

チタン表面での骨芽細胞分化に対する IL-17F の促進作用

松本 知生¹⁾, 下山 佑²⁾, 丸尾勝一郎³⁾, 木村 重信²⁾¹⁾ 岩手医科大学歯学部補綴・インプラント学講座

(主任: 近藤 尚知 教授)

²⁾ 岩手医科大学微生物学講座分子微生物学分野

(主任: 木村 重信 教授)

³⁾ 神奈川歯科大学顎咬合機能回復補綴医学講座

(受付: 2014年12月9日)

(受理: 2015年1月5日)

オッセオインテグレーション成功のためにはチタン骨内インプラント上の骨芽細胞の分化が必須で、それは種々のサイトカインにより制御されている。最近の研究では、前炎症性サイトカインの一つである IL-17F が骨芽細胞分化の初期段階で作用することが示唆されている。しかし、IL-17F および IL-17F とは異なる IL-17 スーパーファミリーの一員である IL-17A の、チタン表面上での骨芽細胞分化過程への作用は依然明らかではない。本研究では、まずラット動物実験系を用いて検討した。すなわち、ラットの上顎両側第一臼歯を抜去し、その一方の抜歯窩にチタン棒 (φ 1.0 mm x 2.4 mm) を埋入した。埋入後 1 から 7 日目にラットを屠殺、両抜歯窩およびその修復組織を採取し、IL-17F および IL-17A の動態を nested RT-PCR により検索した。次に in vitro 実験系で、IL-17F および IL-17A の、チタン disk 上で培養した MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化マーカーの発現に対する直接的な作用を検討した。In vivo 実験の結果、チタン埋入により処置後 3 日目で IL-17F の産生頻度が有意に上昇すること、一方、IL-17A の産生頻度は、チタン埋入の有無に関わらず、処置後 3 日目まで徐々に上昇することが明らかとなった。In vitro 実験の結果からは、IL-17F 添加によりチタン disk 上で培養した MC3T3-E1 細胞が刺激され、アルカリフォスファターゼおよび骨シアロタンパクの発現が増強されることが示唆された。これらの結果から、IL-17F は、骨芽細胞分化マーカーの発現増強を介して、チタン表面での骨芽細胞分化を促進することが示唆された。

Interleukin (IL)-17F enhances the osteoblast differentiation on titanium surfaces

Chihaya MATSUMOTO¹⁾, Yu SHIMOYAMA²⁾, Katsuichiro MARUO³⁾, Shigenobu KIMURA²⁾¹⁾ Department of Prosthodontics and Oral Implantology, Iwate Medical University School of Dentistry (Chief: Prof. Hisatomo KONDO)²⁾ Division of Molecular Microbiology, Department of Microbiology, Iwate Medical University (Chief: Prof. Shigenobu KIMURA)³⁾ Department of Prosthodontic Dentistry for Function of TMJ and Occlusion, Kanagawa Dental University¹⁾ 1-3-27, Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan.²⁾ 2-1-1, Nishitokuta, Yahaba-cho, Shiwagun, Iwate 028-3694, Japan³⁾ 82, Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa 238-8580, Japan¹⁾ 岩手県盛岡市中央通 1-3-27 (〒020-8505)²⁾ 岩手県紫波郡矢巾町西徳田 2-1-1 (〒028-3694)³⁾ 神奈川県横須賀市稲岡町 82 (〒238-8580)*Dent. J. Iwate Med. Univ.* 40 : 14-25, 2015

緒 言

近年、歯牙欠損に対する補綴処置としてチタンを原材料とした人工歯根を顎骨に埋入し、機能性および審美性の回復を目的とするインプラント治療の需要性が高まっている。インプラント体はオッセオインテグレーションにより歯槽骨と強固に結合し¹⁾、人工歯根として機能を果たすことが明らかにされているが、この過程の中で、まずインプラント体の埋入時の外科処置により、埋入局所では一時的な炎症応答が起きており²⁾、炎症性サイトカイン産生が誘導される³⁾。これらの炎症性サイトカインは局所の細胞増殖⁴⁾、細胞分化^{5, 6)}に関わり、創傷治癒過程に重要な役割を担っていることが明らかにされている。2005年にParkら⁷⁾により炎症応答の制御に関わるヘルパー T 細胞 subset として T helper 17 (Th17) が見いだされ、Th17は感染防御や組織修復に作用することが複数のグループから報告されている^{8, 9)}。Th17の産生する Interleukine-17 (IL-17) スーパーファミリーはこれまでのところ IL-17A から IL-17F の6つのサブタイプに分類されており¹⁰⁾、各サブタイプの作用の特長、異同等については現在、研究が進められている¹¹⁾。この中で、IL-17A と IL-17F はアミノ酸レベルでの相同性が高く (50%) レセプターも共有する¹²⁾が、その生理活性は異なることが最近の研究から明らかにされてきた。両者とも線維芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、マクロファージ等に作用して IL-1 β 、IL-6 や TNF- α 等の炎症性サイトカイン、matrix metalloproteinase や抗菌ペプチドの発現を誘導し、炎症誘導や細菌感染防御に関与している¹³⁻¹⁶⁾が、IL-17A は多発性硬化症¹⁷⁾、関節リウマチ等の自己免疫疾患の発症¹⁸⁾やアレルギー応答に中心的役割を果たすこと¹⁹⁾が示唆されている。一方、IL-17F は自己免疫疾患やアレルギー応答に関与せず、骨芽細胞分化能を亢進し、初期の骨修復に関与する可能性が示唆されている²⁰⁻²²⁾。その他の IL-17 サブタイプの特徴は未だ明確にはされていないものの、IL-17B、

