

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09769

研究課題名(和文)変形性顎関節症の新規治療法の開発を目指したLubricinの発現調節機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the expression and regulation mechanisms of Lubricin aiming at the development of a new treatment for osteoarthritis of the jaw

研究代表者

栗尾 奈愛 (KURIO, Naito)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：80622141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：変形性顎関節症(TMJ-OA)は顎関節を構成する骨軟骨の破壊を特徴とし、関節痛や開口障害により患者のQOLを低下させる。一旦発症した場合、変形した関節を修復させる根本的治療法は確立されておらず新規治療法の開発が望まれるが病態が不明であることが多く発症機序の解明が急務である。Lubricinは関節軟骨の保護に重要な役割を持つが、その発現調節機構に関しては不明な点が多い。本研究では顎関節のLubricin産生におけるTGF-シグナルの役割と分子調節機構の解析を行った。本研究はTMJ-OAの予防法や新たな治療法の確立のための基礎研究となると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性顎関節症(TMJ-OA)は顎関節を構成する骨軟骨の破壊を特徴とし、関節痛や開口障害により患者のQOLを低下させる。一旦発症した場合、変形した関節を修復させる根本的治療法は確立されておらず新規治療法の開発が望まれるが病態が不明であることが多く発症機序の解明が急務である。Lubricinは関節軟骨の保護に重要な役割を持つが、その発現調節機構に関しては不明な点が多い。本研究では顎関節のLubricin産生におけるTGF-シグナルの役割と分子調節機構の解析を行った。本研究はTMJ-OAの予防法や新たな治療法の確立のための基礎研究となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：TMJ-OA is characterized by the destruction of the osteochondral constituents of the temporomandibular joint, which reduces the patient's QOL due to arthralgia and trismus. Once the disease develops, a fundamental treatment method for repairing the deformed joint has not been established, and development of a new treatment method is desired, but the pathological condition is often unknown, and elucidation of the pathogenic mechanism is urgently needed. Lubricin plays an important role in the protection of articular cartilage, but there are many unclear points regarding its expression regulation mechanism. In this study, we analyzed the role of TGF-signal in the production of Lubricin in the temporomandibular joint and the mechanism of molecular regulation. This study is considered to be a basic study for establishing preventive methods and new treatment methods for TMJ-OA.

研究分野：口腔外科学

キーワード：変形性顎関節症 PRG4 TGF

## 1. 研究開始当初の背景

顎関節は下顎頭、下顎窩、関節円板、滑膜から構成される滑膜性関節であり、滑液中のLubricinは関節の潤滑な動きに不可欠である。Lubricinの減少、性状変化は摩擦抵抗を増大させ、関節軟骨を損傷し、TMJ-OAを発症すると予測される。**軟骨組織は血管や神経組織を欠き自己修復能力に乏しく、一旦障害を受けると自然治癒は望めない。**

Lubricinはムチン様構造を豊富に含み水和性に富むプロテオグリカンで関節面の低摩擦性に寄与し軟骨を保護しており、TMJ-OA患者の滑液中での減少が報告されている(Leonardi R, et al. 2016)。研究代表者らはLubricinをコードするPRG4遺伝子欠損マウスを解析し、関節円板や滑膜の異常な肥厚と異所性軟骨形成、下顎頭軟骨の破壊などのTMJ-OAの発症を確認した。このことは**Lubricinの減少がTMJ-OA発症の直接的な危険因子であること、Lubricinの補充療法はTMJ-OAの発症を予防する可能性があることを示唆するものであった。**

Transforming Growth Factor- (TGF-)は骨や関節軟骨に豊富に存在する成長因子で軟骨細胞の遊走、分化や軟骨基質の産生を調節している。近年、顎関節の下顎頭軟骨細胞でTGF-濃度依存的にLubricinの産生が増加すること(Ohno et al.2006)や過度なメカニカルストレスがTGF-遺伝子発現を低下させLubricin産生を減少させることが報告され(Kamiya et al.2010)、TGF-がLubricin産生の重要な因子であることが示唆されておりTMJ-OAの治療への応用が期待されている。しかしながら**Lubricin産生細胞におけるTGF-シグナルの減少が実際にTMJ-OAの発症に寄与しているかに関しては全く報告がなく不明であり、またこれを評価するための疾患モデルマウスや、in vitroにおけるLubricin産生細胞に対するTGFシグナルの影響を評価する実験系は確立されていない。**

