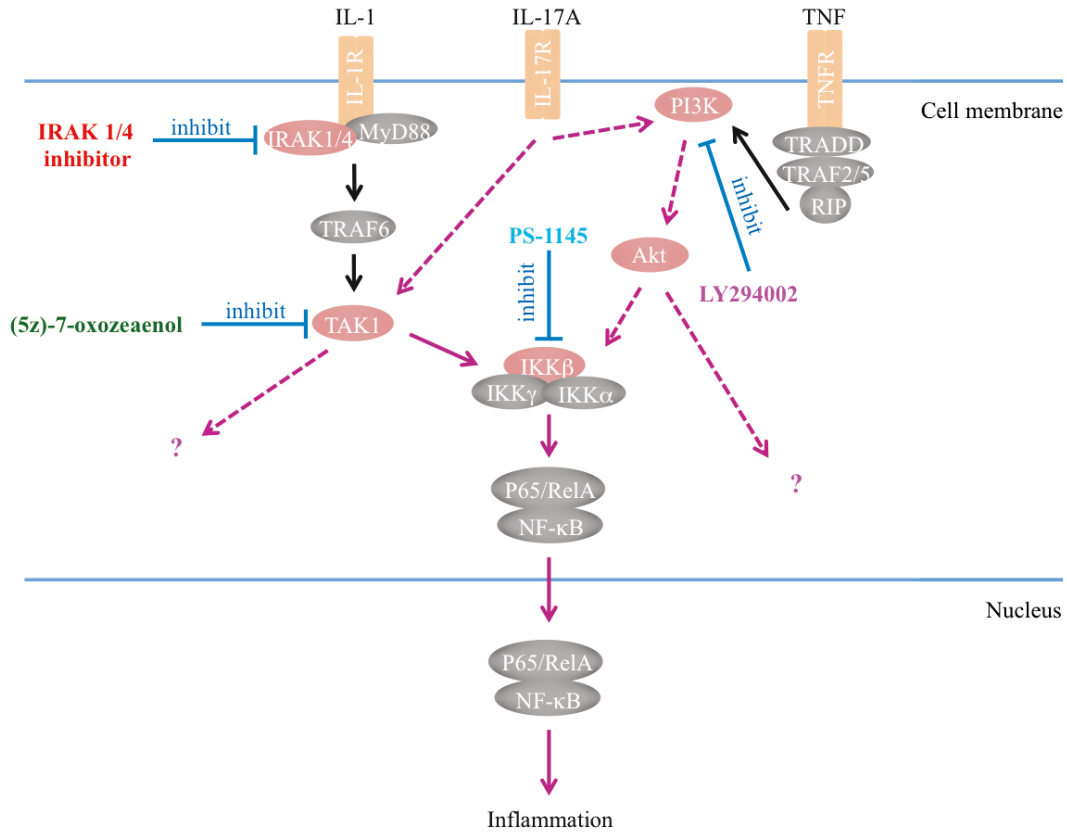


図13 滑膜細胞におけるIL-17Aシグナル伝達経路の模式図

顎関節病態形成におけるIL-17Aの影響を図14に示す。本研究の結果から、IL-17Aは主としてNF-κB経路を介してIL-6やケモカインを発現上昇させることが明らかとなった。発現上昇したIL-6やケモカインは、IDやOA-TMJの滑膜組織における多形核白血球の遊走に重要な役割を持つことが考えられる。以上のことから、IL-17AはIDやOA-TMJにおける炎症病態の形成や亢進に寄与していることが示唆された。

