

令和元年6月11日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11789

研究課題名(和文) 下顎頭軟骨の炎症発現メカニズムの解明とSema3Aを用いたPCRの予防法の確立

研究課題名(英文) The elucidation of mechanics of inflammatory reaction in mandibular condyle and the establishment of the preventive for PCR applying Sema3A

研究代表者

廣瀬 尚人 (HIROSE, NAOTO)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：50611935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：実験1 (in vitro) マウス軟骨細胞を用い、過度な機械的刺激を付与するとTNF- $\alpha$ 、COX2、IL1- $\beta$ 、MMP3および13の産生は遺伝子およびタンパクレベルで増加した。しかしSema3A添加によりこれら因子は全て有意に減少した。またこの時のシグナル伝達経路をウェスタンブロット法を用いて検討したところ、ErkおよびAktの経路を中心に作用していることが明らかとなった。

実験2 (in vivo) ラット顎関節症モデルを用い、ラットの下顎頭の組織切片を作製、免疫組織学的検討を行った。Sema3Aおよびそのレセプターは軟骨組織で発現していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは、神経細胞の成長方向を規定する因子であるsemaphorin3Aの軟骨における機能に着目し検討を行った。軟骨細胞に機械的刺激を付与したときに生じる炎症関連因子の発現(IL1- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、COX2、MMP3および13)はsemaphorin3A添加により有意に抑制された。この結果は進行性下顎頭吸収のような顎関節疾患の予防法へとつながる貴重な知見だと考える。

研究成果の概要(英文)：Experiment 1: We examined mRNA expression levels using qPCR analysis. The addition of Sema3A significantly inhibited gene expression of inflammatory mediators. We also examined protein expression of IL-1 $\beta$  and MMP-13 under CTS for 24h using Western blot analysis. The addition of Sema3A significantly and dosedependently inhibited expression of IL-1 $\beta$  and MMP-13. To verify whether AKT, ERK, and NF- $\kappa$ B are activated by excessive loading, we measured the expression of p-AKT, p-ERK, and p-NF- $\kappa$ B in ATDC5 cells under CTS for 1h. The phosphorylation of AKT, ERK, and NF- $\kappa$ B was upregulated by CTS according to Western blot analysis and the phosphorylation of AKT, ERK, and NF- $\kappa$ B was slightly blocked by Sema3A.

Experiment 2: The in vivo experiments using rat TMD model is still ongoing in order to clarify the role of sema3A histologically for inflammation in cartilage.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：semaphorin3A condyle cartilage chondrocytes inflammation arthritis temporomandibular TMD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

進行性下顎頭吸収(Progressive Condylar Resorption ;PCR)は下顎頭の退行性変化を主症状とし、またそれが急激に生じる疾患で、厚生労働省より難治性疾患に指定されている。顎矯正手術の術後にしばしば発症することが報告されているがその発症メカニクスについては全くの不明である。一度発症すると下顎頭は吸収し、下顎枝の短小化にともない下顎骨は後方へ回転、咬合は開口を生じることが多い。その場合正常な咬合を回復することは極めて難しく、患者は咀嚼困難などで QOL が著しく低下する。現在治療法は見つかっていない。