IL-17C および IL-17D が単球に作用し、炎症性サイトカインの産生に関与すること²³⁻²⁵⁾、IL-17E が Th2 からの IL-4、IL-5 および IL-13 の産生を介してアレルギーに関与すること²⁶⁾が示唆されている。しかし、これまでのところ、歯科領域、特にインプラント体埋入後の組織修復およびオッセオインテグレーションに与える Th17 / IL-17 の役割については明らかにはされていない。そこで本研究では、オッセオインテグレーションにつながるチタン表面での骨芽細胞の細胞増殖、細胞分化に対する IL-17 の役割を明らかにする目的で、動物実験系を用いて抜歯窩およびその修復組織での IL-17 (IL-17F および IL-17A) の動態について検索するとともに、チタン埋入にともなう影響について検討した。また株化骨芽細胞 (MC3T3-E1) を用いて、IL-17 による細胞増殖活性、チタン表面培養での MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化マーカーの変動と IL-17 の作用についても検討を行った。

材料および方法

1. 抜歯窩およびチタン棒埋入抜歯窩からの cDNA 精製

8週齢の雄性 Wistar 系ラット (日本クレア、東京) の上顎両側第一臼歯を抜去し、片側抜歯窩に滅菌した円柱状のチタン棒 (ϕ 1.0 mm x 2.4 mm) を埋入した。チタン棒は補綴・インプラント学講座准教授 武部 純 博士より恵与を受けた。抜歯窩を縫合した後、埋入 1, 3, 5, 7 日目に吸入麻酔薬により屠殺し、トレフィンバー (ϕ 6.0 mm, GC, 東京) を用いて抜歯窩組織を採取した。採取した組織からの RNA 精製は ISOGEN (ニッポンジーン、東京) を用いて行った。既報²⁷⁾に従い、得られた RNA は 2.5 μ M Oligo dT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 mM DTT (Invitrogen), 625 μ M dNTP (Invitrogen), 20 U RNasin[®] Plus (Promega, Madison, WI, USA), First Strand buffer (Invitrogen), 100 U SuperScript[®] II Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用い、30°C 10分、

55°C 30 分, 99°C 5 分の条件下で逆転写を行い cDNA とした. なお本研究は, 岩手医科大学動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号 24-019).

2. 抜歯窩およびその修復組織での IL-17 の動態

抜歯窩局所の IL-17F および IL-17A の産生は nested RT-PCR 法により検討した²⁸⁾. Nested RT-PCR 法の第一段階の PCR は市販の IL-17F のプライマー (タカラバイオ, 大津), および IL-17A (NM_001106897) の塩基配列を基に設計, 作製したプライマーを, 第二段階では IL-17F (NM_001015011) の塩基配列を基に設計, 作製したプライマーおよび市販のラット IL-17A のプライマー (タカラバイオ) を用いて行った (表 1). 得られた cDNA をテンプレートとして, 1st PCR 反応はラット IL-17F 特異的プライマーあるいはラット IL-17A 特異的プライマー 0.15 μ M, 1x AmpliTaq Gold[®] 360 Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を 94°C 15 秒, 58°C 15 秒, 72°C 15 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル行った. 増幅された PCR 産物を NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (タカラバイオ) を用いて精製, 濃縮を行った. 2nd PCR は精製された PCR 産物をテンプレートとして, ラット IL-17F 特異的 nested プライマーおよびラット IL-17A 特異的 nested プライマー 0.15 μ M, 1x AmpliTaq Gold[®] 360 Master Mix を 94°C 15 秒, 56°C 15 秒, 72°C 15 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル行った. PCR 反応終了後, 3% アガロースゲル電気泳動 (0.1 μ g/ml エチジウムブロマイド, 44.5 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8.0) を行い検出した.

3. チタン表面での MC3T3-E1 細胞の増殖および IL-17 添加による作用

本研究では, 医療工学講座准教授 平 雅之博士より恵を受けた表面処理を行っていない滑沢なチタン disk (ϕ 20.0 mm x 1.0 mm) を供試した. IL-17F および IL-17A の細胞増殖活性はマウス株化骨芽細胞株 (MC3T3-E1 細胞) を

用いて Nam ら²²⁾ の方法に準じて行った. すなわち, 血清を含まない α MEM (Invitrogen) に 100 U/ml penicillin および 100 μ g/ml streptomycin を添加した培地に, MC3T3-E1 細胞を 1×10^5 cells/5 ml/well の密度でチタン表面上または培養プレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に播種した. 細胞をリコンビナントマウス IL-17F (rmIL-17F) (フナコシ, 東京) またはリコンビナントマウス IL-17A (rmIL-17A) (フナコシ) を用いて 20 ng/ml で刺激し, 37°C, 5% CO₂ - 95% Air の条件下で培養した. 細胞増殖活性は刺激後 1, 3, 5 日目の付着細胞数から検討した.

4. チタン表面での骨芽細胞の骨芽細胞分化に対する IL-17 の役割

IL-17F および IL-17A による骨芽細胞分化誘導能の検討は, Yokota ら²⁹⁾ に準じて行った. すなわち, 骨芽細胞分化マーカーのうち, I 型コラーゲン (Col1A) (NM_007742), アルカリフォスファターゼ (ALPL) (NM_007431), 骨シアロタンパク (IBSP) (NM_008318), およびオステオカルシン (BGLAP) (NM_031368) の発現量を real-time RT-PCR 法により測定した. すなわち無血清 α MEM 培地 (100 U/ml penicillin および 100 μ g/ml streptomycin 含有) に懸濁した MC3T3-E1 細胞 1×10^5 cells/5 ml/well を, 培養プレート上またはチタン表面上に播種し, rmIL-17F または rmIL-17A (20

表 1 Nested RT-PCR に使用したプライマー

遺伝子	配列 (5' to 3')	reference
ラット GAPDH	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA	Takara bio.
ラット IL-17F (1st)	CAAGTCTTGGCAAGGGTGACTTA CTGCTCCCGAGCTGATGATG	Takara bio.
ラット IL-17A (1st)	CTGATCAGGACGAGCGACCA GGAGAAAGTTATTGGCCTCGG	In this study
ラット IL-17F (2nd)	GACCCGGAGACCTCTCAGAA CTTCATGCTGGATTCCCCGA	In this study
ラット IL-17A (2nd)	CTGATCAGGACGAGCGACCA ACTGTAGCCTCCAGTTCAGTAGCA	Takara bio.

