

培養ヒト顎関節線維芽細胞様細胞を用いた顎関節炎症病態関連因子の検索

-DNA マイクロアレイ解析および線維芽細胞様細胞と単球の共培養-

日本大学大学院松戸歯学部研究科歯学専攻

渡邊 駿

(指導：近藤 壽郎 教授)

## 緒言

顎関節において比較的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)の滑膜には, 毛細血管の増生や炎症性細胞の浸潤といった滑膜炎所見が認められる<sup>1-2)</sup>. また, IDやOA-TMJ患者滑液中では, 代表的な炎症性サイトカインである Interleukin-1 $\beta$  (以下 IL-1 $\beta$ と略) や tumor necrosis factor - $\alpha$  (以下 TNF- $\alpha$ と略) が検出されると報告されている<sup>3,4)</sup>. IL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ は, 多様な作用を有し, 滑膜組織細胞やマクロファージに作用し, 炎症性因子や細胞外基質分解酵素の産生を促進すると報告されており<sup>5,6)</sup>, 関節疾患の炎症病態形成や組織破壊に関与すると考えられている<sup>7,8)</sup>. そこで, 顎関節の炎症病態形成メカニズムを解明する一環として, ヒト顎関節滑膜由来線維芽細胞様細胞に IL-1 $\beta$ と TNF- $\alpha$ を作用させ網羅的な遺伝子発現解析を行った. 本研究では, 網羅的遺伝子発現解析により発現上昇を認めた CSF について注目した. Colony stimulating factor (以下 CSF と略)には macrophage colony stimulating factor (以下 M-CSF と略), granulocyte macrophage colony stimulating factor (以下 GM-CSF と略), granulocyte colony stimulating factor (以下 G-CSF と略) の3つのサブセットが存在する. これら CSF は, マクロファージおよび顆粒球の増殖因子として発見され<sup>9)</sup>, その後, マクロファージや好中球の分化促進等, 多様な作用を持つことが報告されている<sup>10)</sup>.

顎関節滑膜の表層には, 線維芽細胞様細胞とマクロファージ様細胞が存在しており, 線維芽細胞様細胞は滑液の産生や細胞外マトリックスの産生, マクロファージ様細胞は異物の除去などを行っているといわれている<sup>11)</sup>. 両細胞は顎関節の恒常性の維持を行うとともに, 炎症の病態形成にも重要な役割を担っていると考えられている<sup>11-13)</sup>. 関節リウマチ等の関節疾患病態形成において, マクロファージ様細胞と

線維芽細胞様細胞でのクロストークについて研究が行われている<sup>14,15)</sup>。しかし、顎関節滑膜でマクロファージ様細胞と線維芽細胞様細胞とのクロストークに関する報告はない。

そこで、本研究では、顎関節滑膜炎の病態形成機序の検討を目的に以下の2つの研究を行った。初めに、ヒト顎関節線維芽細胞様細胞の網羅的な遺伝子発現解析により発現上昇したCSFの遺伝子発現量、タンパク質産生量およびタンパク質産生経路について検討を行った。次に、ヒト末梢血より分離した単球とヒト顎関節線維芽細胞様細胞の共培養を行い、両細胞のクロストークによる炎症病態形成メカニズムについて調査した。

## 材料および方法

### 1. ヒト顎関節線維芽細胞様細胞, および単球の培養

#### 1) ヒト顎関節線維芽細胞様細胞の培養

ID患者の顎関節上関節腔鏡視下洗浄療法<sup>1)</sup>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、滑膜組織からout growth法を用いて、線維芽細胞様細胞(以下滑膜線維芽細胞と略)を得た。培養は10% fetal bovine serum(以下FBSと略)(Cell Culture Technologies社製)および100 U/ml penicillin G(明治製薬会社製), 100 µg/ml kanamycin(明治製薬会社製), 250 ng/ml fungizone(Gibco社製)を含むHam's F12培地(Wako社製)にて、37°C, 5%CO<sub>2</sub>条件下で行った。本研究にはインフォームドコンセントを行ったID患者3名から得た滑膜線維芽細胞を使用した。本実験は日本大学松戸歯学部倫理委員会(認証番号: EC10-037 および EC15-039)の指針に従って行った。

得られた滑膜線維芽細胞は、IL-1β, TNF-αの単独刺激およびIL-1βとTNF-αの共刺激を行い、DNA

microarray, real-time polymerase chain reaction (PCR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法および mitogen-activated protein kinase (MAPK), nuclear factor-kappa B (NFκB) 阻害薬を用いた実験に使用した。

## 2) 単球の培養

本実験で用いた単球は、ヒト末梢血より CD14 マイクロビーズを用いて分離した単球を LONZA 社より購入した。培養は 10% FBS および 100 U/ml penicillin G, 100 μg/ml kanamycin, 250 ng/ml fungizone を含む RPMI 1640 培地にて、37°C, CO<sub>2</sub> 条件下で行った。

## 2. total RNA の抽出

滑膜線維芽細胞を 100 mm ディッシュ内に  $1 \times 10^6$  cells 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。その後、滑膜線維芽細胞を 0.1 ng/ml IL-1β, 10 ng/ml TNF-α および 0.1 ng/ml IL-1β と 10 ng/ml TNF-α の共刺激を 2, 4, 8 時間行い、TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific 社製) にて細胞溶解し、AGPC 法を用いて Total RNA を抽出した。また、刺激を加えない細胞からも Total RNA を抽出し、control とした。抽出した RNA は使用するまで -80°C 下で保存した。

## 3. DNA microarray 解析

滑膜線維芽細胞を IL-1β および TNF-α で 4 時間刺激した後、抽出した Total RNA を使用した。Total RNA の純度および品質は RNA 6000 Nano Gel System を用いて Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 社製) にて測定し、DNA microarray 解析に使用可能であることを確認した。DNA microarray 解析は、以下の如く Affymetrix 社の通法に従って行った。すなわち、Total RNA 7~8μg を用いて、One-Cycle cDNA Synthesis 法により double-stranded cDNA を作製し、GeneChip Sample Cleanup Module kit (Affymetrix 社製) を用いて精製した。精製した cDNA から *in vitro* transcription にて biotin-labeled cRNA を増幅して精製し、DNA

microarray に十分な cRNA を得た。次に cRNA 10  $\mu\text{g}$  を断片化し, hybridization cocktail を作製し, Affymetrix Human Genome Focus Array (probe set; 8793, Affymetrix 社製) に添加し, 45°C で 16 時間 hybridization を行った。Hybridization 終了後, Array を Fluidics station (Affymetrix 社製) に設置し, 洗浄および streptavidin phycoerythrin (SARP: Molecular Probes) を用いた染色を行った。スキャナー (Affymetrix 社製) で画像を取り込み, Affymetrix Microarray Suite にて蛍光強度の測定を行った。データ解析には GeneSpring 解析ソフト (Agilent Technologies 社製) を用いた。

#### 4. Real-time PCR 法

Total RNA を 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に調整し, GeneAmp RNA PCR kit (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて cDNA を作製した。cDNA 溶液 2  $\mu\text{l}$ , 上流および下流の primer (20  $\mu\text{M}$ ) を各 0.4  $\mu\text{l}$ , DyNAmo SYBERGreen qPCR Master mix (Thermo Fisher Scientific 社製) を 10  $\mu\text{l}$ , 滅菌精製水を 7.2  $\mu\text{l}$  を加えて全量を 20  $\mu\text{l}$  とし, PCR 反応溶液を作製した。DNA Engine Opticon 1 (Bio Rad 社製) にて, 95°C で 5 分間加熱後, 94°C 15 秒, 55°C 30 秒, 72°C 30 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  $\Delta\Delta\text{CT}$  法<sup>16)</sup>を用いて計算した。Real-time PCR 法にて使用した primer は Table 1 に示す。

**Table 1** Primers used for PCR analysis of genes

Gene	Primers	Aplicon size (bp)
GM-CSF	F : 5'-GTCCTTCAGGTCTCTTTGA-3' R : 5'-CAGAAATGTTTGACCTCCAG-3'	206
G-CSF	F : 5'-GGGAGACCTGATACTCTCAA-3' R : 5'-TTTCATTCTCCTGCCTGTAG-3'	201
M-CSF	F : 5'-GCTGATGAGGGGAGACAGAG-3' R : 5'-CACCATGCGCTTCAGAGATA-3'	344
GAPDH	F : 5'-ATCGACTGTGGTCATGAG-3' R : 5'-ATCACCATCTTCCAGGAG-3'	318

F, forward; R, reverse; M-CSF, macrophage colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte macrophage colony stimulating factor; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

## 5. Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (以下 ELISA と略) 法を用いた CSF タンパク質産生量の測定には、滑膜線維芽細胞を 24-well plate に  $5.0 \times 10^4$  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、IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  を作用させ、培養上清中の GM-CSF, M-CSF, G-CSF は ELISA kit (R&D Systems) を用いて測定した。また、滑膜線維芽細胞、単球の単独培養および共培養時の培養上清中の IL-1 $\beta$ , IL-6 および IL-8 は ELISA kit (R&D Systems) を用いて測定した。

