

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11919

研究課題名(和文)変形性顎関節症におけるオートファジーの発現と形態的变化の解析

研究課題名(英文)Effects of autophagy caused by osteoarthritis

研究代表者

渡辺 仁資(Watanabe, Hitoshi)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：90384304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画では変形性顎関節症における骨細胞とオートファジー関連タンパクの発現との関連性を解明するための研究を進めた。特に、関節炎部位に見られる低酸素状態によって惹起される骨細胞における細胞死(ネクローシス、アポトーシス、オートファジー)の検索、および、それを改善する薬剤の検索を、in vitroにて検討した。その結果、低酸素状態では、骨細胞は3つの細胞死がともに誘導されるが、オートファジーが細胞生存に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、同時に、ビタミンDがこの機能調整に主要な役割を担っていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究系結果によって、顎関節炎によって惹起される低酸素状態によって、損傷部位の顎骨の骨細胞の細胞死は異なる3つの細胞死の形態によって調節されていることが明らかとなった。同時に、それを調節に重要な役割を果たしホルモンがビタミンDであることも明らかとなった。よって、ビタミンDによる新たな顎関節炎の治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the relationships between osteocytes and autophagy (along with autophagy-related proteins) on osteoarthritis. In particular, we investigated not only the changes of types of cell death (necrosis, apoptosis and autophagy), but also the chemicals, which recovered the cell death in vitro. Subsequently, we revealed that under hypoxia all of the types of cell death were induced, however, autophagy played an important role of cell survival. Also, we indicated that vitamin D plays a central role for the regulation of cell survival.

研究分野：口腔外科学

キーワード：オートファジー アポトーシス ネクローシス 変形性顎関節症疾患 低酸素 骨細胞

1. 研究開始当初の背景

変形性顎関節症は、高齢者に多くみられる疾患である。老促進マウスを用いて顎関節頭に加齢変化を免疫組織学的に解析した報告では、加齢に伴い関節頭では骨破壊が進行し、下顎頭軟骨は加齢に伴う菲薄化と軟骨細胞の減少が示されている(山田耕司:日本顎咬合学会, 7:55- 68, 1995)。一方、胎生 18.5 日のマウスの成長軟骨帯におけるオートファジーのマーカである LC3 や Beclin の発現を解析した報告では、軟骨細胞の成熟から細胞死へ至る過程における変化を示しており、軟骨細胞生存に大きくかかわる可能性が示された(Srinivas V, Bohensky J, Shapiro IM. Cells Tissue Organs 189: 88-92 2009)。

申請者らの研究グループでは、軟骨代謝におけるオートファジーの発現について解析し、マウスの骨頭部軟骨では生後 18 カ月と比較して生後 30 カ月では LC3 の発現が増強することを明らかにした(Bohensky J, et al: Autophagy 3: 207-214, 2007)。また、変形性膝関節症(OA)患者由来の関節軟骨は健常者由来の関節軟骨と比較して LC3 の発現が増加することを明らかにした。さらに、この実験では、加齢に伴って LC3 が増強されることを示唆する結果が得られている(Bohensky J, et al: Arthritis Rheum 60, 1406-15, 2010)。

2. 研究の目的

オートファジーはアポトーシスとの関連が示唆されている。私達は軟骨細胞におけるオートファジーとアポトーシス調節因子を脱共役タンパク質(UCP3: Uncoupling Protein3)が調節することを明らかにした(Watanabe H, et al: J Cell Physiol 216, 419-425, 2008)。このように軟骨細胞の生存にもオートファジーが関与していることが明らかになった。以上の研究結果から、高齢者に多く認められる変形性顎関節症の発症メカニズムは、関節頭部における軟骨に対するオートファジーの発現を解析することで解明できるのではないかと、この着想に至った。

そこで、本研究では変形性顎関節症における関節頭の形態変化とオートファジー関連タンパクの発現との関連性を解明するために以下の研究を進めた。

3. 研究の方法

1. 低酸素状態でオートファジーを誘導し、オートファジー関連蛋白を発現する骨細胞株の探索をした。具体的には、マウス由来の骨細胞 MLO-Y4 細胞株を低酸素状態(2% O₂、5% CO₂)にて 0、8、16、24、48 時間にそれぞれ曝露し、cell viability assay および caspase3/7 の活性測定を行った。同時に、骨細胞株がオートファジーではなくアポトーシス優位となる時期の検索を行った。

2. オートファジー阻害薬である 3-メチルアデニンを添加し、対照群と比較した。阻害剤

を添加することにより、細胞死に向かうのかを検討し、前述と同様の実験を行った。

3. オートファジーおよびアポトーシスのシグナル伝達をウエスタンブロットとリポーターアッセイで検討した

オートファジーが活発に発現している時期を検索し、オートファジータンパクである LC3 および p62 をウエスタンブロットにより観察し、対照群との比較を行った。

4. 細胞死を誘導させた細胞において、細胞を生存させるようにする薬剤の同定をした。

4 . 研究成果

低酸素環境下において、3-MA を添加し、オートファジーを阻害すると骨細胞は細胞増殖が抑制され、同時に、caspase3/7 活性が上昇した。すなわち、低酸素下でオートファジー機構が遮断されると、骨細胞はアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。

すなわち、本研究系結果によって、顎関節炎によって惹起される低酸素状態によって、損傷部位の顎骨の骨細胞の細胞死は異なる 3 つの細胞死の形態によって調節されていることが明らかとなった。同時に、それを調節に重要な役割を果たしホルモンがビタミン D であることも明らかとなった。よって、ビタミン D による新たな顎関節炎の治療法の可能性が示唆された。

なお、本研究の詳細な結果は、後日、学術論文にて公表を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗原舞、椋代義樹、安部勇蔵、祝部亜紗美、代田達夫、
2. 発表標題 低酸素環境下における骨細胞はオートファジーによって細胞死が抑制される
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	椋代 義樹 (Mukudai Yoshiki) (50325099)	昭和大学・歯学部・助教 (32622)	
研究分担者	山田 篤 (Atsushi Yamada) (50407558)	昭和大学・歯学部・講師 (32622)	
研究分担者	代田 達夫 (Tatsuo Shirota) (60235760)	昭和大学・歯学部・教授 (32622)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------