表2 Real-time PCR に使用したプライマー

遺伝子	配列 (5' to 3')	reference
マウス GAPDH	TGTGTCCGTCCTGGATCTGA TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	Takara bio.
マウス Col1A	GACTAGTTCAGCTTTGTGGACCTC GGGACCCTTAGGCCTAAGTGTA	Takara bio.
マウス ALPL	GCAGTATGAATTGAATCGGAACAAC ATGGCCTGGTCCATCTCCAC	Takara bio.
マウス IBSP	GGCTATTGATCAAGCAGCACACA CGCAGTTAGCAATAGCACAAACAC	Takara bio.
マウス BGLAP	CGGCCCTGAGTCTGACAAA TCTGTAGGCGGCTTTAAGCCATA	Takara bio.

ng/ml) で刺激し, 37°C, 5% CO₂-95% Air の条件下で培養した. 刺激後 1, 3, 5 日目に付着細胞を回収した. RNA の精製は RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Düsseldorf, Germany) を用い, PrimeScript[®] RT Master Mix (タカラバイオ) により逆転写を行った. 得られた cDNA 100 ng をテンプレートとして 1x SYBR[®] Premix Ex TaqII (タカラバイオ), 0.4 μM プライマー (表 2), 95°C 5 秒, 60°C 30 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル行った. 蛍光検出は Thermal Cycler Dice[®] Real Time System Single (タカラバイオ) を用いて行った.

5. 統計解析

動物実験系での IL-17F および IL-17A の検出率についての統計解析は Fisher の正確確率検定で行った. MC3T3-E1 細胞を用いた in vitro 実験系では Student's-*t* 検定により解析した. すべての結果において有意水準は 0.05 未満とした.

結 果

1. 抜歯窩およびチタン棒埋入抜歯窩での IL-17 の発現

抜歯窩修復組織での IL-17F および IL-17A の発現については, 当初, real-time RT-PCR による定量的測定を試みた. しかし, その絶対量は極めて少なく, 多くは検出限界付近の値を示したため, nested RT-PCR による定性的測定を用いて, 発現が認められたサンプルの割合 (検出率) で IL-17F および IL-17A の発現を検討した. IL-17F および IL-17A の発現は個体により発現パターンは異なっており, IL-17F あるいは IL-17A のいずれかが認められた群の中では IL-17A のみ陽性の群が最も多く, ついで IL-17F および IL-17A がともに陽性の群が多く, IL-17F のみ陽性の群が最も少なかった (それぞれ 55.8%, 33.7% および 10.5%). 図 1A には 3 つの発現パターンの一例を示した.

抜歯直後と比較して抜歯後 1 日目の組織サンプルでは, IL-17F および IL-17A のいずれの検出率も上昇する傾向を示し, 抜歯後 7 日目には低下した (図 1B, C). チタン棒を埋入した群でも, 抜歯のみの群と同様の傾向を示したが, 埋入後 3 日目で IL-17F の検出率がチタン棒埋入群で有意に高かった ($p < 0.05$) (図 1B, C).

2. チタン表面での MC3T3-E1 細胞の増殖および IL-17 添加による作用

IL-17F および IL-17A の骨芽細胞に対する細胞増殖活性について検討した結果, 培養プレートに播種した MC3T3-E1 細胞は培養 5 日目まで細胞増殖は起こらず, さらに, いずれの IL-17 を添加しても MC3T3-E1 細胞の増殖は認められなかった. また, チタン表面で培養した MC3T3-E1 細胞についても, IL-17 の添加, 非添加に関わらず, 培養 5 日目まで有意な細胞増殖は観察されなかった (図 2).

