

**RANKL は破骨細胞前駆細胞の IL-18 binding
protein 発現を誘導する**

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

高 橋 由 美

(指導：前野 正夫 教授，川戸 貴行 教授，田中 秀樹 助教)

目 次

概 要	2
緒 言	5
材料および方法	7
成 績	11
考 察	19
結 論	21
謝 辞	22
引用文献	23
基幹論文	27

Takahashi et al. J Hard Tissue Biol 25: 173-180, 2016

概 要

炎症性骨吸収は、歯周炎、関節リウマチおよび変形性関節症などの炎症に伴う骨疾患の主症状であり、炎症下にある組織では、破骨細胞の分化と活性化に関与する様々なサイトカインが産生される。receptor activator of NF- κ B (RANK) ligand (RANKL) は、破骨細胞の分化と成熟に必須なサイトカインであり、RANKL が破骨細胞前駆細胞膜の RANK に結合すると RANK/RANKL のシグナルが細胞内に伝達され、破骨細胞への分化が強く誘導される。また、tumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-1、IL-6 および IL-17 などの炎症性サイトカインは、滑膜線維芽細胞、T リンパ球および骨芽細胞の RANKL 発現を促進して、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を誘導する。一方、IL-6 および IL-17 が破骨細胞前駆細胞に直接作用すると、破骨細胞への分化が抑制されることが知られている。IL-18 もまた、破骨細胞分化に対して特異な作用を有するサイトカインである。骨芽細胞と脾臓細胞の共培養による破骨細胞分化誘導においては、IL-18 は T 細胞による granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 発現を促進して破骨細胞分化を抑制する。一方、関節リウマチにおいては、IL-18 は組織破壊を促進し、関節リウマチ患部の滑膜に由来する T 細胞の RANKL 産生を増加させ、破骨細胞分化を誘導する。

IL-18 の標的細胞への刺激は、IL-18 receptor α chain (IL-18R α) と IL-18 receptor β chain (IL-18R β) で構成される IL-18 受容体を介して細胞内に伝達される。一方、IL-18 binding protein (IL-18BP) は、おとり受容体として IL-18 と IL-18 受容体との結合を阻害し、IL-18 の作用を抑制する。IL-18 と IL-18BP の均衡の破綻は、敗血症、クローン病および関節リウマチなどの疾患の発症にも関与する。これまでに、単球およびマクロファージが IL-18BP を産生することが明らかにされているが、炎症性骨吸収において認められる RANKL 誘導性の破骨細胞分化における破骨細胞前駆細胞と T 細胞との細胞間相互作用に対する IL-18BP の役割は検討されていない。著者は、RANKL 誘導性の破骨細胞分化過程においても、IL-18BP が IL-18 を介した破骨細胞前駆細胞と T 細胞との細胞間相互作用を抑制

するのではないかと考えた。

そこで、本研究では、破骨細胞前駆細胞としてマウス単球／マクロファージ由来の RAW264.7 細胞を用いて、破骨細胞様細胞への分化、IL-18BP、IL-18、IL-18R α および IL-18R β 発現に及ぼす RANKL の影響を調べた。さらに、RANKL の刺激を受けた RAW264.7 細胞の培養上清を含む conditioned medium が、マウス脾臓由来の CD4⁺T 細胞の IL-18 誘導性 GM-CSF 発現に及ぼす影響についても検討した。その結果、RANKL は RAW264.7 細胞の破骨細胞様細胞への分化を促進させるとともに IL-18BP 発現を増加させ、IL-18 発現を低下させた。一方、RANKL は IL-18R β 発現には影響を与えず、IL-18R α 発現は RANKL による刺激の有無に関わらず検出されなかった。これらの結果から、RANKL は、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を促進させるとともに、IL-18BP 発現の増加と IL-18 発現の抑制を誘導すると考えられた。また、IL-18 受容体を構成する IL-18R α を発現しない RAW264.7 細胞には、IL-18 が直接作用できない可能性が示唆された。

次に、RAW264.7 細胞が合成・分泌する IL-18BP に着目し、IL-18BP 発現に及ぼす RANKL の影響を調べた。その結果、RANKL は RAW264.7 細胞が培養上清中に分泌する IL-18BP を増加させた。そこで、RANKL で刺激された RAW264.7 細胞が培養上清中に分泌する IL-18BP を含む conditioned medium が、CD4⁺T 細胞の IL-18 誘導性 GM-CSF 発現増加に及ぼす影響を調べた。その結果、RANKL の刺激を受けた RAW264.7 細胞由来の conditioned medium は、CD4⁺T 細胞の IL-18 誘導性 GM-CSF 発現増加を完全にブロックした。この結果から、RANKL の刺激を受けた破骨細胞前駆細胞が破骨細胞に分化する過程で産生される IL-18BP は、おとり受容体として CD4⁺T 細胞上の IL-18 受容体と IL-18 との結合を阻害する可能性が示唆された。

結論として、RANKL は、破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞の破骨細胞様細胞への分化と IL-18BP 産生を促進して CD4⁺T 細胞の IL-18 誘導性 GM-CSF 発現増加をブロックし、IL-18 による破骨細胞分化抑制作用を減弱化させる可能性が示唆された。