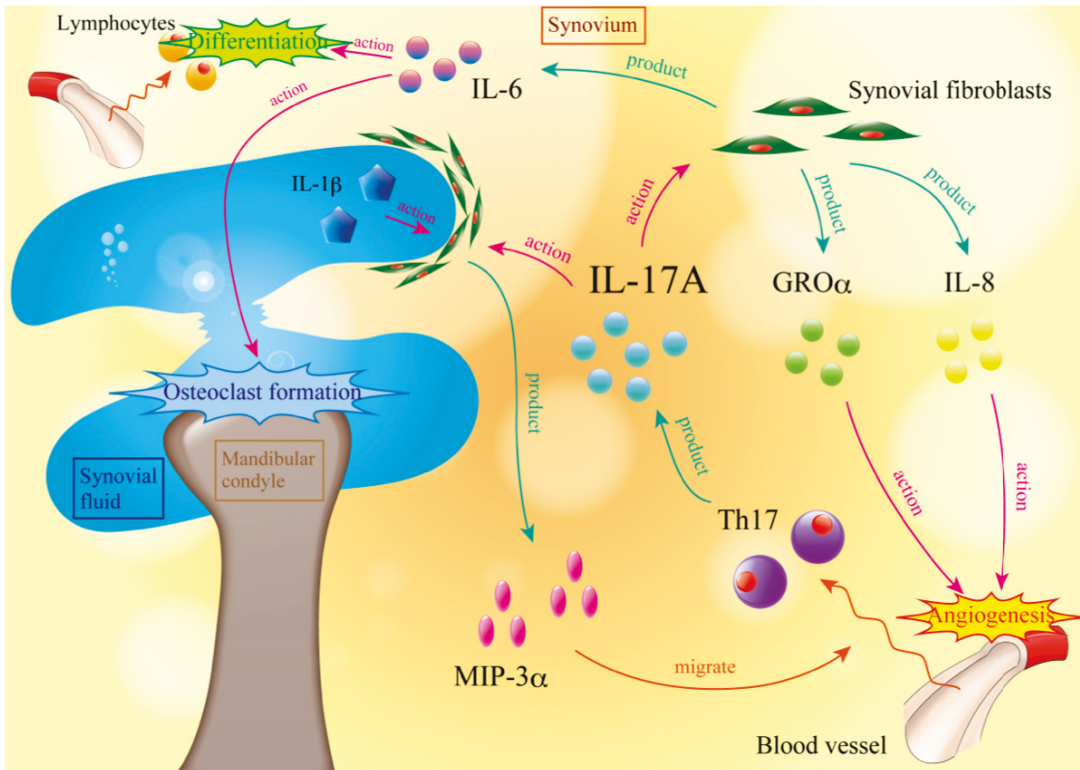


図14 顎関節の炎症病態におけるIL-17Aの影響

結語

本研究では顎関節の炎症病態関連因子の検索を目的に、滑膜細胞に TNF- α または IL-17A で刺激を行い、網羅的発現解析を行い、以下の結果を得た。

- 1) Human chemokine antibody array で同定できる 38 種類のケモカインのうち、無刺激時と比較して TNF- α 刺激滑膜細胞で、増加が認められたケモカインは 7 種類であった。そのうち、TNF- α 刺激時のタンパク質産生上昇率は MIP-3 α が最も高く、次いで GRO α 、IL-8、MCP-1、RANTES、IP-10、Fractalkine の順であった。
- 2) Antibody array で TNF- α 刺激によりタンパク質産生上昇率を確認した MIP-3 α 、GRO α 、IL-8、MCP-1、RANTES、IP-10 および Fractalkine 遺伝子発現量は TNF- α 刺激によって上昇していた。
- 3) 滑膜細胞では、IL-17R ファミリー (IL-17RA-E) のすべての発現を認めた。
- 4) DNA microarray 解析の結果、27,583 遺伝子のうち、無刺激時と比較し IL-17A 刺激により 2 倍以上発現変動した遺伝子は 1,710 遺伝子であった。そのうち発現上昇した遺伝子は 389 遺伝子で、発現減少した遺伝子は 1,321 遺伝子であった。
- 5) Signaling pathway 解析の結果、IL-17A により発現上昇を認めた遺伝子には IL-6 やケモカインがあり、これらの遺伝子の発現変動には NF- κ B 複合体の関与が認められた。
- 6) 滑膜細胞では、IL-6、GRO α および IL-8 の遺伝子発現量は IL-17A 刺激 4、8、12、24 時間において遺伝子発現量上昇を認めた。また、MIP-3 α の遺伝子発現量は IL-17A 刺激 8、12、24 時間において遺伝子発現量

上昇を認めた.

7) 滑膜細胞では, IL-17A の濃度依存的に IL-6 タンパク質産生量の上昇を認めた. また, IL-17A 刺激時間依存的に IL-6 タンパク質産生量の上昇を認めた.