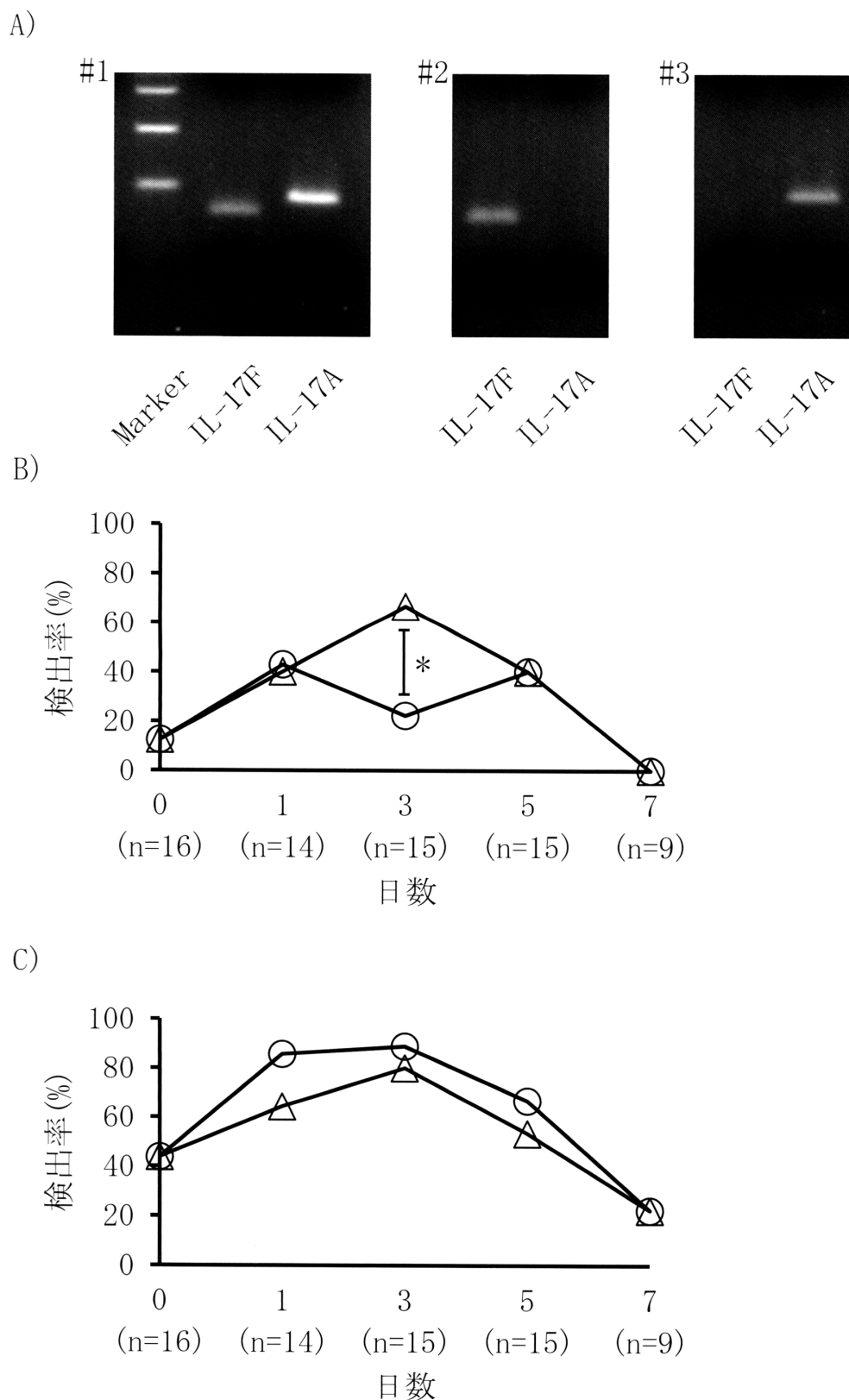


図 1: 抜歯窩およびその修復組織での IL-17 の動態

A) チタン埋入抜歯窩修復組織 (# 1, 2) および抜歯窩修復組織 (# 3) の IL-17F, IL-17A mRNA 発現を示す。
 B, C) 抜歯窩, チタン埋入抜歯窩の修復組織での IL-17F (B), IL-17A (C) の発現率の変動を示す。図中の (△) はチタン埋入抜歯窩修復組織, (○) は抜歯窩修復組織での IL-17F あるいは IL-17A の発現を示す。(*) は有意な発現率の差 ($p < 0.05$) を示す。

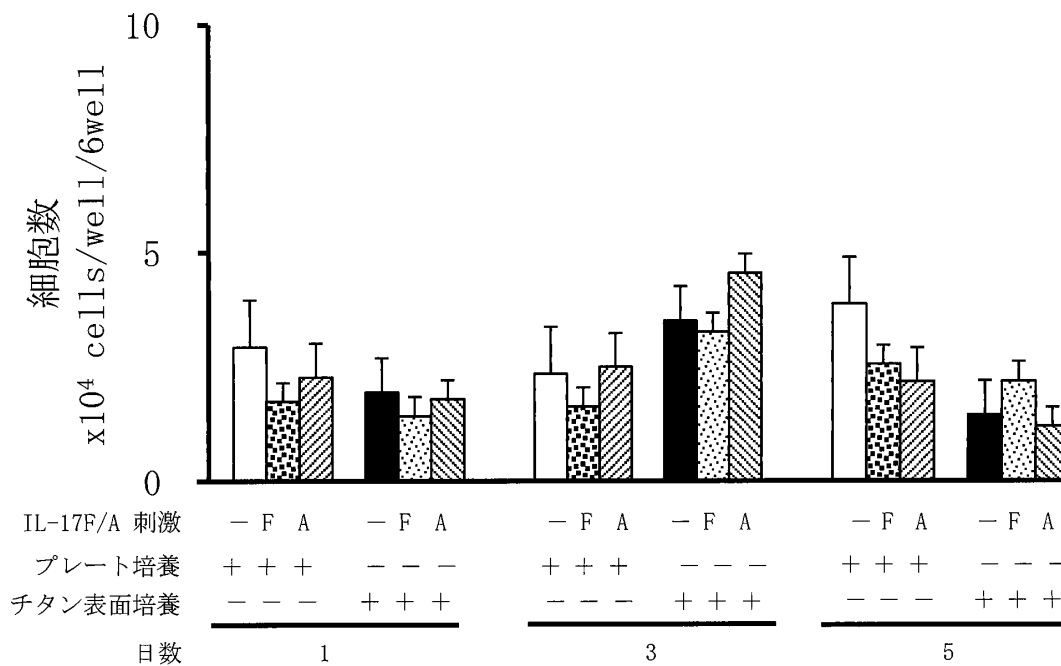


図2: MC3T3-E1 細胞に対する IL-17F および IL-17A の増殖活性

培養プレートおよびチタン表面培養時の MC3T3-E1 細胞に対する IL-17F および IL-17A の細胞増殖活性 (□; プレート培養群, ▨; プレート培養 + IL-17F 刺激群, ▩; プレート培養 + IL-17A 刺激群, ■; チタン表面培養群, ▤; チタン表面培養 + IL-17F 刺激群, ▥; チタン表面培養 + IL-17A 刺激群) を示す。

3. チタン表面培養での MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化マーカーの変動および IL-17 の作用

MC3T3-E1 細胞の細胞増殖に対してはチタン表面培養および IL-17 添加の影響が観察されなかったことから、次に、骨芽細胞分化に対する作用について、骨芽細胞分化マーカーの動態から検討した。その結果、MC3T3-E1 細胞のチタン表面培養では、通常の培養プレートを用いた場合と比較して、Col1A, IBSP については著明な差は観察されなかった (図 3A, C) が、ALPL については培養 3 日目および 5 日目に発現が増強する傾向が観察された (図 3B)。BGLAP についてはチタン表面培養 3 日目および 5 日目で発現が有意に増強されていた ($p < 0.05$) (図 3D)。

チタン表面培養での MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化マーカー発現に対する IL-17 の作用についても Col1A 発現についてはいずれの IL-