本論文は、Journal of Hard Tissue Biology (25: 173-180, 2016) に掲載された論文 (Takahashi et al. (2016) RANKL induces IL-18 binding protein expression in RAW264.7 cells.) を基幹論文とし、これに RANKL が RAW264.7 細胞の IL-18R β 発現に及ぼす影響を調べた結果を加えて総括したものである。

緒 言

サイトカインは、破骨細胞の分化過程で重要な役割を担っている¹⁾。炎症性骨吸収は、歯周炎、関節リウマチおよび変形性関節症などの炎症に伴う骨疾患の主症状であり、炎症下にある組織では、破骨細胞の分化と活性化に参与する様々なサイトカインが産生される²⁾。RANKLは、破骨細胞の分化と成熟に必要なサイトカインであり^{1,3)}、膜型または可溶型のRANKLが破骨細胞前駆細胞膜のRANKに結合するとRANK/RANKLのシグナルが細胞内に伝達され、破骨細胞への分化が強く誘導される^{1,3,4)}。また、TNF- α 、IL-1、IL-6およびIL-17などの炎症性サイトカインは、滑膜線維芽細胞、T細胞および骨芽細胞によるRANKL発現を増加させ、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^{2,5,6)}。一方、破骨細胞前駆細胞にIL-6やIL-17が直接作用すると、破骨細胞への分化が抑制される。IL-6は破骨細胞前駆細胞内におけるRANK/RANKLのシグナルを阻害し、破骨細胞への分化を抑制する⁷⁾。IL-17についても破骨細胞前駆細胞への直接作用と骨芽細胞を介した間接作用とでは、破骨細胞分化に及ぼす影響が相反することが報告されている⁸⁻¹⁰⁾。RANKLの存在下で破骨細胞前駆細胞を高濃度のIL-17で刺激すると、破骨細胞への分化が抑制される^{8,9)}。一方、IL-17は、骨芽細胞のRANKLの産生増加とRANKLのおとり受容体であるosteoprotegerinの産生減少を誘導して、破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化を促進する^{8,10)}。

IL-18もまた、破骨細胞分化に対して特異な作用を示すことが報告されている¹¹⁻¹⁶⁾。骨芽細胞と脾臓細胞の共培養による破骨細胞分化誘導において、IL-18はT細胞のGM-CSF発現を増加させて破骨細胞分化を抑制する¹¹⁻¹³⁾。一方、関節リウマチにおいては、IL-18は組織破壊を促進し¹⁴⁾、関節リウマチ患部の滑膜に由来するT細胞のRANKL産生を増加させ、破骨細胞分化を誘導する^{15,16)}。

IL-18の標的細胞への刺激は、IL-18R α とIL-18R β で構成されるIL-18受容体を介して細胞内に伝達される¹⁷⁾。一方、IL-18BPは、IL-18とIL-18受容体の結合を阻害するおとり受容体として分泌される¹⁸⁾。IL-18とIL-18BPの均衡の破綻

は、敗血症、クローン病および関節リウマチなどの疾患の発症に関与する^{17,19)}。これまでに、単球やマクロファージが IL-18BP を産生することが報告されている^{20,21)}。しかし、炎症性骨吸収において認められる RANKL 誘導性の破骨細胞分化における破骨細胞前駆細胞と T 細胞との細胞間相互作用に対する IL-18BP の役割は検討されていない。

そこで、本研究では、破骨細胞前駆細胞としてマウス単球／マクロファージ由来の RAW264.7 細胞²²⁾ を用いて、破骨細胞様細胞への分化、IL-18BP, IL-18, IL-18R α および IL-18R β 発現に及ぼす RANKL の影響を調べた。また、RANKL の刺激を受けた RAW264.7 細胞の培養上清を含む conditioned medium が、マウス脾臓由来の CD4⁺T 細胞の IL-18 誘導性 GM-CSF 発現増加に及ぼす影響についても併せて検討した。

材料および方法

1. 細胞培養と TRAP 染色

RAW264.7細胞の培養は、10%ウシ胎児血清 (FBS; HyClone Laboratories) と1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (Sigma-Aldrich) を含む α -minimal essential medium (α -MEM; 和光純薬工業) を培養液として用いて、37°C, 5% CO₂ 存在下で行った。培地に添加する RANKL (和光純薬工業) の濃度は、Fujisaki ら²³⁾ と Hotokezaka ら²⁴⁾ の報告を基に 0 または 50 ng/mL とした。破骨細胞様細胞の存在は、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining kit (コスモバイオ) を用いて細胞を染色して調べた。

2. Conditioned medium の調整

50 ng/mL の RANKL を添加あるいは非添加の培地で RAW264.7 細胞を 3 日間培養した。RANKL を含まない培地に交換してさらに 24 時間培養後、培養上清を回収した。これに 10% FBS と 1% ペニシリン-ストレプトマイシン, 50 mM 2-mercaptoethanol (β -ME; Sigma-Aldrich), 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulphonic acid (HEPES; Sigma-Aldrich) を添加した roswell park memorial institute 1640 medium (RPMI 1640; Gibco BRL) を加え、培養上清の割合を 30%としたものを conditioned medium とした。