## 6. 阻害薬実験

滑膜線維芽細胞を 24-well plate に  $5.0 \times 10^4$  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。MAPK および NF $\kappa$ B 阻害薬の影響を検討するため、ERK1/2 阻害薬である 40  $\mu$ M PD98059 (Enzo 社製)、p38 阻害薬である 10  $\mu$ M SB203580 (Enzo 社製)、JNK1/2 阻害薬である 10  $\mu$ M SP600125 (Enzo 社製)、NF $\kappa$ B 阻害薬である 10  $\mu$ M APDC (Enzo 社製) をそれぞれ滑膜線維芽細胞に 15 分間作用させた。その後、37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$  条件下で 0.1 ng/ml IL-1 $\beta$ , 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , をそれぞれ 3 時間および 8 時間作用させた。培養上清は使用するまで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

## 7. 共培養

滑膜線維芽細胞と単球の共培養は、24-well plate を使用し、滑膜線維芽細胞および単球をそれぞれ同一 well 内に  $2.5 \times 10^4$  cells/well で播種した。3 日ごとに培養上清を回収し、新たな培地に交換し、12 日目まで培養した。滑膜線維芽細胞および単球の単独培養は、24-well plate に  $5.0 \times 10^4$  cells/well で播種した。培養 3 日

目および9日目の各培地を位相差顕微鏡にて観察した。培養は10% FBS および100 U/ml penicillin G, 100 µg/ml kanamycin, 250 ng/ml fungizone を含む RPMI 1640 培地を使用し, 培養上清は使用するまで-80℃で保存した。培養上清中のタンパク質は ELISA kit (R&D Systems) を用いて測定した。

## 8. 免疫細胞化学染色

培養6日目の単球を用いて, 免疫組織化学染色を行った。免疫細胞化学染色には一次抗体に, CD14 (1H5D8; Abcam 社製) および CD68 (KP1; Abcam 社製) を用いた。まず, 単球を10% 中性ホルマリンで30分間固定。その後, ブロッキングおよび透過処理を行なった。一次抗体を, 固定した単球に滴下し, 60分間室温にてインキュベート後, 二次抗体を滴下し, 60分間暗所で室温にてインキュベートした。染色後の観察は, 偏光顕微鏡 (高級システム偏光顕微鏡 BX51-P, OLYMPUS) を用いた。

## 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。

## 結果

### I. 滑膜線維芽細胞における IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ の影響

#### 1. DNA microarray 解析

ID 患者 3 名から得た滑膜線維芽細胞について、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , 共刺激および無刺激時の遺伝子発現を調べた。DNA microarray 解析で発現が低く、信頼性の低い遺伝子を除外した信頼可能な、遺伝子は 8133 遺伝子中 5737 遺伝子であった。IL-1 $\beta$ 刺激により 2 倍以上発現変動した遺伝子は 564 遺伝子であり、そのうち、2 倍以上発現上昇した遺伝子が 283 遺伝子、2 倍以上発現減少した遺伝子が 281 遺伝子であった。TNF- $\alpha$  刺激により 2 倍以上発現変動した遺伝子は 576 遺伝子であり、そのうち、2 倍以上発現上昇した遺伝子が 315 遺伝子、2 倍以上発現減少した遺伝子が 261 遺伝子であった。共刺激により 2 倍以上発現変動した遺伝子は 670 遺伝子であり、そのうち、2 倍以上発現上昇した遺伝子が 398 遺伝子、2 倍以上発現減少した遺伝子が 272 遺伝子であった。刺激により 2 倍以上発現上昇した遺伝子には各刺激で共通する遺伝子が多く認められ、いずれの刺激においても共通して発現上昇した遺伝子は 185 遺伝子認められた。一方、各刺激で共通して 2 倍以上発現減少した遺伝子は少なく、57 遺伝子であった (Figure 1)。

Table 2 に各刺激で発現上昇した上位 35 遺伝子を示す。発現上昇した上位遺伝子には過去に報告してきた CCL20 を始めとして chemokine superfamily が多く認められた<sup>7,8)</sup>。Chemokine 以外で最も発現上昇率が高かったのは GM-CSF であった。GM-CSF は IL-1 $\beta$ 刺激, TNF- $\alpha$ 刺激で 3 位, 共刺激では 2 位であった。CSF ファミリーである M-CSF は IL-1 $\beta$ 刺激では 27 位, TNF- $\alpha$ 刺激で 22 位, 共刺激において 34 位であった。G-CSF は共刺激のみ認められ 28 位であった。そこで、GM-CSF, M-CSF, G-CSF について検討を行うこととした。



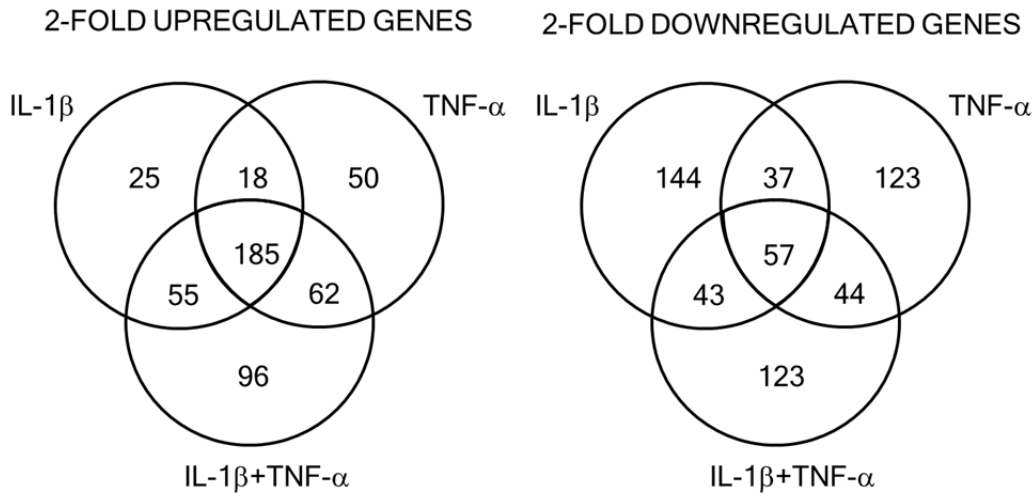


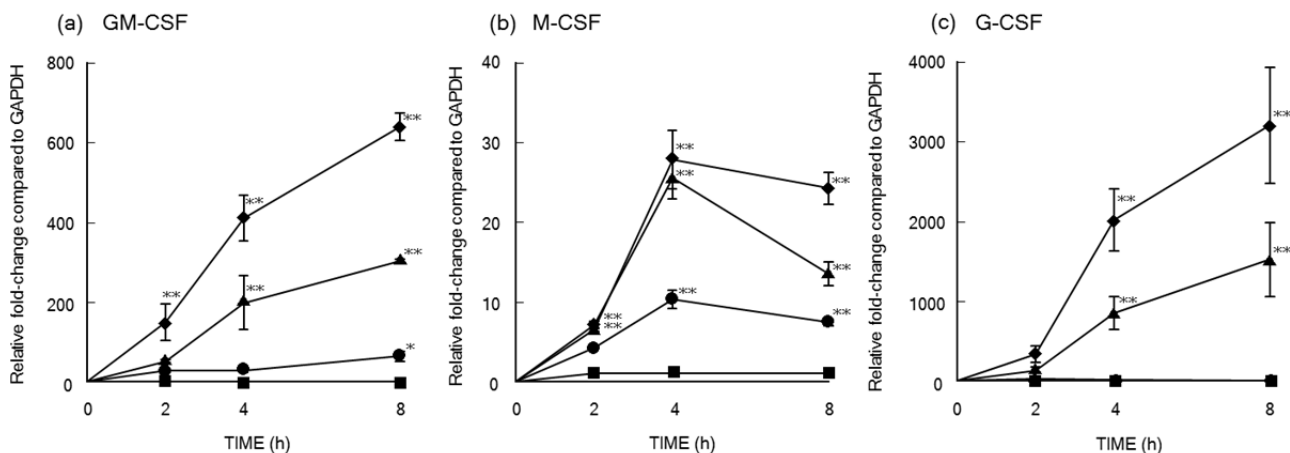
Figure 1 Venn diagram of regulated genes in microarray analysis of synovial fibroblasts stimulated with L-1 $\beta$  and/or TNF- $\alpha$ . Gene expression profiles of the cells were compared between non-treated control and stimulation. A Venn diagram of upregulated (a) or downregulated (b) genes in cells stimulated with IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , or co-stimulated with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  is shown.