17 の添加によっても対照群との間に有意な差は認められなかった (図 3A) が、ALPL については IL-17F 添加によりチタン表面培養 3 日目でその発現が有意に増強され ($p < 0.05$)、培養 5 日目においても発現増強作用が持続する傾向が観察された (図 3B)。逆に、IBSP 発現については IL-17F 添加によりチタン表面培養 1 日目に発現増強傾向が認められ、培養 3 日目で有意な発現増強作用が観察された ($p < 0.05$) (図 3C)。BGLAP については、培養 3 日目で IL-17A 添加により、培養 5 日目で IL-17F 添加により発現増強傾向が認められたが、いずれも有意な差は観察されなかった (図 3D)。

考 察

IL-17 スーパーファミリーのうち、IL-17F は骨折部位の修復過程の初期に誘導され骨芽細胞分化を亢進し、初期の骨修復に関与する可能性が示唆されている²²⁾。一方、IL-17A は、IL-17F

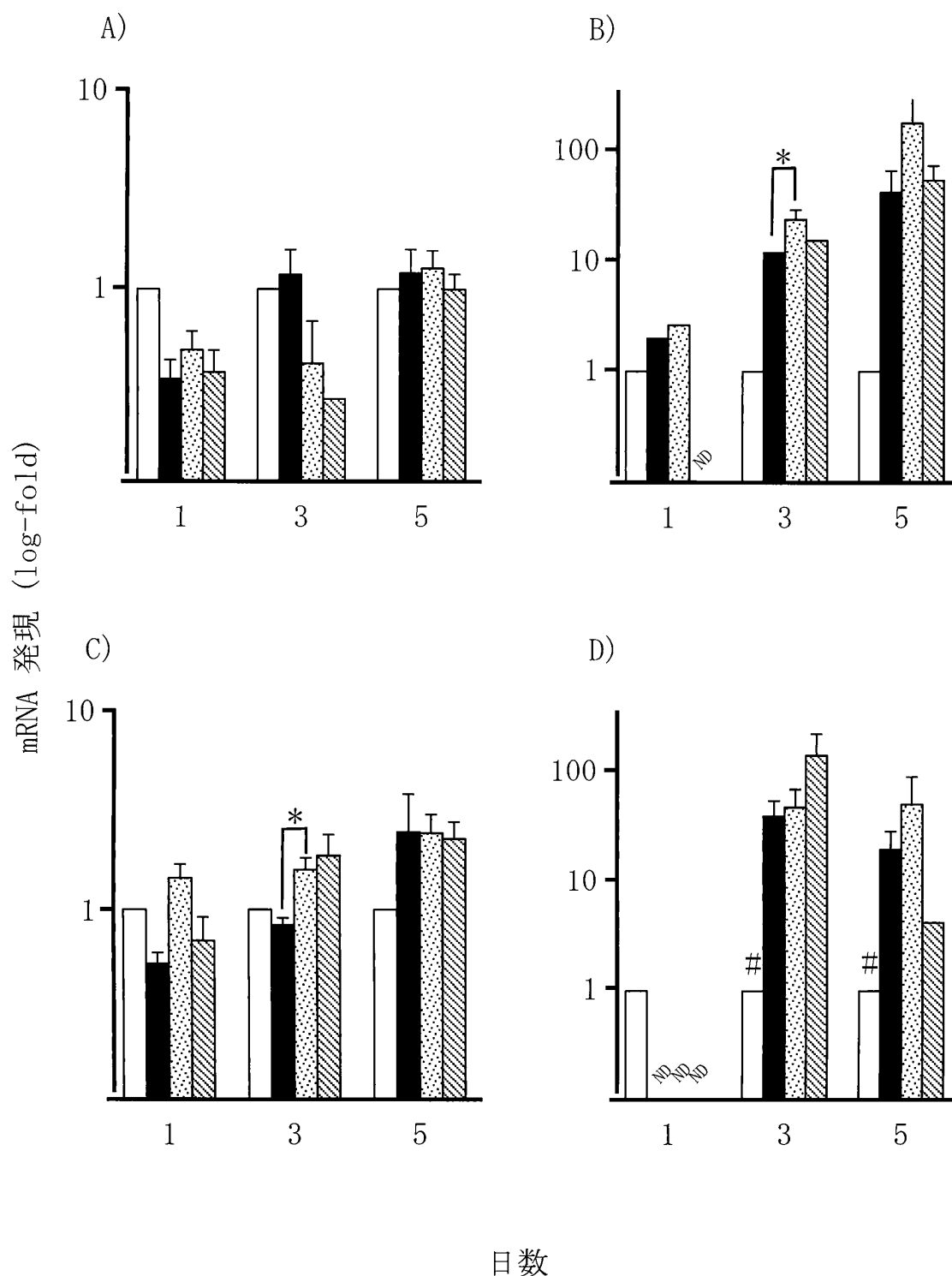


図 3: チタン表面培養の MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化マーカー発現に対する IL-17 の作用

MC3T3-E1 細胞をチタン表面培養し, IL-17F, IL-17A 刺激した際の骨芽細胞分化マーカー (A: Col1A, B: ALPL, C: IBSP および D: BGLAP) の mRNA 発現量を示す (□; プレート培養, ■; チタン表面培養, ▨; IL-17F 刺激群, ▩; IL-17A 刺激群, ND; 検出されず). チタン表面培養と比較して (*) は有意な mRNA 発現増強, (#) は有意な mRNA 発現の低下 ($p < 0.05$) を示す.