3. CD4⁺ T 細胞の分離と培養

C57BL/6J マウスの脾臓由来の細胞から、CD4 抗体共役磁性ビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて CD4⁺ T 細胞を単離後、10 μ g/mL 抗 CD3 モノクローナル抗体 (BioLegend) でコーティングした培養プレートに播種するとともに 2 μ g/mL 抗 CD28 モノクローナル抗体 (BioLegend) で刺激した後、10% FBS, 1%ペニシリン-ストレプトマイシン, 50 mM β -ME, 10 mM HEPES および 50 U/mL IL-2 (R&D System) を含む RPMI 1640 で分化培養した。CD4⁺ T 細胞の分離は、日本大学歯学部動物実験委員会の承認のもとで実施した (承認番号: AP11D001)。

4. Conditioned medium 存在下での CD4⁺ T 細胞への IL-18 刺激

RAW264.7 細胞の培養上清を含む conditioned medium に 0, 1 または 10 ng/mL の IL-18 (医学生物学研究所) を加えた培地で CD4⁺ T 細胞を 24 時間培養した。培養後, CD4⁺ T 細胞による GM-CSF 産生を調べるために培養上清を回収した。

5. Real-time PCR

RAW264.7 細胞から NucleoSpin RNA (Takara Bio) を用いて全 RNA を抽出した。RNA 濃度は, NanoDrop 1000 (ND-1000; Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。RNA PCR kit (Takara Bio) で mRNA から complementary DNA (cDNA) を作成し, SYBR Green I を用いたインターカレーター法で real-time PCR を行った。Table 1 に使用した上・下流のプライマー配列を示す。遺伝子の増幅は Smart Cycler (Cepheid) を用い, SYBR Premix *Ex Taq* (Takara Bio) を cDNA に加え, 95°C で 3 秒間の denaturation, 60°C で 20 秒間の annealing/extension を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。結果の解析は Smart Cycler Software version 2 (Cepheid) を用いて行った。あらかじめ作成した検量線をもとに遺伝子の増幅量を求め, グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) の増幅量で補正した値を mRNA 発現量とした。

6. SDS-PAGE および Western blotting

材料および方法の 2. に記載した条件で回収した RAW264.7 細胞の培養上清を PD-10 column (GE Healthcare Bio-Science) を用いて透析後, 凍結乾燥した。タンパク量にして 20 µg を含む凍結乾燥した試料を 1 % SDS (和光純薬工業), 2 M 尿素 (和光純薬工業) を含む溶液に溶解した。さらに, 15 mg/mL dithiothreitol (和光純薬工業) を加えて 95°C で 5 分間加熱処理した後, ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。ゲル内のタンパクを Trans-blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories) を用いて polyvinylidene difluoride 膜 (Merck Millipore) に転写した後, 2% スキムミルク (和光純薬工業)

で非特異的な抗体反応をブロッキングした。Western blotting は1次抗体としてヤギ免疫の抗マウス IL-18BP 抗体 (Acris Antibodies) を、2次抗体としてビオチン標識の免疫動物に対する抗体を用いて行った。さらに、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液を加えた後、ECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare Bio-Sciences) で化学発光反応を行い X 線フィルムに感光させた。

7. ELISA

CD4⁺ T 細胞を、材料および方法の 4. に記載した条件で培養した。培養上清を回収後、GM-CSF 量を ELISA キット (BioLegend) を用いて測定した。

8. 統計学的分析

全ての実験は 3 回繰り返し、結果は平均値と標準偏差で表した。統計処理は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Bonferroni modification of Student's *t*-test を行い、危険率 5% 未満を統計学的な有意差とした。

Table 1

PCR primers used in the experiments

Target	Forward primer	Reverse primer	Genbank acc no.
IL-18BP	5'-GTACCCAGCACTGGATGTGATTTG-3'	5'-AACCATTGCCAGCCAGTAGAG-3'	NM_010531.1
IL-18	5'-AAGACTCTTGCGTCAACTCAAGGA-3'	5'-AGTCGGCCAAAGTTGTCTGATTC-3'	NM_008360.1
IL-18 α	5'-TCTGTGGCAGCAGTGTGTATAGTA-3'	5'-CTGGGTAACGTCTCCACAGCAA-3'	XM_006495734.3
IL-18 β	5'-AACACGGACCATACGGCTGAG-3'	5'-CGACAGAGCAGGACAACTTCAATC-3'	XM_006495712.2
GAPDH	5'-AAATGGTGAAGGTCGGTGTG-3'	5'-TGAAGGGGTCGTTGATGG-3'	XM_001473623

成 績

1. TRAP 染色ならびに IL-18BP, IL-18, IL-18R α および IL-18R β の遺伝子発現に及ぼす RANKL の影響

RAW264.7 細胞を RANKL 添加または非添加 (コントロール) の培地で培養し, TRAP 陽性の破骨細胞様細胞の存在を TRAP 染色で調べた。TRAP 陽性の破骨細胞様細胞は, RANKL を添加した条件で観察され, 培養 3 日目より 5 日目で多核の巨細胞が多く認められた (Fig. 1a and b)。一方, 培養 3 日目および 5 日目のコントロールでは, TRAP 陽性の破骨細胞様細胞は観察されなかった (Fig. 1c and d)。