## 2. 研究の目的

本研究の目的はLubricinの産生に対するTGF-シグナルの役割をin vivo, in vitroで検討し、TGF-シグナルの減少がTMJ-OA発症にどのように寄与するか検討を行い、この結果によりTMJ-OAの新規治療法の可能性を模索することである。

## 3. 研究の方法

- (1)LubricinをコードするPRG4遺伝子の顎関節における発現パターンの解析。
- (2)TGF-関連因子の発現とLubricinの発現部位における相関性の検討。
- (3)TGF-シグナルの減少とLubricin産生能に対する直接的な影響の検討。
- (4)In vitroにおけるLubricin産生細胞のTGF-シグナル評価のための細胞実験系の確立。
- (5)In vitroでのLubricin産生におけるTGF-のシグナル伝達経路の評価

## 4. 研究成果

(1)PRG4遺伝子特異的なCreマウスであるPRG4CreER<sup>T2</sup>マウスとSTOPコドン下流に蛍光タンパク質(Zs-Green)を導入したROSA26 Zs-Green floxedマウスを交配した遺伝子改変動物を作成しタモキシフェンを投与した後に顎関節を回収し、凍結切片を作成した。蛍光顕微鏡でZs-Greenタンパクの顎関節における発現を検討したところ、関節軟骨表層での発現に比べ、関節円板や滑膜組織での発現量が多いことがわかった(図1)。

(2)野生型マウスの顎関節を用いてパラフィン包埋切片を作製し、Lubricin、TGF-、TGF-レセプター(TGF R2、TGF R1: ALK1、ALK5)の発現を免疫組織学的染色を用いて染色し、その発現の局在を確認した。TGF R2、TGF R1、ALK1、ALK5の発現は関節軟骨の全層、滑膜組織に認められたが、抗体の特異性が低いのか局在を明確にすることは難しかった。

(3) PRG4CreER<sup>T2</sup>マウスとTGF- R2<sup>fllox/fllox</sup>マウスを交配しLubricin産生細胞特異的なCKOマウスを作製し、H-E染色、Safranin-O/Fast Green染色等を用いて顎関節を形態学的に解析した。24週齢のCKOマウスの顎関節で一部に関節軟骨の変性を認める個体を認めたが、有意な差を示せなかった。タモキシフェンの投与回数や顎関節に対する機械的刺激を加えて検討する必要があると考えられ、現在検討中である。

同マウスの顎関節におけるPRG4遺伝子やLubricinタンパクの発現をin situ hybridization、免疫組織学的染色を用いて染色したが、TGF-シグナルの減少がLubricinの発現に関して有意な差は出していない。顎関節に対する機械的刺激を加えて検討する必要があると考えられ、現在も検討中である。

(4) Lubricinを発現する細胞株は樹立されていないため、初代細胞培養系を用いて実験を行った。

つまり、PRG4 プロモーターの制御下において蛍光 mCherry タンパクを発現する PRG4 レポーターマウスの顎関節(図 2)から単離した細胞を用いて各種の実験を行った。

PRG4 レポーターマウスから採取した下顎頭、関節円板、下顎窩、滑膜からそれぞれの表層細胞を酵素処理により細胞を回収し、FACS を用いたセルソーティングで選択的に mCherry 陽性細胞を単離した。

単離後、それぞれの細胞を TGF- $\beta$  で処理した際の Lubricin の発現量の違いを real-time PCR、western blot で解析したところ関節軟骨表層細胞、関節円板の細胞、滑膜組織の細胞を TGF- $\beta$  で処理することによる高い発現を認めた。関節軟骨の下層の細胞での発現は認めなかった(図 3)。

PRG4 レポーターマウスから下顎頭、下顎窩、関節円板、滑膜を摘出し器官培養を行い TGF- $\beta$  で処理することでそれぞれの組織における mCherry の発現を PRG4 遺伝子の発現量として評価し、in vitro の結果と比較した。mCherry の発現は関節軟骨表層、関節円板、滑膜で発現を認めていた。関節円板、滑膜での発現が特に多く認められ、野生型マウスの PRG4 遺伝子の発現と一致していた。

(5) Lubricin の発現は TGF- $\beta$  刺激で誘導されるが TGF- $\beta$  の下流のシグナル伝達経路は不明である。TGF- $\beta$  は 2 つの TGF- $\beta$  1 レセプターである ALK5、ALK1 に結合しそれぞれ SMAD2/3 と SMAD1/5/8 をリン酸化することにより下流の遺伝子発現を調節することが知られている。そこで(4)で回収された mCherry 陽性細胞を用いて TGF- $\beta$  刺激によりどちらのシグナル伝達経路が Lubricin 産生に寄与するのかを real-time PCR で解析した関節軟骨表層細胞を用いた実験では TGF- $\beta$  1 により SMAD2/3 と SMAD1/5/8 のどちらの系も活性化されたが、SMAD2/3 シグナルがより顕著であった。