とアミノ酸レベルでの相同性が高くレセプターも共有する¹²⁾にもかかわらず、自己免疫疾患の発症やアレルギー応答に中心的役割を果たすことが示唆されている^{18,19)}。他の IL-17 スーパーファミリーのサブタイプを含め、これまでに報告された IL-17 の生理活性の多彩さは各サブタイプが異なった生理活性を発揮することによるのかも知れない。本研究では、インプラントのオッセオインテグレーションに関連するチタン表面での骨芽細胞の細胞増殖、細胞分化（骨芽細胞分化）に対する IL-17 の役割を明らかにする目的で、IL-17F および IL-17A と最も相同性が高い IL-17A をターゲットに、ラット動物実験系を用いて抜歯窩およびその修復組織での動態ならびにチタン埋入にともなう影響について検討した。その結果、いずれの IL-17 についても real-time RT-PCR による定量的測定は検出限界付近であったことからその絶対量は極めて少ないことが示唆された。そこで、nested RT-PCR による定性的測定により検出率として検討した結果、抜歯直後の組織サンプルおよび抜歯窩の修復組織で IL-17F および IL-17A の検出率が上昇していた。さらに、抜歯窩の修復が進んだ抜歯後 7 日目ではいずれも低下する傾向が観察された（図 1B, C）ことから、抜歯後の歯槽骨の修復過程の初期段階で IL-17 が関与することが示唆された。

つぎに本研究では、抜歯窩へのチタン棒埋入にともなう影響について検討した。チタンは組織修復の足場^{30,31)}となるだけでなく、その表面形状・性状にもよるが、骨芽細胞分化誘導能を有することが示唆されている³²⁾。そこで、チタン棒埋入群での IL-17F および IL-17A の検出率をチタン棒非埋入群（抜歯のみの対照群）のそれと比較検討した。その結果、埋入後 3 日目で IL-17F の検出率がチタン棒埋入群で有意に高かった（図 1B）ことから、チタンインプラントのオッセオインテグレーションに関連するチタン表面での骨芽細胞の細胞増殖／分化に IL-17F が関与する可能性が示唆された。

骨芽細胞の増殖と分化は骨組織の修復に必須

の過程³³⁾であることから、つぎに IL-17F および IL-17A の骨芽細胞の細胞増殖、細胞分化に対する作用について、MC3T3-E1 細胞を用いた in vitro 実験系で検討した。細胞増殖については、通常の培養プレートでの MC3T3-E1 細胞数の変動および IL-17F / IL-17A 添加の影響、ならびにチタン disk を用いたチタン表面培養での MC3T3-E1 細胞数の変動および IL-17F / IL-17A 添加の影響について検討した。しかし、いずれの培養法を用いた場合にも、また、いずれの IL-17 サブタイプを添加した場合にも、MC3T3-E1 細胞数の有意な変動は観察されなかった（図 2）。この成績は IL-17 (IL-17A) が平滑筋細胞に対して細胞増殖活性を有するとの Chang らの報告³⁴⁾とは異なるが、対象とする細胞により IL-17 の作用が異なることによるのかも知れない。さらに、本研究結果からは、チタン表面培養の骨芽細胞の細胞増殖に対する影響も少ないことが示唆された。但し、チタンはその表面形状・性状により骨芽細胞の骨分化誘導能が大きく変わるとの報告^{32,35,36)}や sub- μ チタン粒子は単独でマクロファージ活性化作用を有するとの Taira らの報告³⁷⁾からすれば、チタン表面培養単独で骨芽細胞の細胞増殖に働く可能性は残されている。

骨芽細胞分化過程では Coll1A, ALPL, IBSP, BGLAP などの骨芽細胞分化マーカーの発現が誘導される³⁸⁻⁴¹⁾。そこで本研究ではチタン表面培養での MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化マーカーの変動と IL-17 の作用について検討を行った。その結果、チタン表面培養では、通常の培養プレートを用いた場合と比較して、Coll1A では著明な差は観察されなかった（図 3A）が、ALPL では培養 3 日目および 5 日目に発現が増強する傾向が観察され（図 3B）、BGLAP についてはチタン表面培養 3 日目および 5 日目でその発現が有意に増強されていた（図 3D）ことから、チタン表面培養単独で骨芽細胞分化に働くことが示唆された。チタン表面培養での MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化マーカー発現に対する IL-17 の作用については、IL-17F 添加

によりチタン表面培養3日目でMC3T3-E1細胞のALPLおよびIBSPの発現が有意に増強された(図3B, C). 本研究結果と, 通常培養のMC3T3-E1細胞に対してIL-17FはCollA, IBSPおよびBGLAPの発現増強に働くとのNamら²²⁾の報告を勘案すると, IL-17Fは骨芽細胞分化マーカーの発現増強作用を介して, 骨芽細胞分化に作用していることが示唆された.

本研究の結果, 1) 抜歯後の菌槽骨の修復過程の初期段階では, その絶対量は極めて少ないものの, IL-17が関与すること, 2) チタン表面では骨芽細胞分化が促進されること, 3) さらにその骨芽細胞分化はIL-17Fにより増強されること, が示唆された. 今後, チタンの表面形状・性状の違いによる骨芽細胞の細胞増殖・細胞分化への影響を含め, オッセオインテグレーションにつながるチタン表面での骨芽細胞分化過程に関わるIL-17の役割についてさらに詳細に検討する予定である.

謝辞ならびに利益相反について

稿を終えるにあたり, 本研究を行う機会をあたえていただき, 御懇篤なる御指導, 御校閲を賜りました補綴・インプラント学講座 近藤尚知 教授に深く感謝いたします. また, 本研究を遂行するにあたり, チタン材料を提供して頂きました補綴・インプラント学講座准教授 武部 純 博士, 医療工学講座准教授 平 雅之 博士に深甚なる謝意を表します. 最後に, 絶えず温かい御支援ならびに御協力を頂きました補綴・インプラント学講座と微生物学講座分子微生物学分野の皆様へ深謝いたします. 本研究はJSPS 科研費 23792291 の助成を受けて行った. なお, 本研究において, 公表すべき利益相反はない.