**Table 2** Top 35 upregulated genes by all stimuli

Rank	IL-1 $\beta$			TNF- $\alpha$			IL-1 $\beta$ +TNF- $\alpha$		
	Gene	GenBank ID	Fold	Gene	GenBank ID	Fold	Gene	GenBank ID	Fold
1	CCL20	NM_004591	430.0	CCL20	NM_004591	322.2	CCL20	NM_004591	860.1
2	CXCL3	NM_002090	150.4	IL8	AF043337	76.7	GM-CSF	M11734	274.9
3	GM-CSF	M11734	107.4	GM-CSF	M11734	38.0	CXCL3	NM_002090	235.1
4	IL8	AF043337	89.8	ICAM1	NM_000201	32.1	IL8	AF043337	130.6
5	CXCL1	NM_001511	59.5	CXCL3	NM_002090	31.1	BCL2A1	NM_004049	116.6
6	CXCL2	M57731	50.1	CXCL10	NM_001565	27.8	CXCL1	NM_001511	75.3
7	IL6	NM_000600	40.1	BCL2A1	NM_004049	24.5	CXCL2	M57731	70.0
8	PTGS2	NM_000963	37.8	GCH1	NM_000161	21.9	PTGS2	NM_000963	63.7
9	BCL2A1	NM_004049	37.3	IL17RB	NM_018725	21.9	CXCL10	NM_001565	55.9
10	CXCL10	NM_001565	28.7	CX3CL1	U84487	21.6	IL1B	M15330	53.0
11	LIF	NM_002309	24.5	TNFAIP2	NM_006291	18.0	IL6	NM_000600	50.8
12	ICAM1	NM_000201	24.4	CXCL1	NM_001511	15.1	ICAM1	NM_000201	45.7
13	CCL7	NM_006273	23.5	LIF	NM_002309	14.5	SERPINB2	NM_002575	38.5
14	CCL8	A1984980	20.5	CLEC2D	NM_013269	13.9	LIF	NM_002309	35.5
15	GCH1	NM_000161	19.4	IL6	NM_000600	13.9	MMP1	NM_002421	34.1
16	IL17RB	NM_018725	18.4	PTGS2	NM_000963	13.7	MMP3	NM_002422	32.5
17	CXCL6	NM_002993	16.1	CXCL2	M57731	13.3	CCL7	NM_006273	29.5
18	IL1B	M15330	15.4	GPR56	AL554008	12.9	IL17RB	NM_018725	28.2
19	MMP3	NM_002422	12.2	TNFAIP3	NM_006290	12.8	GCH1	NM_000161	27.4
20	TNFAIP2	NM_006291	12.1	CCL5	NM_002985	12.0	INHBA	M13436	22.2
21	CLEC2D	NM_013269	12.0	CD83	NM_004233	11.8	CCL8	A1984980	21.4
22	LYN	A1356412	11.2	M-CSF	M37435	9.4	MYB	NM_005375	20.1
23	CX3CL1	U84487	11.1	STX11	AF071504	8.8	CXCL6	NM_002993	20.3
24	MMP1	NM_002421	10.9	IL1RN	U65590	8.8	GPR56	AL554008	19.7
25	GOS2	NM_015714	10.9	NKX3-1	AF247704	8.7	CLEC2D	NM_013269	18.8
26	BIRC3	U37546	9.1	CCL7	NM_006273	8.7	MAP3K8	NM_005204	17.5
27	M-CSF	M37435	9.0	MMP1	NM_002421	8.1	CCL5	NM_002985	16.9
28	TNFAIP3	NM_006290	9.0	CXCL6	NM_002993	8.1	G-CSF	NM_000759	15.9
29	MYB	NM_005375	8.4	MMP3	NM_002422	7.9	TNFAIP2	NM_006291	15.7
30	STX11	AF071504	8.3	NEUROG1	NM_006161	7.9	BIRC3	U37546	15.0
31	MAPK3K8	NM_005204	8.1	BIRC3	U37546	7.9	AREG	NM_001657	14.6
32	IER3	NM_003897	7.9	BDKRB1	NM_000710	7.6	GOS2	NM_015714	13.7
33	TNFRSF1B	NM_001066	7.8	TRAF1	NM_005658	7.5	CX3CL1	U84487	13.4
34	SERPINB2	NM_002575	7.6	ADORA2A	NM_000675	7.4	M-CSF	M37435	13.3
35	BDKRB1	NM_000710	7.5	SYCP1	X95654	7.3	CD83	NM_004233	13.2

## 2. CSF の経時的遺伝子発現

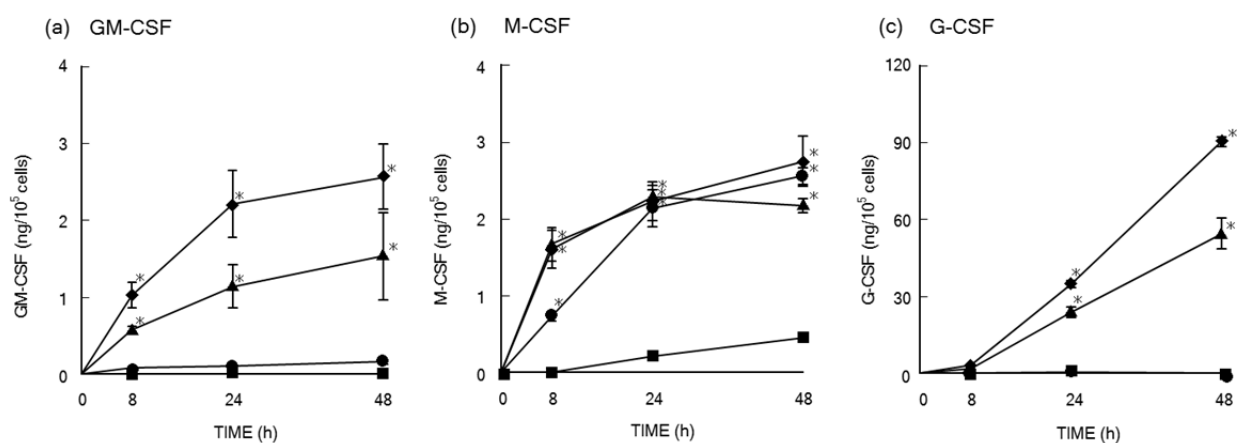
GM-CSF, M-CSF, および G-CSF 経時的遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて測定した. 各遺伝子の遺伝子発現を Figure 2 に示す. GM-CSF, M-CSF および G-CSF の遺伝子発現上昇はいずれも, 共刺激 > IL-1 $\beta$  刺激 > TNF- $\alpha$  刺激の順であった (Figure 2 (a)-(c)). また, GM-CSF, G-CSF は刺激後, 経過時間に依存して, 遺伝子発現の上昇を認めた (Figure 2 (a), (c)). M-CSF の遺伝子発現は, 刺激後 4 時間で最も発現が上昇し, その後発現の減少を認めた (Figure 2 (b)). また, GM-CSF, G-CSF 遺伝子発現において, 共刺激時の発現上昇には, IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  の相乗効果が認められた. M-CSF 遺伝子発現では, IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  の相乗効果は認められなかった.



**Figure 2** Effects of IL-1 $\beta$  and/or TNF- $\alpha$  on CSF gene expression. Human synovial fibroblasts were treated or not (■) with 0.1 ng/ml IL-1 $\beta$  (▲), 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (●), or 0.1 ng/ml IL-1 $\beta$  + 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (◆) for 2, 4, or 8 h following which the gene expression of GM-CSF (a), M-CSF (b), or G-CSF (c) was examined using real-time PCR. Fold changes were calculated using the  $\Delta\Delta$ CT method. Mean  $\pm$  SD (n = 3). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 compared with the untreated control cells.