次に, IL-18BP, IL-18, IL-18R α および IL-18R β の遺伝子発現に及ぼす RANKL の影響を real-time PCR 法で調べた。RANKL を添加した条件での IL-18BP 発現は, 培養 3 日目および 5 日目において, コントロールに比べてそれぞれ 2.242 倍および 2.547 倍有意に増加した (Fig. 2)。一方, RANKL を添加した条件での IL-18 発現は, 培養 3 日目および 5 日目において, コントロールに比べてそれぞれ 0.095 倍および 0.127 倍有意に減少した (Fig. 3)。なお, 培養 3 日目および 5 日目の IL-18R β 発現には, RANKL 添加の顕著な影響は認められず (Fig. 4), IL-18R α 発現は RANKL 添加の有無に関わらず検出されなかった。

2. IL-18BP のタンパク発現に及ぼす RANKL の影響

RAW264.7 細胞を RANKL 添加または非添加 (コントロール) の培地で培養し, 培養上清中の IL-18BP のタンパク発現を Western blotting 法で調べた。RANKL を添加した条件での IL-18BP 発現は, コントロールに比べて顕著に増加した (Fig. 5)。

3. Conditioned medium が CD4⁺ T 細胞の IL-18 誘導性 GM-CSF 発現に及ぼす影響

CD4⁺ T 細胞を IL-18 添加または非添加 (コントロール) の conditioned medium

で培養し、GM-CSF のタンパク発現を ELISA 法で調べた。その結果、RANKL を添加しなかった条件で培養した RAW264.7 細胞由来の conditioned medium では、コントロールに比べて 10 ng/mL の IL-18 添加で CD4⁺ T 細胞の GM-CSF 発現が 2.316 倍有意に増加した。一方、RANKL を添加した条件で培養した RAW264.7 細胞由来の conditioned medium では、CD4⁺ T 細胞の GM-CSF 発現に IL-18 添加の影響は認められなかった (Fig. 6)。

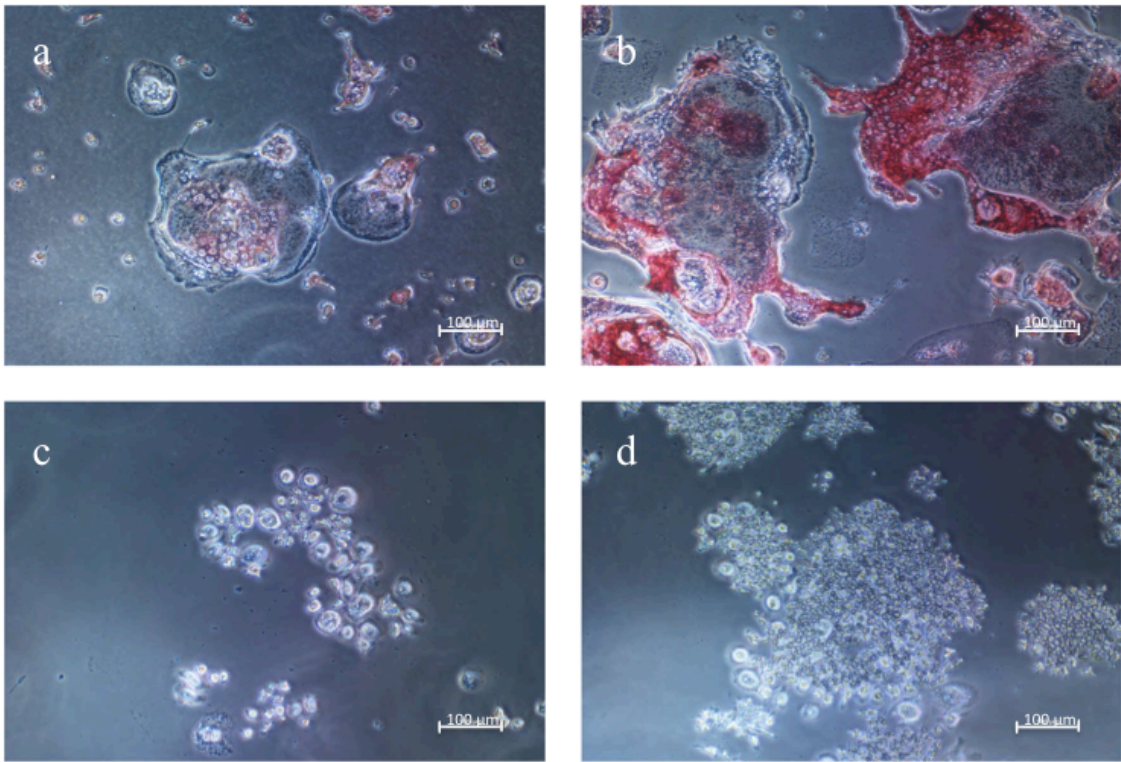


Fig. 1. Effect of RANKL on TRAP staining in RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells cultured with 50 ng/mL soluble RANKL were stained using a TRAP staining kit on days 3 (a) and 5 (b) of culture. RAW264.7 cells cultured without RANKL (control) were also stained on days 3 (c) and 5 (d) of culture.