文 献

- 1) Albrektsson, T. and Albrektsson, B.: Osseointegration of bone implants: a review of an alternative mode of fixation. *Acta Orthopaedica Scand.*, 58: 567-577, 1987.
- 2) Perala, D. G., Chapman, R. J., Gelfand, J. A., Callahan, M. V., Adams, D. F. and Lie, T.: Relative production of IL-1 β and TNF α by mononuclear cells after exposure to dental implants. *J. Periodontol.*, 63: 426-430, 1992.
- 3) Hamlet, S., Alfarsi, M., George, R. and Ivanovski, S.: The effect of hydrophilic titanium surface modification on macrophage inflammatory cytokine gene expression. *Clin. Oral Implants Res.*, 23: 584-590, 2012.
- 4) Karsdal, M. A., Fjording, M. S., Foged, N. T., Delaissé, J. M. and Lochter, A.: Transforming growth factor- β -induced osteoblast elongation regulates osteoclastic bone resorption through a p38 mitogen-activated protein kinase- and matrix metalloproteinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, 276: 39350-39358, 2001.
- 5) Dufour, A., Baran, C., Langkamp, H. L., Piesco, N. P. and Agarwal, S.: Regulation of differentiation of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by rhIL-1 β and rhTNF- α . *J. Periodontal Res.*, 28: 566-568, 1993.
- 6) Nakase, T., Takaoka, K., Masuhara, K., Shimizu, K., Yoshikawa, H. and Ochi, T.: Interleukin-1 β enhances and tumor necrosis factor- α inhibits bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Bone*, 21: 17-21, 1997.
- 7) Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q. and Dong, C.: A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.*, 6: 1133-1141, 2005.
- 8) Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L. and Kuchroo, V. K.: Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441: 235-238, 2006.
- 9) Dardalhon, V., Korn, T., Kuchroo, V. K. and Anderson, A. C.: Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J. Autoimmun.*, 31: 252-256, 2008.
- 10) Yao, Z., Painter, S. L., Fanslow, W. C., Ulrich, D., Macduff, B. M., Spriggs, M. K. and Armitage, R. J.: Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J. Immunol.*, 155: 5483-5486, 1995.
- 11) Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R. and Harrington, L. E.: IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.*, 25: 821-852, 2007.
- 12) Gaffen, S. L.: Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat. Rev. Immunol.*, 9: 556-567, 2009.
- 13) Shen, F. and Gaffen, S. L.: Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine*, 41: 92-104, 2008.

- 14) Zheng, Y., Valdez, P. A., Danilenko, D. M., Hu, Y., Sa, S. M., Gong, Q., Abbas, A. R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F. J. and Ouyang, W.: Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.*, 14: 282-289, 2008.
- 15) Xing, X., Yang, J., Yang, X., Wei, Y., Zhu, L., Gao, D. and Li, M.: IL-17A induces endothelial inflammation in systemic sclerosis via ERK signaling pathway. *Plos One*, 8: e85032, 2013.
- 16) Iyoda, M., Shibata, T., Kawaguchi, M., Hizawa, N., Yamaoka, T., Kokubu, F. and Akizawa, T.: IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: synergy with TNF- α and IL-1 β . *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 298: F779-F787, 2010.
- 17) Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K. and Iwakura, Y.: IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 177: 566-573, 2006.
- 18) Chabaud, M., Durand, J. M., Buchs, N., Fossiez, F., Page, G., Frappart, L. and Miossec, P.: Human interleukin-17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.*, 42: 963-970, 1999.
- 19) Rizzo, H. L., Kagami, S., Phillips, K. G., Kurtz, S. E., Jacques, S. L. and Blauvelt, A.: IL-23-mediated psoriasis-like epidermal hyperplasia is dependent on IL-17A. *J. Immunol.*, 186: 1495-1502, 2011.
- 20) Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S. and Nakae, S.: Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*, 34: 149-162, 2011.
- 21) Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiyama, Y., Fujikado, N., Tanahashi, Y., Akitsu, A., Kotaki, H., Sudo, K., Nakae, S., Sasakawa, C. and Iwakura, Y.: Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses. *Immunity*, 30: 108-119, 2009.
- 22) Nam, D., Mau, E., Wang, Y., Wright, D., Silkstone, D., Whetstone, H., Whyne, C. and Alman, B.: T-lymphocytes enable osteoblast maturation via IL-17F during the early phase of fracture repair. *Plos One*, 7: e40044, 2012.
- 23) Li, H., Chen, J., Huang, A., Stinson, J., Heldens, J., Foster, J., Dowd, P., Gurney, A. L. and Wood, W. I.: Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97: 773-778, 2000.
- 24) Reynolds, J. M., Martinez, G. J., Nallaparaju, K. C., Chang, S. H., Wang, Y. H. and Dong, C.: Cutting edge: regulation of intestinal inflammation and barrier function by IL-17C. *J. Immunol.*, 189: 4226-4230, 2012.
- 25) Guzzo, C., Ayer, A., Basta, S., Banfield, B. W. and Gee, K.: IL-27 enhances LPS-induced proinflammatory cytokine production via upregulation of TLR4 expression and signaling in human monocytes. *J. Immunol.*, 188: 864-873, 2012.
- 26) Hurst, S. D., Muchamuel, T., Gorman, D. M., Gilbert, J. M., Clifford, T., Kwan, S., Menon, S., Seymour, B., Jackson, C., Kung, T. T., Brieland, J. K., Zurawski, S. M., Chapman, R. W., Zurawski, G. and Coffman, R. L.: New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J. Immunol.*, 169: 443-453, 2002.
- 27) Sasaki, M., Ohara-Nemoto, Y., Tajika, S., Kobayashi, M., Yamaura, C. and Kimura, S.: Antigenic characterization of a novel *Streptococcus anginosus* antigen that induces nitric oxide synthesis by murine peritoneal exudate cells. *J. Med. Microbiol.*, 50: 952-958, 2001.
- 28) Herness, S., Zhao, F. L., Lu, S. G., Kaya, N. and Shen, T.: Expression and physiological actions of cholecystokinin in rat taste receptor cells. *J. Neuroscience*, 22: 10018-10029, 2002.
- 29) Yokota, J., Chosa, N., Sawada, S., Okubo, N., Takahashi, N., Hasegawa, T., Kondo, H. and Ishisaki, A.: PDGF-induced PI3K-mediated signaling enhances the TGF- β -induced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in a TGF- β -activated MEK-dependent manner. *Int. J. Mol. Med.*, 33: 534-542, 2014.
- 30) Ellingsen, J. E., Thomsen, P. and Lyngstadaas, S. P.: Advances in dental implant materials and tissue regeneration. *Periodontol.* 2000, 41: 136-156, 2006.
- 31) Saitoh, S., Sasaki, K., Nezu, T., Taira, M., Shimoyama, Y., Sasaki, M., Kimura, S. and Ishizeki, K.: Histological and TEM observation of subcutaneous tissues exposed to particulate copper, nickel and titanium. *J. Oral Tissue Engin.*, 8: 102-106, 2010.
- 32) Gu, Y. X., Du, J., Si, M. S., Mo, J. J., Qiao, S. C. and Lai, H. C.: The roles of PI3K/Akt signaling pathway in regulating MC3T3-E1 preosteoblast proliferation and differentiation on SLA and SLActive titanium surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 101: 748-754, 2013.
- 33) Nelson, E. R., DuSell, C. D., Wang, X., Howe, M. K., Evans, G., Michalek, R. D., Umetani, M., Rathmell, J. C., Khosla, S., Gesty-Palmer, D. and McDonnell, D. P.: The oxysterol, 27-hydroxycholesterol, links cholesterol metabolism to bone homeostasis through its actions on the estrogen and liver X receptors. *Endocrinology*, 152: 4691-4705, 2011.
- 34) Chang, Y., Al-Alwan, L., Risse, P. A., Halayko, A. J., Martin, J. G., Baglolle, C. J., Eidelman, D. H. and Hamid, Q.: Th17-associated cytokines promote human airway smooth muscle cell proliferation.