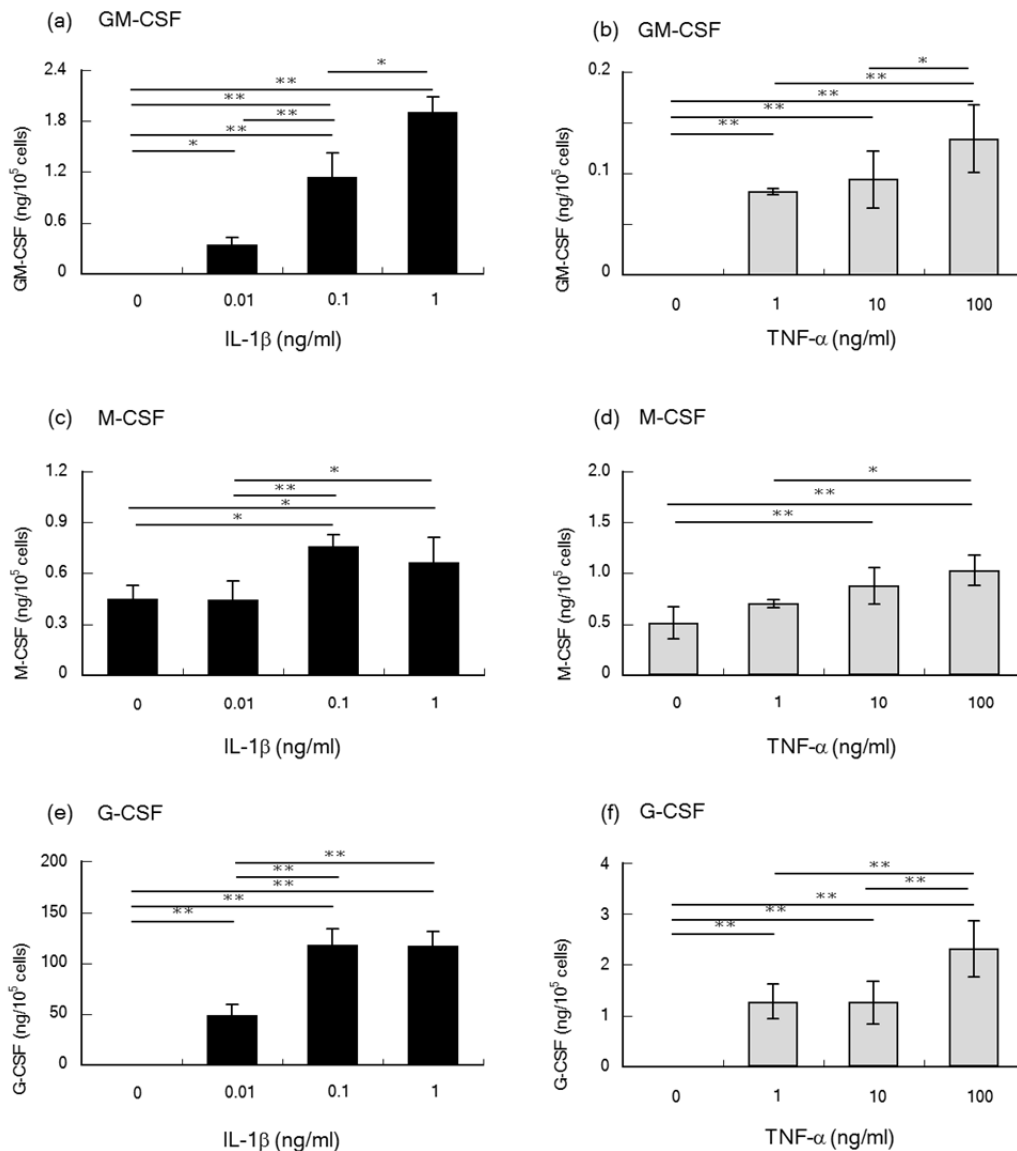
### 3. CSF タンパク質産生量

GM-CSF, M-CSF および G-CSF の経時的なタンパク質産生量を測定した。タンパク質産生量は刺激後, 8, 24, 48 時間の培養上清を用いて測定した。経時的タンパク質産生量を Figure 3 に示す。GM-CSF および G-CSF タンパク質産生量は刺激後, 経過時間に依存して産生量の上昇を認めた (Figure 3 (a), (c)). また, GM-CSF と G-CSF タンパク質産生は共刺激 > IL-1 $\beta$ 刺激 > TNF- $\alpha$ 刺激の順であった (Figure 3 (a), (c)). M-CSF タンパク質産生量は刺激 24 時間において各刺激で同程度の産生量を認め, プラトーであった (Figure 3 (b)).



**Figure 3** Time course of the protein production of CSFs. Human synovial fibroblasts were treated or not (■) with 0.1 ng/ml IL-1 $\beta$ (▲), 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (●), or 0.1 ng/ml IL-1 $\beta$  + 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (◆) for 8, 24, or 48 h following which the protein level of GM-CSF (a), M-CSF (b), and G-CSF (c) in the media was measured using ELISA. Mean  $\pm$  SD (n = 4). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 compared with the untreated control cells.

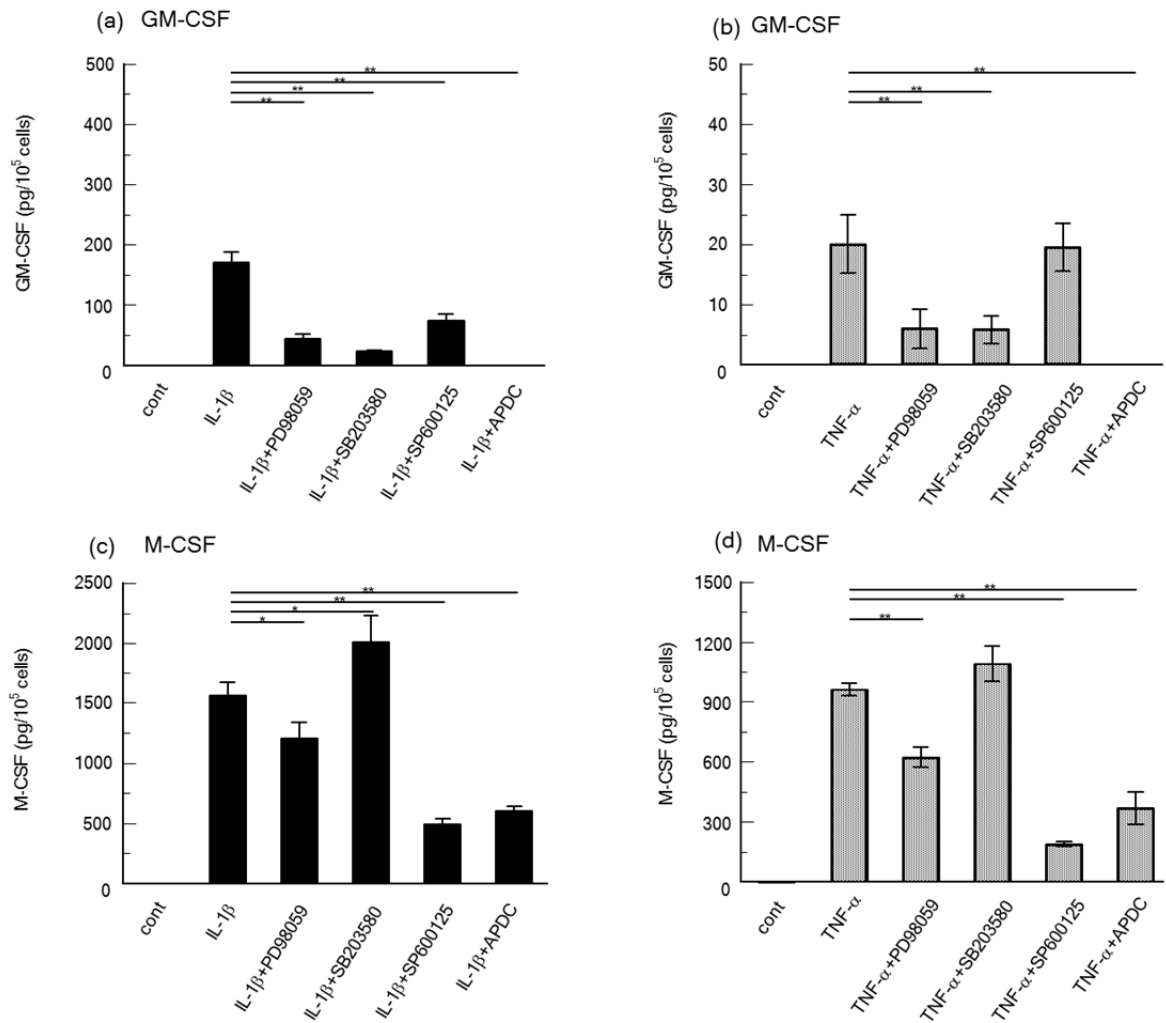
次に, IL- $\beta$ と TNF- $\alpha$ の刺激濃度による CSF 産生量を調べた結果を Figure 4 に示す. GM-CSF, M-CSF および G-CSF タンパク質産生は IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ の刺激濃度依存的な産生量の上昇を認めた. GM-CSF と G-CSF は TNF- $\alpha$ 刺激と比較して IL-1 $\beta$ 刺激による産生量の方が高かった (Figure 4 (a), (b), (e), (f)). M-CSF は無刺激時においても産生が認められた (Figure4 (c), (d)).



**Figure 4** Effects of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  on the protein production of CSFs. Human synovial fibroblasts were treated with IL-1 $\beta$  at concentrations ranging from 0.01 to 1 ng/ml or with TNF- $\alpha$  at concentrations ranging from 1 to 100 ng/ml for 24 h, following which the protein level of GM-CSF ((a) and (b)), M-CSF ((c) and (d)), and G-CSF ((e) and (f)) in the media was measured using ELISA. Mean  $\pm$  SD (n = 4). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01

#### 4. IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ 刺激時の CSF 産生経路

IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ 刺激時の CSF 産生におけるシグナル伝達経路を MAPK 阻害薬および NF $\kappa$ B 阻害薬を用いて検討した (Figure 5). 各阻害薬を 15 分作用させた後, IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ を 3 時間および 8 時間作用させた. GM-CSF は IL-1 $\beta$ 刺激時に PD98059, SB203580, SP600125, APDC 阻害薬による産生量の減少を認めた (Figure 5 (a)). TNF- $\alpha$ 刺激時には PD98059, SB203580, APDC 阻害薬による産生量の減少を認めた (Figure 5 (b)). M-CSF および G-CSF 産生量は刺激後 3 時間では検出限界以下であった. そのため, M-CSF および G-CSF 産生は刺激後 8 時間で検討を行った. M-CSF 産生は刺激後 8 時間で産生を認め, IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$  刺激で PD98059, SP600125, APDC 阻害薬による産生量の減少を認めた (Figure 5 (c), (d)). しかし, G-CSF 産生は刺激後 8 時間においても検出限界量以下であった (data not shown).