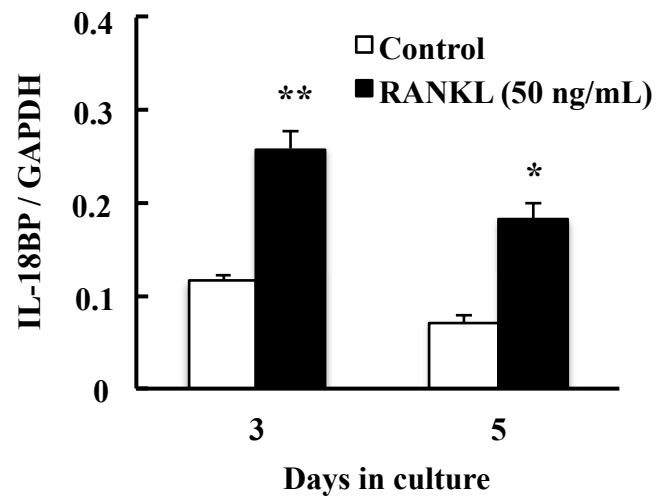


Fig. 2. Effect of RANKL on mRNA expression of IL-18BP in RAW264.7 cells. IL-18BP mRNA expression was determined by real-time PCR on days 3 and 5 of culture. Each bar indicates the mean \pm SD of three separate experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, RANKL treatment vs. control.

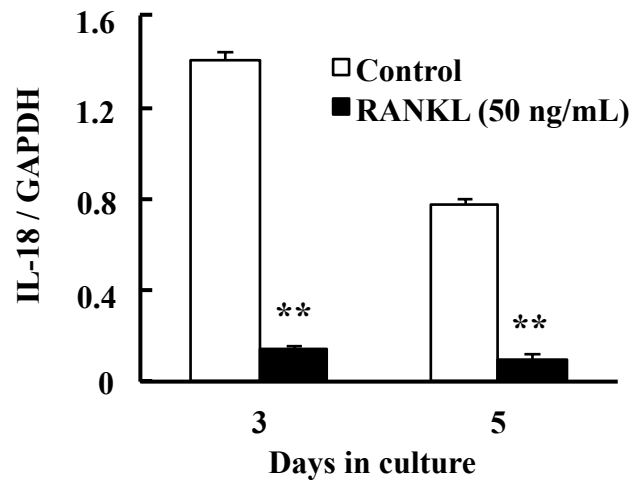


Fig 3. Effect of RANKL on mRNA expression of IL-18 in RAW264.7 cells. IL-18 mRNA expression was determined by real-time PCR on days 3 and 5 of culture. Each bar indicates the mean \pm SD of three separate experiments; ** $p < 0.01$, RANKL treatment vs. control.

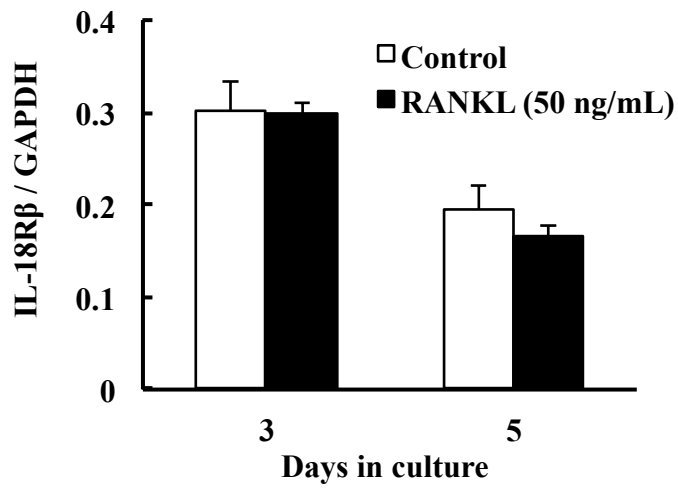


Fig. 4. Effect of RANKL on mRNA expression of IL-18R β in RAW264.7 cells.

IL-18R β mRNA expression was determined by real-time PCR on days 3 and 5 of culture. Each bar indicates the mean \pm SD of three separate experiments.

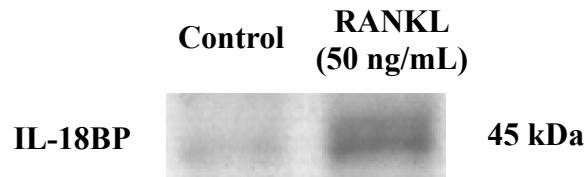


Fig. 5. Effect of RANKL on protein expression of IL-18BP in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with or without 50 ng/mL soluble RANKL for 3 days. The medium was then changed to α -MEM without FBS and RANKL. Protein expression of IL-18BP in the culture supernatants after FBS starvation was determined by Western blotting.