8) LY294002 (PI3K inhibitor), (5z)-7-oxozeaenol (TAK1 inhibitor), および PS-1145 (IKK β inhibitor) を作用させたところ IL-17A 刺激時と比較し, IL-6 の産生量の減少が認められた. 一方, IRAK-1/4 inhibitor 作用時では IL-6 の産生量減少は認められなかった.

以上の結果から TNF- α や IL-17A はヒト顎関節滑膜細胞においてサイトカインやケモカイン等の発現を上昇させることで, 関節腔内の炎症病態を形成増幅すると推察された.

本論文は, 参考文献 1 「抗体アレイを用いた TNF- α 刺激ヒト顎関節滑膜細胞のケモカイン産生解析」日本顎関節学会雑誌, 2014 および, 参考文献 2 「Gene Expression Profiling of IL-17A-treated Synovial Fibroblasts from the Human Temporomandibular Joint」 Mediators of Inflammation 掲載予定, をまとめたものである.

引用文献

- 1) T. Kondoh, M. F. Dolwick, Y. Hamada et al., "Visually guided irrigation for patients with symptomatic internal derangement of the temporomandibular joint: a preliminary report," *Oral surgery, Oral medicine, Oral pathology, Oral radiology, and Endodontics*, vol. 95, no. 5, pp. 544-551, 2003.
- 2) L. C. Dijkgraaf, R.S. Liem, L. G. de Bont, "Synovial membrane involvement in osteoarthritic temporomandibular joints: a light microscopic study," *Oral surgery, Oral medicine, Oral pathology, Oral radiology, and Endodontics*, vol. 83, no. 3, pp. 373-386, 1997.
- 3) T. Takahashi, T. Kondoh, M. Fukuda et al., "Proinflammatory cytokines detectable in synovial fluids from patients with temporomandibular disorders," *Oral surgery, Oral medicine, Oral pathology, Oral radiology, and Endodontics*, vol. 85, no. 2, pp. 135-141, 1998.
- 4) K. Kaneyama, N. Segami, M. Nishimura M et al., "Importance of proinflammatory cytokines in synovial fluid from 121 joints with temporomandibular disorders," *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 40, no. 5, pp. 418-423, 2002.
- 5) M. Nishimura, N. Segami, K. Kaneyama et al., "Comparison of cytokine level in synovial fluid between successful and unsuccessful cases in arthrocentesis of the temporomandibular joint," *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 62, no. 3, pp. 284-287, 2004.
- 6) K. Kaneyama, N. Segami, J. Sato et al., "Interleukin-6 family of cytokines as biochemical markers of osseous

changes in the temporomandibular joint disorders,” *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 42, no. 3, pp. 246-250, 2004.

7) D. H. Manicourt, P. Poilvache, A. Van Egeren et al., “Synovial fluid levels of tumor necrosis factor alpha and oncostatin M correlate with levels of markers of the degradation of crosslinked collagen and cartilage aggrecan in rheumatoid arthritis but not in osteoarthritis,” *Arthritis and Rheumatism*, vol. 43, no. 2, pp. 281-288, 2000.

8) S. A. Metawi, D. Abbas, M. M. Kamal et al., “Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA,” *Clinical Rheumatology*, vol. 30, no. 9, pp. 1201-1207, 2011.

9) B. Chen, Y. Deng, Y. Tan et al., “Association between severity of knee osteoarthritis and serum and synovial fluid interleukin 17 concentrations,” *The Journal of International Medical Research*, vol. 42, no. 1, pp. 138-144, 2014.

10) L. Altomonte, A. Zoli, L. Mirone et al., “Serum levels of interleukin-1b, tumour necrosis factor-a and interleukin-2 in rheumatoid arthritis. Correlation with disease activity,” *Clinical Rheumatology*, vol. 11, no. 2, pp. 202-205, 1992.

11) R. E. Jones and L. W. Moreland, “Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis,” *Bulletin on the Rheumatic Diseases*, vol. 48, no. 3, pp. 1-4, 1999.