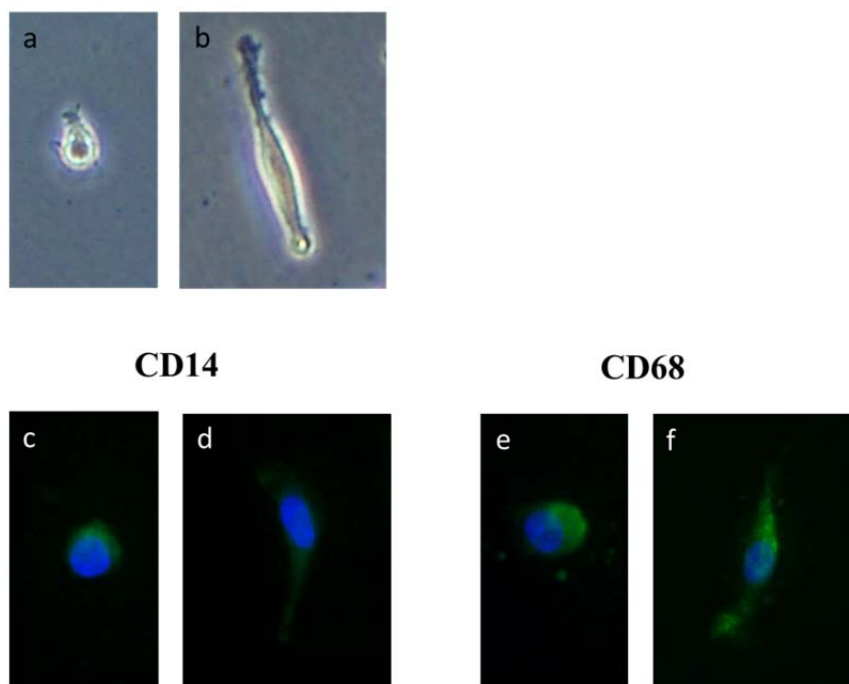


**Figure 5** Effect of MAPK and NFκB inhibitors on IL-1β and TNF-α induced CSF production. Human synovial fibroblasts were pretreated with 40 μM PD98059, 10 μM SB203580, 10 μM SP600125 or 10 μM APDC for 15 min and were then stimulated with 0.1 ng/ml IL-1β for 3 h or 10 ng/ml TNF-α for 8 h. The protein level of GM-CSF ((a) and (b)), M-CSF ((c) and (d)) in the medium were measured by an ELISA. Mean ± SD (n = 4). \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 in comparison of the stimulated and non-treated cells.

## II. 滑膜線維芽細胞と単球の共培養による影響

### 1. 単球の免疫組織化学染色

ヒト末梢血より分離した単球がマクロファージに分化するか確認するため、マクロファージマーカーである CD14 および CD68 による免疫組織化学染色を行った。結果を Figure 6 に示す。単球は培養後、円形状と紡錘形状を呈する 2 種類の細胞形態が認められた (Figure 6 (a), (b)). 両細胞はマクロファージマーカーである CD14 および CD68 に陽性であった (Figure 6 (a-f)).

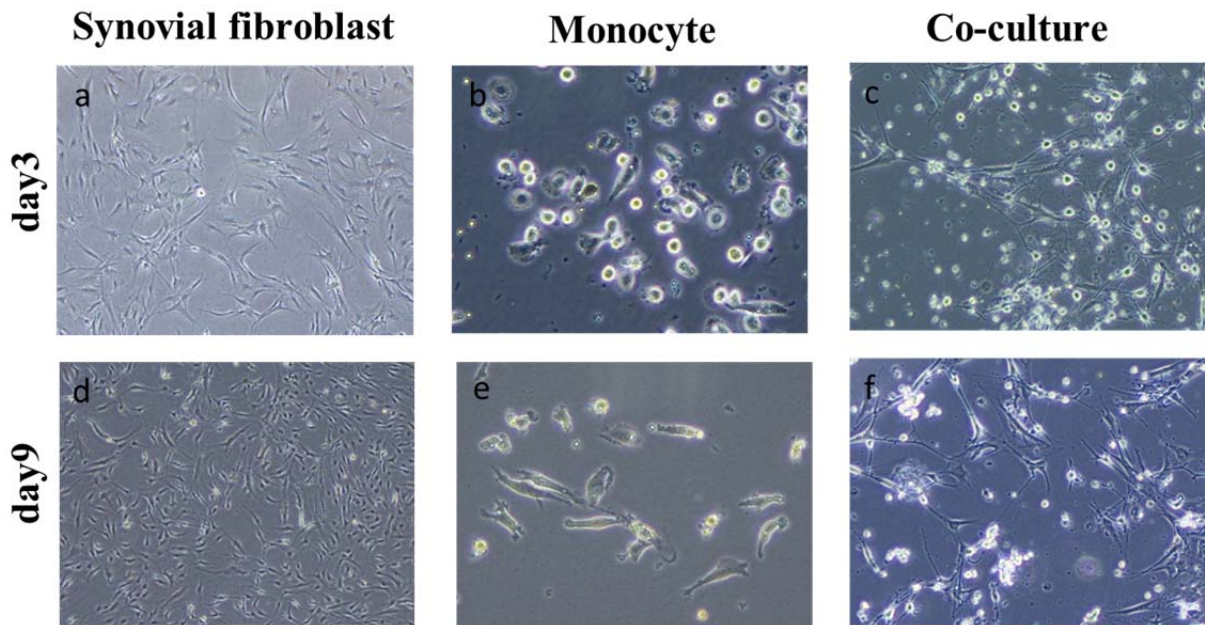


**Figure 6.** Immunofluorescence staining of monocytes with macrophage markers. Phase-contrast microscopic analysis of representative cells showing a “fried egg” morphology (a) or a “spindle-like” morphology (b) after 6 days of monocyte culture. These cells stained positive (green) for the macrophage markers CD14 (“fried-egg”-like cell (c); spindle-like cell (d)) and CD68 (“fried-egg”-like cell (e); spindle-like cell (f)) using immunofluorescence. Blue, nuclear DAPI staining. (Original magnification  $\times 600$ ).

## 2. 線維芽細胞様細胞および単球の共培養

培養 3 日目と 9 日目の位相差顕微鏡像を示す (Figure 7). 本研究に用いた滑膜線維芽細胞は紡錘形を呈し、過去に報告されている免疫組織化学染色を用いた培養ヒト顎関節由来滑膜線維芽細胞と類似していた<sup>17)</sup>. 滑膜線維芽細胞は培養 3 日目, 9 日目において明らかな形態の変化は認められなかった (Figure 7 (a), (d)). 単球は, 播種後 24 時間では単球はプレートに完全に付着しておらず, 浮遊細胞を多く認めた (data not shown). プレートへの付着が認められたのは培養 3 日目以降であった. 培養 3 日目の培地では円形状を呈する細胞が主体であったが, 培養 9 日目では紡錘形を呈する細胞の割合の増加が認められた (Figure 7 (b), (e)). 共培養時の滑膜線維芽細胞は単独培養時と比較して樹状の形態を呈していた. 共培養後 3 日目と 9 日目における単球の形態的な変化は認められなかったが, 単球は培養 3 日目で滑膜線維芽細胞への付着が認められた (Figure 7 (c), (f)).