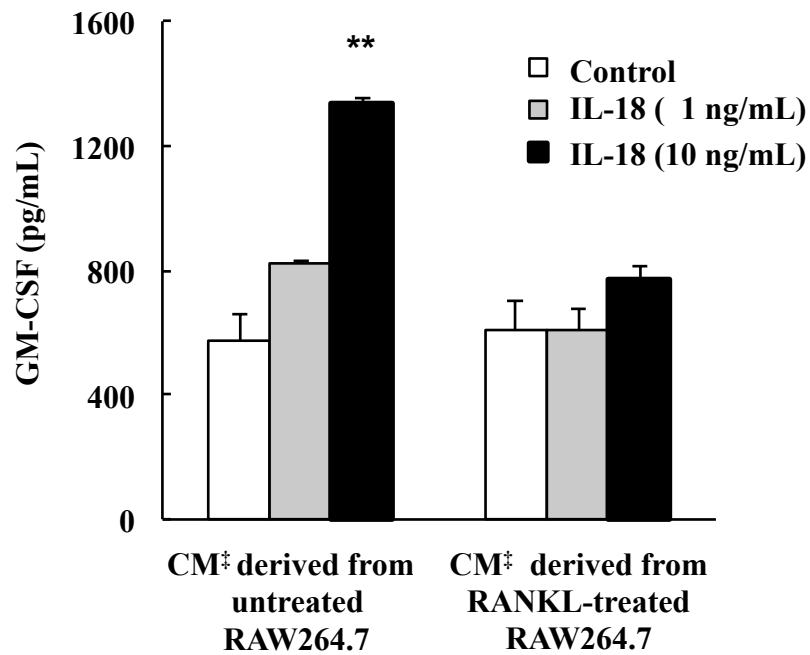


Fig. 6. Effect of conditioned medium derived from RAW264.7 cells on IL-18-induced GM-CSF expression in CD4⁺ T cells.

CD4⁺ T cells were stimulated with 0 (control), 1 or 10 ng/ mL IL-18 in the presence of conditioned medium derived from RANKL-treated or untreated control RAW264.7 cells. GM-CSF protein expression was determined in the culture supernatants of CD4⁺ T cells by ELISA. [‡]CM; conditioned medium. Each bar indicates the mean \pm SD of three separate experiments; ** $p < 0.01$, IL-18 treatment vs. control.

考 察

本研究では、RANKL 刺激の有無にかかわらず、RAW264.7 細胞の IL-18BP、IL-18 および IL-18R β の遺伝子発現は検出されたが、IL-18R α の遺伝子発現は検出されなかった。IL-18R α は IL-18 との結合領域を有するヘテロ 3 量体である¹⁷⁾。一方、IL-18R β は IL-18 との結合領域を欠くが、IL-18 が IL-18R α と結合後のシグナル伝達に必須であるため、IL-18 の刺激が細胞内に伝達されるには、IL-18R α と IL-18R β の両方が不可欠とされている¹⁷⁾。したがって、本研究結果から、IL-18R α を欠く RAW264.7 細胞には、IL-18 が直接作用できないことが示唆された。

本研究では、RANKL の刺激を受けた RAW264.7 細胞には、IL-18 のおとり受容体である IL-18BP の発現増加が認められ、しかもこの傾向は培養 5 日目より 3 日目で顕著であった。一方、TRAP 陽性の多核の破骨細胞様細胞の存在は、培養 3 日目より 5 日目で多く認められた。Kitami ら⁹⁾ は、RAW264.7 細胞を RANKL 存在下で 10 日間培養すると、TRAP 陽性の多核の破骨細胞様細胞数は培養 3 日目から 7 日目まで増加したが、10 日目には減少したと報告している。Kitami ら⁹⁾ の報告と本研究結果から推測すると、RANKL 存在下での RAW264.7 細胞における IL-18BP 発現は、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞様細胞への分化の初期段階で増加すると考えられた。

これまでに、ヒトの単球、血管内皮細胞およびマクロファージ²⁰⁾、ならびにマウスの心筋細胞が IL-18BP を分泌することが報告されている^{20,21,25)}。本研究では、RAW264.7 細胞の培養上清中に IL-18 BP が確認され、RANKL の刺激でその発現が増加した。Foster ら²⁰⁾ は、歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis*^{26,27)} 由来の lipopolysaccharide の刺激で、ヒト単球系 THP-1 細胞の IL-18 と IL-18BP 発現が増加したと報告している。さらに、抗 IL-18BP 抗体の添加によって培養上清中の遊離型の IL-18 量が増加することも認めている²⁰⁾。本研究では、RANKL は RAW264.7 細胞の IL-18BP の遺伝子発現を増加させた一方で、IL-18 の遺伝子発現を減少させた。Foster ら²⁰⁾ の報告と本研究結果から、RANKL の刺激を受

けた RAW264.7 細胞の培養上清中には、IL-18 のおとり受容体として機能する IL-18BP が含まれると考えられた。そこで、IL-18 が CD4⁺ T 細胞の GM-CSF 発現を増加させることを明らかにした報告¹¹⁻¹³⁾を基に、RANKL の刺激を受けた RAW264.7 細胞が産生する IL-18BP は、CD4⁺ T 細胞の IL-18 誘導性 GM-CSF 発現増加を抑制するのではないかと考えた。この仮説を検証するために、RAW264.7 細胞の培養上清を含む conditioned medium が、CD4⁺ T 細胞の IL-18 誘導性 GM-CSF 発現増加に及ぼす影響を調べた。その結果、RANKL の刺激を受けた RAW264.7 細胞由来の conditioned medium は、CD4⁺ T 細胞の IL-18 誘導性 GM-CSF 発現増加を完全にブロックしたが、RANKL で刺激しなかった RAW264.7 細胞由来の conditioned medium は、これをブロックしなかった。この結果から、RANKL の刺激を受けた破骨細胞前駆細胞が破骨細胞に分化する過程で産生される IL-18 BP は、おとり受容体として CD4⁺ T 細胞膜での IL-18 受容体と IL-18 との結合を阻害したと考えられた。