- 12) M. Akutsu, N. Ogura, K. Ito et al., “Effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on macrophage inflammatory protein-3 α production in synovial fibroblast-like cells from human temporomandibular joints,” *Journal of Oral Pathology and Medicine*, vol. 42, no. 6, pp. 491-498, 2013.
- 13) 阿久津美和, 小倉直美, 酒巻裕之 他., “顎関節内障患者滑膜細胞のTNF- α 刺激による遺伝子発現プロファイリング,” *日本口腔外科学会雑誌*, vol. 53, no. 9, pp. 538-544, 2007.
- 14) M. Endres, K. Andreas, G. Kalwitz et al., “Chemokine profile of synovial fluid from normal, osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients: CCL25, CXCL10 and XCL1 recruit human subchondral mesenchymal progenitor cells,” *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 18, no. 11, pp. 1458-1466, 2010.
- 15) U. Hampel, S. Sesselmann, P. Iserovich et al., “Chemokine and cytokine levels in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fluid,” *Journal of Immunological Methods*, vol. 396, no. 1-2, pp. 134-139, 2013.
- 16) K. Matsumoto, K. Honda, M. Ohshima et al., “Cytokine profile in synovial fluid from patients with internal derangement of the temporomandibular joint: a preliminary study,” *Dentomaxillofacial Radiology*, vol. 35, no. 6, pp. 432-441, 2006.
- 17) Z. Yao, S. L. Painter, W. C. Fanslow et al., “Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells,” *The Journal of Immunology*, vol. 155, no. 12, pp. 5483-5486, 1995.

- 18) P. Miossec, "IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases," *Microbes and Infection*, vol. 11, no. 5, pp. 625-630, 2009.
- 19) T. A. Moseley, D. R. Haudenschild, L. Rose et al., "Interleukin-17 family and IL-17 receptors," *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 14, no. 2, pp. 155-174, 2003.
- 20) S. H. Chang and C. Dong, "IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation," *Cytokine*, vol. 46, no. 1, pp. 7-11, 2009.
- 21) S. A. Metawi, D. Abbas, M. M. Kamal et al., "Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA," *Clinical Rheumatology*, vol. 30, no. 9, pp. 1201-1207, 2011.
- 22) B. Chen, Y. Deng, Y. Tan et al., "Association between severity of knee osteoarthritis and serum and synovial fluid interleukin 17 concentrations," *The Journal of International Medical Research*, vol. 42, no. 1, pp. 138-144, 2014.
- 23) E. M. Moran, R. Mullan, J. McCormick et al., "Human rheumatoid arthritis tissue production of IL-17A drives matrix and cartilage degradation: synergy with tumour necrosis factor-alpha, Oncostatin M and response to biologic therapies," *Arthritis Research and Therapy*, vol. 11, no. 4, article R113, 2009.

- 24) M. L. Toh, G. Gonzales, M. I. Koenders et al., "Role of interleukin 17 in arthritis chronicity through survival of synoviocytes via regulation of synoviolin expression," *PLoS ONE*, vol. 5, no. 10, Article ID e13416, 2010.
- 25) G. Q. Li, Y. Zhang, D. Liu et al., "Celastrol inhibits interleukin-17A-stimulated rheumatoid fibroblast-like synoviocyte migration and invasion through suppression of NF- κ B-mediated matrix metalloproteinase-9 expression," *International Immunopharmacology*, vol. 14, no. 4, pp. 422-431, 2012.
- 26) Y. Chen, M. Zhong, L. Liang et al., "Interleukin-17 induces angiogenesis in human choroidal endothelial cells in vitro," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 55, no. 10, pp. 6968-6975, 2014.
- 27) K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta$ C_T) Method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402-408, 2001.
- 28) H. Nagai, Y. Miyamoto, A. Nakata et al., "Isolation and characterization of synovial cells from the human temporomandibular joint," *Journal of oral pathology and medicine*, vol. 35, no. 2, pp. 104-110, 2006.
- 29) M. Tobe, N. Ogura, Y. Abiko et al., "Interleukin-1 β stimulates interleukin-8 production and gene expression in synovial cells from human temporomandibular joint," *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 60, no. 7, pp. 741-747, 2002.
- 30) T. Liu, R. Xue, L. Dong et al., "Rapid determination of serological cytokine biomarkers for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma using antibody microarrays," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, vol. 43,

no. 1, pp. 45-51, 2011.