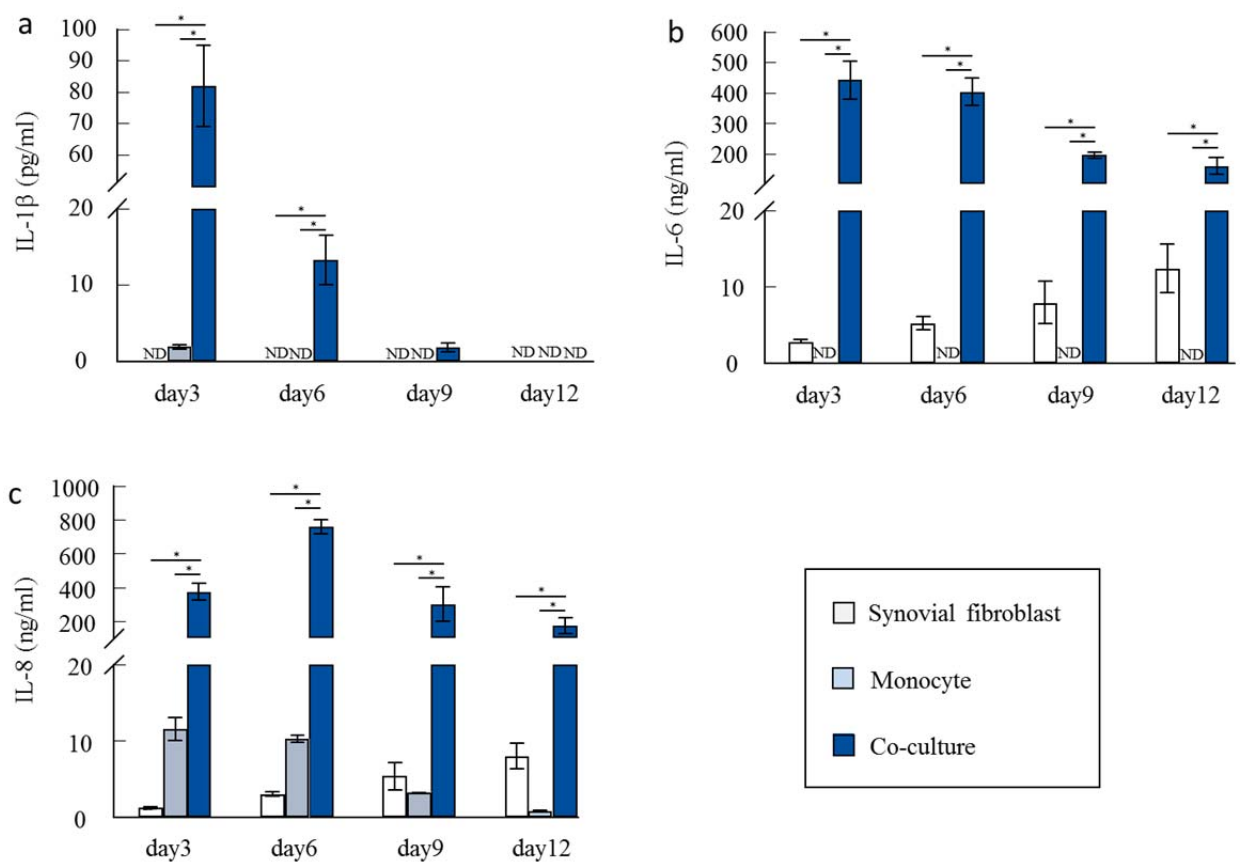
**Figure 7** Phase-contrast micrographs of monocultures and the co-culture of synovial fibroblasts and monocytes.

The morphology of the cells in synovial fibroblast monoculture (a, d ; Original magnification  $\times 100$ ), monocyte monoculture (b, e ; Original magnification  $\times 200$ ) and synovial fibroblast/monocyte co-culture (c, f ; Original magnification  $\times 100$ ) was observed after 3 and 9 days of culture using phase contrast microscopy. Adhesion of monocytes to synovial fibroblasts could be observed (c, f).

### 3. 共培養時における IL-1 $\beta$ , IL-6 および IL-8 タンパク質産生

滑膜線維芽細胞と単球の単独培養時と共培養における炎症性サイトカインの産生量を比較した (Figure 8). 共培養時における IL-1 $\beta$ , IL-6 および IL-8 のタンパク質産生量は単独培養時と比較して高かった. IL-1 $\beta$ は、滑膜線維芽細胞の単独培養では検出されず、単球の単独培養では、培養 3 日目で少量の産生が認められた. 共培養時は単独培養時と比較して培養 3 日目において著しく高い IL-1 $\beta$ 産生量が認められた. その後、6 日目、9 日目にも産生量は減少した. 12 日目では検出することはできなかった (Figure 8 (a)). IL-6 は滑膜線維芽細胞の単独培養時に産生を認め、単球培養時において産生は認められなかった. 共培養

時は滑膜線維芽細胞の単独培養時と比較して高いIL-6産生量が認められた (Figure 8 (b)). IL-8は滑膜線維芽細胞および単球の単独培養時に産生を認めた. 共培養時は滑膜線維芽細胞および単球の単独培養時と比較して高いIL-8産生量が認められた(Figure 8 (c)).



**Figure 8** ELISA assay of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 in the cell cultures. The indicated monocultures and co-culture were cultured for 3 days, following which the medium was replaced and the cultures were incubated for a further 3 days. The supernatants were then collected and particulate matter was removed by centrifugation. Each supernatant was assayed for the presence of cytokines using a specific ELISA. The results are expressed as means  $\pm$  SD (n=4). Statistical significances are indicated; \* $p$  < 0.01.

## 考察

### I. 滑膜線維芽細胞における IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ の影響

IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$ は、多様な生物活性を有する炎症性サイトカインであり、ID や OA-TMJ 患者の顎関節滑液中から検出されることから顎関節疾患への関与が示唆されている<sup>3-8)</sup>。本研究では、顎関節における炎症病態形成メカニズムを解明する一環として、滑膜線維芽細胞に IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ を作用させ、網羅的な遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現解析の結果、遺伝子発現上昇した上位遺伝子中には CCL20 をはじめとする Chemokine superfamily の遺伝子が多く認められた。Chemokine は主に、白血球を組織中へと遊走させるサイトカインで、炎症病態形成に関与すると報告されている<sup>18)</sup>。IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$ によるこれらケモカイン産生上昇については過去に報告されており、顎関節疾患に関与することが示唆されている<sup>8,7)</sup>。発現上昇した遺伝子中、ケモカイン以外の遺伝子中、最も上昇率の高かったのは GM-CSF であった。GM-CSF は CSF の一員であり、その他に M-CSF, G-CSF が存在する。これら CSF はマクロファージや顆粒球の増殖因子として発見され<sup>9)</sup>、その後、多様な作用を持つことが明らかとなった<sup>10)</sup>。ID や OA 患者の関節滑液中にも GM-CSF や M-CSF が検出されると報告されている<sup>19,20)</sup>。そこで、本研究では CSFs について検討を行った。

GM-CSF はマクロファージの増殖因子としての作用以外にも、マクロファージを M1 型マクロファージに分化させることが報告されている<sup>21)</sup>。マクロファージには2つのサブセットが存在し、組織炎症の際に IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$ などを産生し、炎症病態亢進に関与する M1 型マクロファージと、組織修復の際に抗炎症性サイトカインである IL-10などを産生する M2 型マクロファージに分類される<sup>22,23)</sup>。顎関節滑膜組織にはマクロファージ様細胞が存在することから滑膜線維芽様細胞が産生する GM-CSF はマクロファージ様

細胞の分化に影響を与えることが考えられた。そのため、IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$ 刺激により産生された GM-CSF はマクロファージ様細胞に作用し、M1 型マクロファージへと分化させ、M1 型マクロファージの IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$ の産生により、また滑膜線維芽細胞が GM-CSF を産生するといった炎症状態における悪循環形成に関与する可能性がある。

M-CSF はマクロファージを M2 型マクロファージに分化させることが報告されている<sup>21)</sup>一方で、炎症時の組織中では、Chemokine と共に破骨細胞の増殖や成熟にも関与することが報告されている<sup>23, 24)</sup>。本研究では M-CSF は無刺激時においても産生されること、IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ 刺激により M-CSF の産生が上昇することが分かった。また、滑膜線維芽細胞は IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ 刺激により Chemokine を産生することが報告されている<sup>8,7)</sup>。そのため、M-CSF は産生された環境により異なる作用を持つ可能性が考えられた。滑膜組織において炎症時に Chemokine と共に産生された M-CSF は骨破壊に関与し、恒常的に産生された M-CSF はマクロファージ様細胞を M2 型マクロファージへの分化に関与するものと考えられた。

関節疾患における、G-CSF に関する報告は少ないが、マウスへの G-CSF 投与は関節炎を悪化させること、G-CSF 欠損マウスは、関節炎に抵抗性を示すことが報告されており、関節疾患のバイオマーカーとして注目されている<sup>26,27)</sup>。本研究でも、IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$ 刺激により、滑膜線維芽細胞は G-CSF を産生したことから、顎関節疾患においてもバイオマーカーになりうる可能性がある。

CSF の発現および産生については、GM-CSF や G-CSF は無刺激時においては産生されず、IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$  刺激により産生が認められた。GM-CSF および G-CSF の遺伝子発現量、タンパク質産生量は共刺激、IL-1 $\beta$  刺激、TNF- $\alpha$ 刺激、の順で、いずれも経時的な発現および産生上昇を認めた。また、共刺激時においては IL-1 $\beta$ と TNF- $\alpha$ の相乗的な効果が認められた。一方、M-CSF にはこのような相乗的な効果や持続的な発現

や産生は認められなかった。本研究では、持続的な発現や相乗効果のメカニズムについての検討はおこなっていないが、顎関節滑液中に IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$ が共存する場合、相乗効果により GM-CSF や G-CSF は過剰に産生されるため、単独で存在した時と比較して炎症病態がより亢進するものと考えられた。