Semaphorin3A (Sema3A) セマドメインというアミノ酸配列を有するタンパク質群の総称で、現在 30 種類以上が報告されている。このタンパクは 1990 年代前半に、神経細胞の軸索の伸長方向を制御していることが明らかにされ、現在まで多くの研究が行われてきた。さらに近年これまで知られていた神経軸索ガイダンスの機能以外にも、免疫、血管新生、骨形成、癌の進行などに対し多くの機能を持つことが明らかになり、世界的に研究が進められている。特に骨芽細胞の分化促進と破骨細胞の分化抑制を同時に調節することで骨量を増加させるという骨保護作用について Nature に報告され、骨粗鬆症などの骨関連疾患で注目が集まっている。しかし軟骨における Sema3A の発現および機能については報告がない。申請者らは下顎頭軟骨細胞における Sema3A の機能について着目し、検討を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究では、近年骨代謝において重要な働きを要していることが明らかとなった Semaphorin3A(セマフォリン スリーエー : Sema3A)に着目し、下顎頭軟骨の恒常性の維持における Sema3A のメカニズムを明らかにすることを目的とする。さらに、このメカニズムを制御することによる、進行性下顎頭吸収 (Progressive Condylar Resorption : PCR) の予防法および治療法の確立を最終的な目的とする。最終的には Sema3A の軟骨における局在を検討するとともに軟骨での存在意義を解明することを目的とする。具体的には Sema3A の炎症に対する軟骨細胞保護機能を解明するとともに、Sema3A の投与による PCR 進行を防ぐ予防法および治療法の確立を目指した。また、本申請研究で得られた結果を、すべての退行性関節疾患への応用することを期待する。

## 3. 研究の方法

### 実験 1 マウス軟骨細胞における Sema 3 A の機能に関する検討 (in vitro)

#### 1) Sema3A 添加がマウス軟骨細胞の基質産生能に与える影響 (非炎症状態での影響)

非炎症時の軟骨細胞に対する Sema3A の機能を検討するため、ATDC5 に Sema3A を添加し、細胞外基質構成タンパクおよび、軟骨のリモデリングに関する因子について、Western blot 解析を行う。さらに細胞増殖への影響を検討する。

#### 2) 過度な機械的刺激の付与時 (炎症状態) における Sema3A 添加が、マウス軟骨細胞の炎症性反応および基質産生能に与える影響

軟骨細胞の炎症状態を再現するため、現有の Flexer Strain Unit® (FX-2000, Flexercell International) を用い、細胞に過度な機械的負荷を加える。検討項目は以下の 2 点。

##### 炎症性サイトカインの産生に与える影響

##### 細胞外基質構成タンパクの産生に与える影響

#### 3) 過度な機械的刺激の付与時 (炎症状態) における Sema3A シグナル伝達機構の解明

軟骨細胞に過度な機械的刺激を付与し、同時に Sema3A を添加する。様々なシグナル伝達物質 (FAK、ERK、Akt、NF-κB 等) の定量 Western Blot 解析を行い、Sema3A 添加の有無で挙動が変化するタンパクを検索し、シグナル伝達機構を解明する。

### 実験 2 ラット下顎頭高負荷モデルを用いた検討 (in vivo)

#### 1) 顎関節への Sema3A 局所投与が下顎頭軟骨に与える影響について

#### 2) Sema3A の全身投与が下顎頭軟骨に与える影響について

Sema3A が下顎頭軟骨の組織破壊時に生じる挙動の変化に影響を調べるため顎関節症モデルラットの組織学的検討を行う。またモデルラットに Sema3A を経口投与して時の軟骨破壊抑制効果について検討を行う。

## 4. 研究成果

実験 1 (in vitro)

まず初めに、Sema3A のレセプターである NRP-1 と PlexA1 はいずれも軟骨分化誘導 14 日を最大として発現が増加していた。また Sema3A の発現も同様に分化 14 日後を最大としていた。ATDC5 の分化誘導に関してはこれまで多くの研究を行っているが、我々の用いる分化メディウムでは分化 14 日後にはコラーゲンタイプ II はすでに亢進、アグリカンの遺伝子発現のピークとは一致しており、生体の軟骨細胞と比較すると、前肥大型に近似していると考えられる。Sema3A は軟骨の成熟に関して何らかの機能を有していると考えられる。

次にマウス軟骨細胞を用い、過度な機械的刺激を付与時における Sema3A の添加がマウス軟骨細胞の炎症性反応に与える検討を行った。過度な機械的刺激により TNF- $\alpha$ 、COX2、IL1- $\beta$ 、MMP3 および 13 といった炎症関連因子の産生は遺伝子レベルおよびタンパクレベルで亢進していた。また、この炎症関連因子の亢進は Sema3A 添加により全て有意に低下した。またこの時の細胞質におけるシグナル伝達経路をウェスタンブロット法を用いて検討したところ、Erk および Akt のリン酸化を中心としたシグナル伝達経路を制御することで作用していることが明らかとなった。