関節リウマチや歯周病など、RANKL による破骨細胞分化の促進を伴う炎症性骨疾患²⁸⁻³¹⁾では、血清や病理組織中に IL-18 発現が認められることが報告されている³²⁻³⁶⁾。本研究結果では、RANKL の刺激を受けた破骨細胞前駆細胞が産生する IL-18 BP が、CD4⁺ T 細胞の IL-18 誘導性 GM-CSF 発現増加をブロックした。この結果から、RANKL が優位となる炎症下では、CD4⁺ T 細胞を介する IL-18 の破骨細胞の分化抑制作用は減弱化すると考えられた。

以上のことから、RANKL は、RAW264.7 細胞の破骨細胞への分化と IL-18BP 産生を増加させて、CD4⁺ T 細胞における IL-18 誘導性 GM-CSF 発現増加を阻害することが示唆された。

結 論

RANKL 誘導性の破骨細胞分化を想定した破骨細胞前駆細胞と T 細胞の細胞間相互作用における IL-18BP の役割を明らかにすることを本研究の目的とし、破骨細胞前駆細胞としてマウス単球/マクロファージ由来の RAW264.7 細胞を用いて、RANKL の刺激が破骨細胞様細胞への分化、IL-18BP, IL-18, IL-18R α および IL-18R β 発現に及ぼす影響を調べた。また、RANKL の刺激を受けた RAW264.7 細胞の培養上清を含む conditioned medium が、マウス脾臓由来の CD4⁺ T 細胞の IL-18 誘導性 GM-CSF 発現増加に及ぼす影響についても調べ、以下の結果および結論を得た。

1. RANKL は、RAW264.7 細胞の TRAP 陽性の多核の破骨細胞様細胞への分化を促進させた。
2. RANKL は、RAW264.7 細胞の IL-18 遺伝子発現を有意に減少させる一方、IL-18BP 遺伝子発現を有意に増加させた。
3. RANKL は、RAW264.7 細胞の IL-18R β 遺伝子発現には影響を及ぼさず、IL-18R α 遺伝子発現は RANKL の有無に関わらず検出されなかった。
4. RANKL は、RAW264.7 細胞の IL-18BP 発現を増加させた。
5. RANKL の刺激を受けた RAW264.7 細胞の培養上清を含む conditioned medium は、CD4⁺ T 細胞の IL-18 誘導性 GM-CSF 発現増加を完全にブロックした。

以上の結果から、RANKL は、RAW264.7 細胞の破骨細胞への分化を促進するとともに IL-18BP 産生を増加させて、CD4⁺ T 細胞の IL-18 誘導性 GM-CSF 発現増加をブロックし、IL-18 による破骨細胞分化抑制作用を減弱化させる可能性が示唆された。

謝 辞

本研究遂行にあたり，格別たるご指導ご鞭撻を賜りました日本大学歯学部衛生学講座の前野正夫教授および川戸貴行教授に謹んで心より感謝申し上げます。

また，本研究を通じ多大なるご協力を賜りました同講座の田中秀樹助教および中井久美子助教に深く感謝致します。

引用文献

1. Quinn JM and Saleh H. Modulation of osteoclast function in bone by the immune system. *Mol Cell Endocrinol* 310: 40-51, 2009
2. Schett G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *Eur J Clin Invest* 41: 1361-1366, 2011
3. Väänänen HK and Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* 473: 132-138, 2008
4. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT and Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20: 345-357, 1999
5. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H and Sakai H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand: Modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 768-775, 2000
6. Theill LE, Boyle WJ and Penninger JM. RANKL and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* 20: 795-823, 2002
7. Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K and Ebisu S. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF- κ B signaling pathways. *J Biol Chem* 283: 11535-11540, 2008
8. Maeno M, Tanaka H, Zhang F, Kitami S, Nakai K and Kawato T. Direct and indirect effects of IL-17A on RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Hard Tissue Biol* 22: 287-292, 2013
9. Kitami S, Tanaka H, Kawato T, Tanabe N, Katono-Tani T, Zhang F, Suzuki N, Yonehara Y and Maeno M. IL-17A suppresses the expression of bone resorption-related proteinases and osteoclast differentiation via IL-17RA or IL-17RC receptors in RAW264.7 cells. *Biochimie* 92: 398-404, 2010
10. Zhang F, Tanaka H, Kawato T, Kitami S, Nakai K, Motohashi M, Suzuki N, Wang CL, Ochiai K, Isokawa K and Maeno M. Interleukin-17A induces cathepsin K and MMP-9 expression in osteoclasts via celecoxib-blocked prostaglandin E₂ in osteoblasts. *Biochimie* 93: 296-305, 2011