- FASEB J., 26: 5152-5160, 2012.
- 35) Cooper, L. F., Zhou, Y., Takebe, J., Guo, J., Abron, A., Holmén, A. and Ellingsen, J. E.: Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO₂ grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. *Biomaterials*, 27: 926-936, 2006.
- 36) Miura, S. and Takebe, J.: Biological behavior of fibroblast-like cells cultured on anodized-hydrothermally treated titanium with a nanotopographic surface structure. *J. Prothodontic Res.*, 56: 178-186, 2012.
- 37) Taira, M., Nezu, T., Sasaki, M., Kimura, S., Kagiya, T., Harada, H., Narushima, T. and Araki, Y.: Gene expression analyses of human macrophage phagocytizing sub- μ titanium particles by allergy DNA chip (Genopal™). *Biomed. Mater. Eng.*, 19: 63-70, 2009.
- 38) Khillan, J. S., Olsen, A. S., Kontusaari, S., Sokolov, B. and Prockop, D. J.: Transgenic mice that express a mini-gene version of the human gene for type I procollagen (COL1A1) develop a phenotype resembling a lethal form of osteogenesis imperfecta. *J. Biol. Chem.*, 266: 23373-23379, 1991.
- 39) Park, J. K., Jang, H., Hwang, S., Kim, E. J., Kim, D. E., Oh, K. B., Kwon, D. J., Koh, J. T., Kimura, K., Inoue, H., Jang, W. G. and Lee, J. W.: ER stress-inducible ATF3 suppresses BMP2-induced ALP expression and activation in MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 443: 333-338, 2014.
- 40) Satokata, I., Ma, L., Ohshima, H., Bei, M., Woo, I., Nishizawa, K., Maeda, T., Takano, Y., Uchiyama, M., Heaney, S., Peters, H., Tang, Z., Maxson, R. and Maas, R.: *Msx2* deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat. Genet.*, 24: 391-395, 2000.
- 41) Cancela, L., Hsieh, C. L., Francke, U. and Price, P. A.: Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix gla protein gene. *J. Biol. Chem.*, 265: 15040-15048, 1990.

研 究

Interleukin (IL)-17F enhances the osteoblast differentiation on titanium surfaces

Chihaya MATSUMOTO¹⁾, Yu SHIMOYAMA²⁾, Katsuichiro MARUO³⁾, Shigenobu KIMURA²⁾

¹⁾ Department of Prosthodontics and Oral Implantology, Iwate Medical University School of Dentistry
(Chief : Prof. Hisatomo KONDO)

²⁾ Division of Molecular Microbiology, Department of Microbiology, Iwate Medical University
(Chief : Prof. Shigenobu KIMURA)

³⁾ Department of Prosthodontic Dentistry for Function of TMJ and Occlusion, Kanagawa Dental University

[Received : December 9, 2014 : Accepted : January 5, 2015]

Abstract : The osteoblast differentiation on the endosseous titanium (Ti) implants is required for successful osseointegration, which could be promoted by various cytokines. Recent studies suggested a pro-inflammatory cytokine, IL-17F, could be a candidate cytokine for inducing the cellular response in the early phase of osteogenesis. However, the role of IL-17F as well as another member of the IL-17 superfamily, IL-17A, in regulating the osteoblast differentiation on Ti surfaces remains unclear. In this study using a rat model, the first molars in both maxillary quadrants were extracted and a Ti bar (ϕ 1.0 x 2.4 mm) was topically applied to one extraction socket. One to 7 days after application, the animals were sacrificed, and the tissue samples from both extraction sockets were collected. IL-17F and IL-17A in the tissue specimens were detected by nested RT-PCR. Furthermore, the direct effect of IL-17s on the cultured preosteoblast MC3T3-E1 cells on Ti disks was examined. In vivo studies indicated the frequency of IL-17F-positive samples from the Ti-applied sockets increased significantly on day 3, whereas the frequency of IL-17A-positive samples gradually increased up to day 3 regardless of Ti application. In vitro studies suggested that IL-17F could stimulate the MC3T3-E1 cells on Ti disks to increase the expressions of alkaline phosphatase and bone sialoprotein. Thus, IL-17F could enhance the osteoblast differentiation on Ti surfaces via the upregulation of osteoblast differentiation markers.

Key Words : IL-17 (IL-17A and IL-17F), osteoblast differentiation, titanium surfaces