#### 実験 2 (in vivo)

13 週齢 Wister 系ラットを用い、これまで申請者らが確立して用いてきたラット顎関節症モデルを作製した。このモデルラットを用い、ラットの下顎頭の組織切片を作製、免疫組織学的検討を行った。Sema3A およびそのレセプターは軟骨組織で発現していることを確認した。しかし顎関節症モデルにおいて Sema3A およびそのレセプターがどのように変化するかについては不明な点も多く現在も検討を続けている。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

Elucidation of the inflammatory mechanism of mandibular cartilage development and the establish of a prevention method for PCR using Sema3A., Hirose N., Chikako S., Yanoshita M., Nishiyama S., Tsuboi E.: Science Impact Ltd, Volume 2019, Number 4.67-69, 2019. (査読なし)

Cyclic Tensile Strain Upregulates Pro-Inflammatory Cytokine Expression Via FAK-MAPK Signaling in Chondrocytes.: Yanoshita M., Hirose N., Okamoto Y., Sumi C., Takano M., Nishiyama S., Asakawa-Tanne Y., Horie K., Onishi A., Yamauchi Y., Mitsuyoshi T., Kunimatsu R., Tanimoto K.: Inflamm , 41 (5), 1621-1630, 2018. (査読あり)

Semaphorin 3A inhibits inflammation in chondrocytes under excessive mechanical stress. : Sumi C., Hirose N., Yanoshita M., Takano M., Nishiyama S., Okamoto Y., Asakawa Y., Tanimoto K.: Mediators Inflamm , 2018, 5703651, 2018. (査読あり)

### 〔学会発表〕(計 4 件)

New therapeutic medicines for temporomandibular joint disorders. : Sumi C, Hirose N: Angle Orthodontic Seminar (Hiroshima), 2018.

下顎頭軟骨への過度な機械的負荷受容時の FAK 阻害剤の抗炎症作用の検討：矢野下真，廣瀬尚人，角千佳子，高野真実，西山沙由理，麻川由起，谷本幸太郎：第 57 回広島県歯科医会．第 102 回広島大学歯学会（広島），2018．

軟骨細胞における Semaphorin3A の役割 -退行性関節疾患の新規治療薬を目指して-：角千佳子，廣瀬尚人，矢野下真，高野真実，西山沙由理，壺井英里，麻川由起，谷本幸太郎：第 77 回日本矯正歯科学会（横浜），2018．

下顎頭軟骨への過度な機械的負荷受容時の FAK 阻害剤の抗炎症作用の検討：矢野下真，廣瀬尚人，角千佳子，高野真実，西山沙由理，麻川由起，谷本幸太郎：第 77 回日本矯正歯科学会（横浜），2018．

### 〔図書〕(計 0 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：國松 亮  
ローマ字氏名：(KUNIMATSU Ryo)  
所属研究機関名：広島大学  
部局名：病院（歯）  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：40580915

研究分担者氏名：吉見 友希  
ローマ字氏名：(YOSHIMI Yuki)  
所属研究機関名：広島大学  
部局名：病院（歯）  
職名：病院助教  
研究者番号（8桁）：50707081

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：角 千佳子  
ローマ字氏名：SUMI Chikako

研究協力者氏名：矢野下 真  
ローマ字氏名：YANOSHITA Makoto  
研究協力者氏名：高野 真実  
ローマ字氏名：TAKANO Mami

研究協力者氏名：西山 沙由理  
ローマ字氏名：NISHIYAMA Sayuri

研究協力者氏名：壺井 英里  
ローマ字氏名：TSUBOI Eri

研究協力者氏名：丹根 一夫  
ローマ字氏名：TANNE Kazuo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。