炎症性サイトカインの発現において MAPK 経路および NF $\kappa$ B 経路は、中心的な役割を果たす。そこで、滑膜線維芽細胞の CSF 発現にも MAPK および NF $\kappa$ B 経路を介しているのか検討するため、MAPK および NF $\kappa$ B 阻害薬を用いた実験を行った。IL-1 $\beta$ または TNF- $\alpha$ 刺激による GM-CSF 産生経路には、ERK, p38MAPK および NF $\kappa$ B を介し、IL-1 $\beta$ 刺激時では JNK 伝達経路も関連していると示唆された。M-CSF の産生経路には、IL-1 $\beta$ 刺激, TNF- $\alpha$ 刺激ともに、ERK, JNK および NF $\kappa$ B 活性化を介していることが示唆された。一方、p38MAPK 阻害薬作用時では GM-CSF が産生減少したのに対し、M-CSF では産生の上昇が認められた。p38MAPK は RNA 結合タンパク質をリン酸化し、mRNA の安定性を亢進すると報告されており<sup>28,29)</sup>、GM-CSF と M-CSF 産生の違いには、p38MAPK による mRNA の安定化が関与しているのではないかと示唆された。また、無刺激時における M-CSF の産生はほとんど産生が認められず、Figure4 (c), (d) と異なる結果となった。その原因は、それぞれの実験に使用した滑膜線維芽細胞のドナーが異なるためと考えられ、滑膜線維芽細胞が恒常的に産生する M-CSF の産生量には個人差があるのではないかと示唆された。G-CSF は阻害薬作用後 8 時間においても検出限界量以下であった。G-CSF は刺激後 24 時間以降で急激に産生の上昇が認められることから、G-CSF の産生には IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$ 刺激の直接的な影響ではなく、2 次的なサイトカインの影響により産生されることが示唆された。そのため、G-CSF のシグナル伝達経路の検討には、刺激濃度や刺激時間のさらなる検討が必要と考えられた。

## II. 滑膜線維芽細胞と単球の共培養による影響

顎関節滑膜組織の表層は、滑膜線維芽細胞とマクロファージ様細胞が存在する。マクロファージ様細胞は骨髄中の単球由来と報告されており、CD68 陽性所見を示し、滑膜炎時に細胞の増加が認められる<sup>12,13)</sup>。また、マクロファージ様細胞と滑膜線維芽細胞のクロストークは関節リウマチの発症に関与していると報告されており<sup>14,15)</sup>、両細胞のクロストークによる病態形成の研究は顎関節の炎症病態形成メカニズムを解明する上でも重要である。そこで、本研究では滑膜線維芽細胞とヒト末梢血から分離した単球を共培養し、両細胞のクロストークによる炎症病態形成メカニズムについて検討を行った。

本研究で用いた単球は、円形状と紡錘形状を呈する2種類の細胞形態が認められた。マクロファージはM1型とM2型に大別され、それぞれの細胞形態はM1型が円形状、M2型は紡錘形状を呈すると報告されている<sup>23)</sup>。また、両細胞はいずれも、滑膜組織に存在するマクロファージ様細胞のマーカーとして報告されているCD14、CD68に陽性であった<sup>13)</sup>。そのため、本研究で用いた単球は、滑膜組織に存在するマクロファージ様細胞と類似した性質を保持していると考えられた。

次に、単球と滑膜線維芽細胞によるクロストークによる影響を検討するために、単球と滑膜線維芽細胞を共培養し、産生される炎症性サイトカインを測定した。本研究では顎関節滑液中に検出されると報告されているIL-1 $\beta$ 、IL-6およびIL-8産生量について検討を行った<sup>4)</sup>。IL-1 $\beta$ の産生量は、単独培養時ではほとんど検出できなかったのに対し、共培養の培養上清中では高い値を示した。同様に、IL-6やIL-8は単独培養時においてもわずかではあるが低い産生量を示し、共培養時で産生量の上昇を認めた。そのため、滑膜線維芽細胞と単球の共培養は何らかの影響により炎症性サイトカインの産生を引き起こすと考えられた。IL-1 $\beta$ は、不活性型である前駆体（pro-IL-1 $\beta$ ,31kDa）として合成された後、インフラマソームが活性

化されることで、カスパーゼ1が活性化し、成熟IL-1 $\beta$ として細胞外へ産生される<sup>30,31)</sup>。インフラマソームは転写促進とは別に、病原菌やウイルス、尿酸等の刺激によって活性化すると報告されている<sup>30)</sup>。当教室での以前の研究では、IL-1 $\beta$ 、IL-17およびTNF- $\alpha$ 刺激により滑膜線維芽細胞のIL-1 $\beta$ の遺伝子発現の上昇は認められたが、培養上清中にIL-1 $\beta$ タンパク質は検出することができなかった<sup>8,32)</sup>。本研究では、滑膜線維芽細胞と単球の共培養により、IL-1 $\beta$ タンパク質を検出することができた。IL-1 $\beta$ を放出した細胞は滑膜線維芽細胞と単球のどちらかまたは両方なのかは不明であるが、滑膜線維芽細胞と単球のクロストークによりインフラマソームが活性化された可能性があり、本研究で用いた実験モデルは顎関節疾患におけるIL-1 $\beta$ 産生を介した炎症病態を検討する上で有用と考えられた。

IL-6やIL-8も同様に、共培養時において産生量が高かった。IL-6はOA-TMJ患者滑液中に検出されることや、破骨細胞形成に関与することから炎症病態形成に重要な役割を担っていると報告されている<sup>33)</sup>。滑膜線維芽細胞は恒常的にIL-6を産生するが、過剰な産生は破骨細胞形成および骨吸収を引き起こす可能性が示唆される。本研究では滑膜線維芽細胞の単独培養時と比較して、共培養時に高い産生が認められたことから、滑膜線維芽細胞と単球のクロストークによってIL-6の過剰な産生を引き起こすことが示唆された。また、IL-8は滑膜線維芽細胞や単球などから産生され、主として滑膜組織への好中球の遊走に関与することが報告されている<sup>18)</sup>。IL-8産生量においても、共培養時に滑膜線維芽細胞と単球の単独培養時と比較して、高い産生が認められた。IL-8は代表的なケモカインであり、血管新生も誘導すると報告されている<sup>17)</sup>。これらの事から、単球と滑膜線維芽細胞との細胞接触は顎関節の炎症病態を亢進させることが示唆され、共培養することにより、顎関節における炎症環境をより反映すると思われた。

本研究において、滑膜線維芽細胞はIL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ 刺激によりCSFを産生することを明らかにした。ま

た、滑膜線維芽細胞と単球の共培養により、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ , IL-6 および IL-8 が産生されることを明らかにした. ID や OA-TMJ 滑膜組織において, IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  により, 滑膜線維芽細胞はケモカインや CSF を産生する. CSF は炎症時に遊走されるマクロファージなどの炎症性細胞に作用し, 破骨細胞の増殖や, M1 型マクロファージへの分化を介して炎症病態を亢進することが示唆される. また, 炎症時に滑膜組織に遊走されてきた単球は, 滑膜線維芽細胞との細胞間接触や液性因子を介した相互作用により, IL-1 $\beta$ , IL-6 および IL-8 の産生を介し, 炎症状態の増幅がなされることが示唆された.

#### 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, 滑膜線維芽細胞に IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  を作用させ, 網羅的な遺伝子発現解析を行った. また, 滑膜線維芽細胞と血漿由来単球との共培養を行い, 以下の結果を得た.

- 1) DNA マイクロアレイ解析の結果, 発現上昇した上位遺伝子中に CSF が認められた.
- 2) GM-CSF, G-CSF 遺伝子発現の上昇は, 共刺激 > IL-1 $\beta$  > TNF- $\alpha$  の順であった. 一方, M-CSF 遺伝子発現は刺激後 4 時間がピークであった.
- 3) GM-CSF, G-CSF 遺伝子発現の上昇は共刺激時において IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  の相乗的な効果が認められた. 一方, M-CSF 遺伝子発現には共刺激時において IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  の相乗的な効果は認められなかった.
- 4) CSF タンパク質産生は IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  の刺激濃度依存的に産生量の上昇を認めた. M-CSF は無刺激時においてもタンパク質産生を認めた.
- 5) IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  刺激滑膜線維芽細胞の GM-CSF 産生は, PD98059 (ERK1/2 inhibitor), SB20358 (p38 inhibitor), APDC (NF $\kappa$ B inhibitor) により減少した. また, IL-1 $\beta$  刺激時では, SP600125 (JNK1/2 inhibitor) によ



る GM-CSF の産生量の減少も認められた。

6) IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ 刺激滑膜線維芽細胞の M-CSF 産生は, PD98059 (ERK1/2 inhibitor), SP600125 (JNK1/2 inhibitor), APDC (NF $\kappa$ B inhibitor)により減少した。また, IL-1 $\beta$ 刺激時では,SB20358 (p38 inhibitor), による M-CSF の産生量の上昇が認められた。

7) 末梢血から分離した単球は, 円形状および紡錘形状を呈する 2 種類の細胞形態が認められた。両細胞は免疫組織化学染色にて CD14 および CD68 陽性所見を認めた。

8) IL-1 $\beta$ , IL-6 および IL-8 産生は滑膜線維芽細胞と単球の共培養では, 単独培養に比べて, 著しい産生上昇を認めた。

以上の結果より, IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$ によって滑膜線維芽細胞は GM-CSF 等を産生することによって, 滑膜組織中のマクロファージの成熟化を誘導すること, 滑膜線維芽細胞と単球の接触は IL-1 $\beta$ 等の炎症性サイトカイン産生を上昇させることが示唆された。

## 参考文献

1. Kondoh T, Dolwick MF, Hamada Y, Seto K : Visually guided irrigation for patients with symptomatic internal derangement of the temporomandibular joint: a preliminary report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 95: 544-551, 2003.
2. Kardel R, Ulfgren AK, Reinholt F, Hamada Y, Holmlund A: Inflammatory cell and cytokine patterns in patients with chronic polyarthritis and temporomandibular joint involvement. *Acta Odontol Scand*, 64: 221-226, 2006.
3. Hamada Y, Kondoh T, Holmlund AB, Yamamoto M, Horie A, Saito T, Seto K, Sekiya H: Inflammatory cytokines correlated with clinical outcome of temporomandibular joint irrigation in patients with chronic closed lock. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 102: 596-601, 2006.
4. Kaneyama K, Segami N, Nishimura M, Suzuki T, Sato J: Importance of proinflammatory cytokines in synovial fluid from 121 joints with temporomandibular disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 40 : 418-423, 2002.
5. Kay J, Calabrese L: The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 43: (Suppl 3): iii2-iii9, 2004.
6. Field M: Tumour necrosis factor polymorphisms in rheumatic diseases. *QJM*, 94: 237-246, 2001.
7. Ogura N, Akutsu M, Tobe M, Sakamaki H, Abiko Y, Kondoh T: Microarray analysis of IL-1beta-stimulated chemokine genes in synovial fibroblasts from human TMJ. *J Oral Pathol Med*,

36: 223-228, 2007.