またこれらを裏付けるため TGF- $\beta$  特異的シグナル拮抗薬剤(ALK1、ALK5 阻害剤)で細胞を処理し TGF- $\beta$  により誘導される SMAD シグナルや Lubricin 発現への影響を解析したところ、PRG4 遺伝子の発現は ALK5 の阻害剤でのみ抑制された。

さらに ALK1 を mCherry 陽性細胞に遺伝子導入しそれぞれの恒常発現細胞を作製し Lubricin 産生への影響を解析したが ALK1 による PRG4 遺伝子の発現上昇は認められなかった。

以上から PRG4 遺伝子の発現は SMAD2/3 シグナルを介したものであることが示唆された(図 4)。

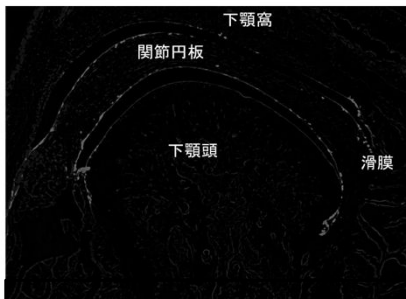


図 1: 24 週齢 PRG4CreER<sup>1/2</sup>xRosa26Zs-Green マウスにタモキシフェンを投与し 24 時間後の Zs-Green の発現(白色)。関節軟骨、関節円板、滑膜の表層細胞に PRG4 遺伝子の発現が認められる。

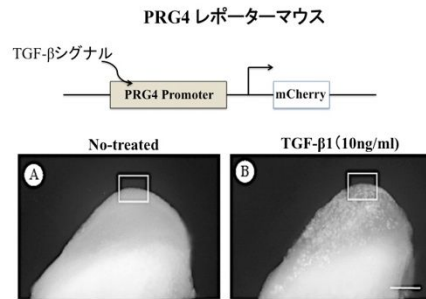


図 2: PRG4 レポーターマウス TGF- $\beta$  による PRG4 プロモーター刺激により関節軟骨表層に mCherry(白点)が誘導される。

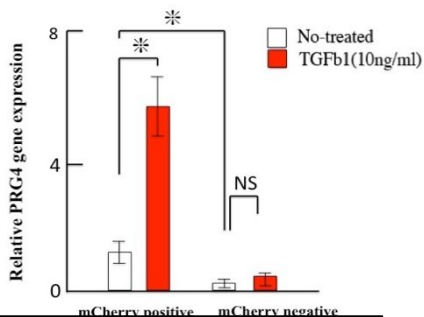


図 3: 下顎頭軟骨細胞から単離した mCherry 陽性細胞と陰性細胞の TGF- $\beta$  応答性の違い

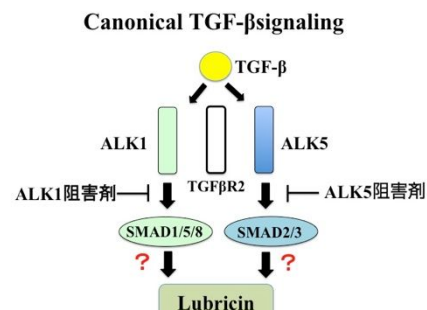


図 4: Lubricin 産生に影響する TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の探索

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 栗尾 奈愛, 鎌田 久美子, 宮本 洋二, 佐々木 朗
2. 発表標題 顎関節のPrg4発現調節機構におけるTGF- シグナルの役割.
3. 学会等名 第72回日本口腔科学会総会.
4. 発表年 2018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	福田 直志 (FUKUDA Naoshi) (10804156)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教  (16101)	
研究分担者	宮本 洋二 (MIYAMOTO Youji) (20200214)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授  (16101)	
研究分担者	中川 貴之 (NAKAGAWA Takayuki) (30456230)	広島大学・病院(歯)・助教  (15401)	
研究分担者	高丸 菜都美 (TAKAMARU Natsumi) (40513031)	徳島大学・病院・講師  (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	大江 剛  (OHE Go)  (60432762)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・徳島大学専門 研究員   (16101)	
研究分担者	真野 隆充  (MANO Takamitsu)  (80325125)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・徳島大学専門 研究員   (16101)	

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