11. Udagawa N, Horwood NJ, Elliott J, Mackay A, Owens J, Okamura H, Kurimoto M, Chambers TJ, Martin TJ and Gillespie MT. Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. *J Exp Med* 185: 1005-1012, 1997
12. Horwood NJ, Udagawa N, Elliott J, Grail D, Okamura H, Kurimoto M, Dunn AR, Martin T and Gillespie MT. Interleukin 18 inhibits osteoclast formation via T cell production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Invest* 101: 595-603, 1998
13. Udagawa N. The mechanism of osteoclast differentiation from macrophages: possible roles of T lymphocytes in osteoclastogenesis. *J Bone Miner Metab* 21: 337-343, 2003
14. Dai SM, Shan ZZ, Xu H and Nishioka K. Cellular targets of interleukin-18 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66: 1411-1418, 2007
15. Dai SM, Nishioka K and Yudoh K. Interleukin (IL) 18 stimulates osteoclast formation through synovial T cells in rheumatoid arthritis: comparison with IL1- β and tumor necrosis factor- α . *Ann Rheum Dis* 63: 1379-1386, 2004
16. Zhang W, Cong XL, Qin YH, He ZW, He DY and Dai SM. IL-18 upregulates the production of key regulators of osteoclastogenesis from fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Inflammation* 36: 103-109, 2013
17. Arend WP, Palmer G and Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev* 223: 20-38, 2008
18. Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA and Rubinstein M. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* 10: 127-136, 1999
19. Dinarello CA, Novick D, Kim S and Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol* 4: 289, 2013
20. Foster N, Andreadou K, Jamieson L, Preshaw PM and Taylor JJ. VIP inhibits *P. gingivalis* LPS-induced IL-18 and IL-18BP in monocytes. *J Dent Res* 86: 883-887, 2007
21. Corbaz A, ten Hove T, Herren S, Graber P, Schwartsburd B, Belzer I, Harrison J, Plitz T, Kosco-Vilbois MH, Kim SH, Dinarello CA, Novick D, van Deventer S and Chvatchko Y. IL-18-binding protein expression by endothelial cells and

- macrophages is up-regulated during active Crohn's disease. *J Immunol* 168: 3608-3616, 2002
22. Denlinger LC, Fisette PL, Garis KA, Kwon G, Vazquez-Torres A, Simon AD, Nguyen B, Proctor RA, Bertics PJ and Corbett JA. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium. *J Biol Chem* 271: 337-342, 1996
 23. Fujisaki K, Tanabe N, Suzuki N, Kawato T, Takeichi O, Tsuzukibashi O, Makimura M, Ito K and Maeno M. Receptor activator of NF- κ B ligand induces the expression of carbonic anhydrase II, cathepsin K, and matrix metalloproteinase-9 in osteoclast precursor RAW264.7 cells. *Life Sci* 80: 1311-1318, 2007
 24. Hotokezaka H, Sakai E, Kanaoka K, Saito K, Matsuo K, Kitaura H, Yoshida N and Nakayama K. U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells. *J Biol Chem* 277: 47366-47372, 2002
 25. Murray DR, Mummidi S, Valente AJ, Yoshida T, Somanna NK, Delafontaine P, Dinarello CA and Chandrasekar B. β 2 adrenergic activation induces the expression of IL-18 binding protein, a potent inhibitor of isoproterenol induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro and myocardial hypertrophy in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 52: 206-218, 2012
 26. Lamont RJ and Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1244-1263, 1998
 27. Fukui T, Masuno K, Makita Y, Fujiwara S, Shiota G, Imamura Y, Shiba A and Wang PL. Antimicrobial effects of ozone gel against periodontal bacteria. *J Hard Tissue Biol* 23: 445-448, 2014
 28. Souza PP and Lerner UH. The role of cytokines in inflammatory bone loss. *Immunol Invest* 42: 555-622, 2013
 29. Udagawa N, Kotake S, Kamatani N, Takahashi N and Suda T. The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 4: 281-289, 2002
 30. Tanaka S. Regulation of bone destruction in rheumatoid arthritis through RANKL-RANK pathways. *World J Orthop* 4: 1-6, 2013
 31. Chen B, Wu W, Sun W, Zhang Q, Yan F and Xiao Y. RANKL expression in periodontal disease: where does RANKL come from? *Biomed Res Int* 2014:

731039, 2014

32. Bokarewa M and Hultgren O. Is interleukin-18 useful for monitoring rheumatoid arthritis? *Scand J Rheumatol* 34: 433-436, 2005
33. Petrovic-Rackov L and Pejnovic N. Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF- α measurement in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 25: 448-452, 2006
34. Rooney T, Roux-Lombard P, Veale DJ, FitzGerald O, Dayer JM and Bresnihan B. Synovial tissue and serum biomarkers of disease activity, therapeutic response and radiographic progression: analysis of a proof-of-concept randomised clinical trial of cytokine blockade. *Ann Rheum Dis* 69: 706-714, 2010
35. Johnson RB and Serio FG. Interleukin-18 concentrations and the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 76: 785-790, 2005
36. Sánchez-Hernández PE, Zamora-Perez AL, Fuentes-Lerma M, Robles-Gómez C, Mariaud-Schmidt RP and Guerrero-Velázquez C. IL-12 and IL-18 levels in serum and gingival tissue in aggressive and chronic periodontitis. *Oral Dis* 17: 522-529, 2011

基幹論文

Yumi Takahashi, Hideki Tanaka, Kumiko Nakai, Satoshi Kitami, Fumiko Murakami, Toyoko Morita, Natsuko Tanabe, Takayuki Kawato, Masao Maeno. RANKL induces IL-18 binding protein expression in RAW264.7 cells. *Journal of Hard Tissue Biology*, 25: 173-180, 2016