8. Akutsu M, Ogura N, Ito K, Kawashima M, Kishida T, Kondoh T: Effects of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  on macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$  production in synovial fibroblast-like cells from human temporomandibular joints. *J Oral Pathol Med*, 42: 491-498, 2013.

9. Whetton AD, Dexter TM: Myeloid haemopoietic growth factors. *Biochim Biophys Acta*, 989: 111-132, 1989.

10. Hamilton JA: Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 8 : 533-544, 2008.

11. Dijkgraaf LC, de Bont LG, Boering G, Liem RS: Structure of the normal synovial membrane of the temporomandibular joint: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*, 54: 332-338, 1996.

12. Kardel R, Ulfgren AK, Reinholt FP, Holmlund A: Inflammatory cell and cytokine patterns in patients with painful clicking and osteoarthritis in the temporomandibular joint. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 32: 390-396, 2003.

13. Manferdini C, Paoletta F, Gabusi E, Silvestri Y, Gambari L, Cattini L, Filardo G, Fleury S, Lisignoli G: From osteoarthritic synovium to synovial-derived cells characterization: synovial macrophages are key effector cells. *Arthritis Res Ther*. Epub ahead of print 4 April 2016. DOI: 10.1186/s13075-016-0983-4.

14. Blasioli DJ, Matthews GL, Kaplan DL: The degradation of chondrogenic pellets using cocultures of synovial fibroblasts and U937 cells. *Biomaterials*, 35: 1185-1191, doi:

10.1016/j.biomaterials.2013.10.050. Epub 2013 Nov 10.2013.

15. Chen V, Croft D, Purkis P, Kramer IM: Co-culture of synovial fibroblasts and differentiated U937 cells is sufficient for high interleukin-6 but not interleukin-1beta or tumour necrosis factor-alpha release. *Br J Rheumatol*, 37; 2:148-56. 1998.

16. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402-408, 2001.

17. Tobe M, Ogura N, Abiko Y, Nagura H: Interleukin-1beta stimulates interleukin-8 production and gene expression in synovial cells from human temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg*, 60: 741-757, 2002.

18. Gale LM, McColl SR: Chemokines: extracellular messengers for all occasions?. *Bioessays*, 21(1):17-28.1999.

19. Kim YK, Kim SG, Kim BS, Lee JY, Yun PY, Bae JH, Oh JS, Ahn JM, Kim JS, Lee SY: Analysis of the cytokine profiles of the synovial fluid in a normal temporomandibular joint: preliminary study. *J Craniomaxillofac Surg*, 40: e337-e341, 2012.

20. Darrieutort-Laffite C, Boutet MA, Chatelais M, Brion R, Blanchard F, Heymann D, Golf BL : IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  promote monocyte viability through the induction of GM-CSF expression by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Mediators Inflamm*. Epub ahead of print 17 Nov 2014.  
DOI: 10.1155/2014/241840.

21. Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD: Granulocyte-macrophage

- colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol*, 178: 5245-5252, 2007.
22. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R, Ottenhoff TH : Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 4560-4565, 2004.
23. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH: Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol*, 79(2):285-293. 2006.
24. Hamilton JA, Tak PP: The dynamics of macrophage lineage populations in inflammatory and autoimmune diseases. *Arthritis Rheum*, 60: 1210-1221, 2009.
25. Takano H, Ariyoshi W, Kanno T, Fukuhara E, Ichimiya H, Matayoshi T, Goto T, Takahashi T: Induction of osteoclast-like cells derived from the synovial lavage fluids of patients with temporomandibular joint disorders. *Osteoarthritis Cartilage*, 15:291-9, 2007
26. Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ, Hamilton JA: The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. *J Leukoc Biol*, 68: 144-150, 2000.

27. Lawlor KE, Campbell IK, Metcalf D, O'Donnell K, van Nieuwenhuijze A, Roberts AW, Wicks IP: Critical role for granulocyte colony-stimulating factor in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 11398-11403, 2004.
28. Tebo J, Der S, Frevel M, Khabar KS, Williams BR, Hamilton JA: Heterogeneity in control of mRNA stability by AU-rich elements. *J Biol Chem*, 278: 12085-12093, 2003.
29. Kawai T, Lal A, Yang X, Galban S, Mazan-Mamczarz K, Gorospe M.: Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins TIA-1 and HuR, *Mol Cell Biol*. 26(8):3295-307.2006
30. Lopez-Castejon G, Brough D: Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011 Aug;22(4):189-95. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.10.001. Epub 2011 Oct 22.
31. Arango Duque G, Descoteaux A: Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*. 7;5:491. doi: 10.3389/fimmu.2014.00491. eCollection 2014.
32. Hattori T, Ogura N, Akutsu M, Kawashima M, Watanabe S, Ito K, Kondoh T: Gene Expression Profiling of IL-17A-Treated Synovial Fibroblasts from the Human Temporomandibular Joint. *Mediators Inflamm*. Epub ahead of print 29 Dec 2015. DOI: 10.1155/2015/436067.
33. Ogura N, Tobe M, Sakamaki H, Kujiraoka H, Akiba M, Abiko Y, Nagura H: Interleukin-1 beta induces interleukin-6 mRNA expression and protein production in synovial cells from human temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med*, 31: 353-360, 2002.

A Study of Inflammatory relative factors using Synovial Fibroblasts from the human Temporomandibular Joint

-DNA microarray analysis and co-culture of both synovial fibroblasts and monocyte-

WATANABE Suguru

Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo

Department of Maxillofacial Surgery,

### **Abstract**

Synovitis, an inflammatory disorder of the synovial membrane, frequently accompanies internal derangement (ID) and/or osteoarthritis (OA) in the temporomandibular joint (TMJ) and has been suggested to be a key feature of intracapsular pathological conditions of the TMJ. The aim of this study was to investigate putative factors associated with TMJ inflammation.

First, we investigated IL-1 $\beta$  and/or TNF- $\alpha$ -responsive genes of synovial fibroblasts from patients with TMD using microarray analysis, because IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are detected in TMJ synovial fluids from patients with ID and/or OA. Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) was one of the genes whose expression was strongly up-regulated in synovial fibroblasts by IL-1 $\beta$  and/or TNF- $\alpha$ . The gene expressions of macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) were also up-regulated by IL-1 $\beta$  and/or TNF- $\alpha$ . Gene expression and protein production of GM-CSF and G-CSF, but not of M-CSF, were synergistically increased in synovial fibroblasts stimulated with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . M-CSF protein was only detected in the conditioned medium of the non-stimulated control in which GM-CSF and G-CSF were not detected. In addition, MAPK and NF $\kappa$ B inhibitors inhibited IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  stimulated production of GM-CSF and

M-CSF.

The synovial membrane is composed of fibroblast-like cells (synovial fibroblasts) and macrophage-like cells. Synovial fibroblasts and monocytes/macrophages are believed to interact and to play a critical role in the development of synovial inflammation. Second, we investigated the protein production of pro-inflammatory cytokines in co-culture of synovial fibroblasts isolated from the TMJ and monocytes isolated from peripheral blood. Monocytes that had attached to the plastic surface after culture for 3 days in RPMI containing 10% FBS, exhibited two types of morphologies: “fried egg” and “spindle-like”. Both types of monocytes stained positive for the macrophage-specific markers CD14 and CD68. Synovial fibroblasts were co-cultured with these monocytes for 12 days. Synovial fibroblasts or monocytes were also cultured alone for 12 days. The protein production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 was greatly increased in the co-culture of synovial fibroblasts and monocytes compared to each monoculture.

These results suggest that expression of CSFs in synovial fibroblasts is one of importance factor associated with inflammatory progression of the intracapsular pathological conditions of the TMJ, and interaction between monocytes/macrophages and synovial fibroblasts is may contribute to promote the inflammatory condition in the TMJ.