31) D. J. Marks, M. W. Harbord, R. MacAllister et al., "Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation," *Lancet*, vol. 367, no. 9511, pp. 668-678, 2006.

32) B. C. Liu, L. Zhang, L. L. Lv et al., "Application of antibody array technology in the analysis of urinary cytokine profiles in patients with chronic kidney disease," *American Journal of Nephrology*, vol. 26, no. 5, pp. 483-490, 2006.

33) N. Ogura, M. Tobe, H. Sakamaki et al., "Tumor necrosis factor-alpha increases chemokine gene expression and production in synovial fibroblasts from human temporomandibular joint," *Journal of Oral Pathology and Medicine*, vol. 34, no. 6, pp. 357-363, 2005.

34) H. G. Zhang, K. Hyde, G. P. Page et al., "Novel tumor necrosis factor alpha-regulated genes in rheumatoid arthritis," *Arthritis and rheumatism*, vol. 50, no. 2, pp. 420-431, 2004.

35) H. Davanian, T. Båge, J. Lindberg et al., "Signaling pathways involved in the regulation of TNF α -induced toll-like receptor 2 expression in human gingival fibroblasts," *Cytokine*, vol. 57, no. 3, pp. 406-416, 2012.

36) S. Magder, J. Neculcea, V. Neculcea et al., "Lipopolysaccharide and TNF-alpha produce very similar changes in gene expression in human endothelial cells," *Journal of Vascular Research*, vol. 43, no. 5, pp. 447-461, 2006.

- 37) 義江修: ケモカインスーパーファミリーの構造と機能. 田中弥生, 編; ケモカインハンドブック, 1版, 東京: 秀潤社; 2000, 10-19頁.
- 38) R. Salcedo, M. L. Ponce, H. A. Young et al., “Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression,” *Blood*, vol. 96, no. 1, pp. 34-40, 2000.
- 39) K. Tiku, M. L. Tiku, J. L. Skosey, “Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils,” *The Journal of Immunology*, vol. 136, no. 10, pp. 3677-3685, 1986.
- 40) K. Mikawa, H. Akamatsu, K. Nishina et al., “The effects of sarpogrelate on superoxide production by human neutrophils,” *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, vol. 25, no. 2, pp. 181-186, 2000.
- 41) B. Fautrel, A. Constantin, J. Morel et al., “Recommendations of the French Society for Rheumatology. TNFalpha antagonist therapy in rheumatoid arthritis,” *Joint Bone Spine*, vol. 73, no. 4, pp. 433-441, 2006.
- 42) E. M. Schmidt, M. Davies, P. Mistry et al., “Selective blockade of tumor necrosis factor receptor I inhibits proinflammatory cytokine and chemokine production in human rheumatoid arthritis synovial membrane cell cultures,” *Arthritis and Rheumatism*, vol. 65, no. 9, pp. 2262-2273, 2013.
- 43) J. H. Gong, R. Yan, J. D. Waterfield et al., “Post-onset inhibition of murine arthritis using combined chemokine antagonist therapy,” *Rheumatology*, vol. 43, no. 1, pp. 39-42, 2004.

- 44) D. R. Haudenschild, S. B. Curtiss, T. A. Moseley et al., "Generation of interleukin-17 receptor-like protein (IL-17RL) in prostate by alternative splicing of RNA," *The Prostate*, vol. 66, no. 12, pp. 1268-1274, 2006.
- 45) S. Zhou, X. S. Qiu, Z. Z. Zhu et al., "A single-nucleotide polymorphism rs708567 in the IL-17RC gene is associated with a susceptibility to and the curve severity of adolescent idiopathic scoliosis in a Chinese Han population: a case-control study," *BMC Musculoskeletal Disorders*, vol. 13, article 181, 2012.
- 46) E. M. Moran, M. Connolly, W. Gao et al., "Interleukin-17A induction of angiogenesis, cell migration, and cytoskeletal rearrangement," *Arthritis and rheumatism*, vol. 63, no. 11, pp. 3263-3273, 2011.
- 47) K. Fu, X. Ma, Z. Zhang et al., "Interleukin-6 in synovial fluid and HLA-DR expression in synovium from patients with temporomandibular disorders," *Journal of orofacial pain*, vol. 9, no. 2, pp. 131-137, 1995.
- 48) J. Sato, N. Segami, M. Nishimura et al., "Expression of interleukin 6 in synovial tissues in patients with internal derangement of the temporomandibular joint," *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 41, no. 2, pp. 95-101, 2003.
- 49) T. Mabuchi, T. W. Chang, S. Quinter et al., "Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis," *Journal of Dermatological Science*, vol. 65, no. 1, pp. 4-11, 2012.

- 50) N. G. Arvidson, B. Gudbjörnsson, L. Elfman et al., "Circadian rhythm of serum interleukin-6 in rheumatoid arthritis," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 53, no. 8, pp. 521-524, 1994.
- 51) P. Silacci, J. M. Dayer, A. Desgeorges et al., "Interleukin (IL)-6 and its soluble receptor induce TIMP-1 expression in synoviocytes and chondrocytes, and block IL-1-induced collagenolytic activity," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 22, pp. 13625-13629, 1998.
- 52) R. Axmann, C. Böhm, G. Krönke et al., "Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 60, no. 9, pp. 2747-2756, 2009.
- 53) T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka et al., "IL-17 and Th17 Cells," *Annual Review of Immunology*, vol. 27, pp. 485-517, 2009.
- 54) A. Kimura and T. Kishimoto, "IL-6: regulator of Treg/Th17 balance," *European Journal of Immunology*, vol. 40, no. 7, pp. 1830-1835, 2010.
- 55) M. Nishimura, N. Segami, K. Kaneyama et al., "Proinflammatory cytokines and arthroscopic findings of patients with internal derangement and osteoarthritis of the temporomandibular joint," *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 40, no. 1, pp. 68-71, 2002.

- 56) G. Li, Y. Zhang, Y. Qian et al., "Interleukin-17A promotes rheumatoid arthritis synoviocytes migration and invasion under hypoxia by increasing MMP2 and MMP9 expression through NF- κ B/HIF-1 α pathway," *Molecular Immunology*, vol. 53, no. 3, pp. 227-236, 2013.
- 57) G. Elain, K. Jeanneau, A. Rutkowska et al., "The selective anti-IL17A monoclonal antibody secukinumab (AIN457) attenuates IL17A-induced levels of IL6 in human astrocytes," *Glia*, vol. 62, no. 5, pp. 725-735, 2014.
- 58) S. Y. Hwang, J. Y. Kim, K. W. Kim et al., "IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways," *Arthritis Research and Therapy*, vol. 6, no. 2, pp. R120-R128, 2004.
- 59) N. Ogura, M. Akutsu, M. Tobe et al., "Microarray analysis of IL-1beta-stimulated chemokine genes in synovial fibroblasts from human TMJ," *Journal of Oral Pathology and Medicine*, vol. 36, no. 4, pp. 223-228, 2007.
- 60) M. Akutsu, N. Ogura, K. Ito et al., "Effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on macrophage inflammatory protein-3 α production in synovial fibroblast-like cells from human temporomandibular joints," *Journal of Oral Pathology and Medicine*, vol. 42, no. 6, pp. 491-498, 2013.
- 61) J. B. Huang, Y. Ding, D. S. Huang et al., "Inhibition of the PI3K/AKT pathway reduces tumor necrosis factor-alpha production in the cellular response to wear particles in vitro," *Artificial Organs*, vol. 37, no. 3, pp. 298-307, 2013.

62) P. Escoll, I. Ranz, N. Muñoz-Antón et al., “Sustained interleukin-1 β exposure modulates multiple steps in glucocorticoid receptor signaling, promoting split-resistance to the transactivation of prominent anti-inflammatory genes by glucocorticoids,” *Mediators of Inflammation*, vol. 2015, article 347965, 2015.

63) M. C. Walsh, G. K. Kim, P. L. Maurizio et al., “TRAF6 autoubiquitination-independent activation of the NFkappaB and MAPK pathways in response to IL-1 and RANKL,” *PLoS ONE*, vol. 3, no. 12, Article ID e4064, 2008.